



# Efecto cardioprotector del metropolol en la reperfusión coronaria: análisis del miocardio isquémico en riesgo mediante resonancia magnética cardiaca

Susanna Prat González

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**Divisió de Ciències de la Salut**

**Facultat de Medicina**

**EFFECTO CARDIOPROTECTOR DEL METOPROLOL EN LA  
REPERFUSIÓN CORONARIA: ANALISIS DEL MIOCARDIO  
ISQUÉMICO EN RIESGO MEDIANTE RESONANCIA MAGNÉTICA  
CARDIACA**

**Tesis doctoral elaborada y presentada por**

Susanna Prat Gonzalez

**Directores**

Dra. Marta Sitges Carreño

Dr. Borja Ibañez Cabeza

Dr. Juan José Badimón Maestro

Departament de Medicina, Universitat de Barcelona

Barcelona, 2012



A la meva família, a l'Oriol i a la Clàudia





## **AGRADECIMIENTOS**



Uno de los momentos donde te das cuenta de cuánto trabajo y dedicación por parte de mucha gente requiere presentar una tesis, es cuando quisieras agradecer a todas las personas que te han ayudado en algún momento de este camino. Seguramente me resultará imposible en dos páginas.

A mis tres co-directores:

Al Dr Borja Ibañez, mi buen amigo, de quien destacaría entre muchas de sus cualidades, su gran conocimiento científico pero a la vez la habilidad de saberlo transmitir y hacerte partícipe de sus (siempre) buenas ideas. Sin él este trabajo no hubiera existido. Y me quedo tranquila porque al final de tantas resonancias a las tantas aprendió un poco de catalán, tendrías que verle como pronuncia “barrufeta” y “entremaliat”...

Al Dr Juan J Badimón, que fue un jefe de grupo siempre cercano, que nos apoyó en todo momento, y que nos dió las bases para una buena investigación científica.

A la Dra Marta Sitges, qui va confiar en mi “a cegues”, que m’ha animat a fer realitat aquesta tesis i que li ha donat el perfeccionisme que li faltava. Espero en els propers anys poder-li demostrar que ha valgut la pena comptar amb mi.

Al Dr Valentin Fuster, director del *Cardiovascular Institute de la Mount Sinai School of Medicine*, en Nueva York, donde realizamos el trabajo de esta tesis. De él aprendí que el éxito profesional se consigue con mucho trabajo e ilusión por la ciencia. Oriol y yo le agradecemos todo el apoyo que nos ofreció durante nuestra estancia en Nueva York.

Y allí estuve tres magníficos años con el grupo de imagen cardiovascular no invasiva, con el Dr Javier Sanz, el Dr Mario Garcia, Aileen, Frank, Hannah, Juan, Gonzalo, Lorraine, Marta... A todos ellos les estoy muy agradecida porque hicieron posible que mi día a día fuera una mezcla de mucho trabajo, conocimiento y diversión (por no repetir ilusión).

A todo el grupo de la *Atherothrombosis Research Unit* dirigida por el Dr J Badimón; a Gemma Vilahur, Walter Speidel, Giovanni Cimmino, Antonio Piñero, Randolph Hutter,

Urooj Zafar, Boris Cortes y Noemí Escalera con quienes compartí experimentos, muchas resonancias, artículos, risas y pizzas.

A todos los veterinarios del Center of Comparative Medicine and Surgery (CCMS) New York, ya que hicieron posible nuestra investigación experimental con animales con los mejores cuidados.

A la Sociedad Española de Cardiología y a la Fundación Caja Madrid que con sus becas ayudan a muchos jóvenes profesionales a completar nuestra formación.

Al Dr Josep Brugada i al Dr Manel Sabaté, que han fet posible que la meva tornada a Barcelona estigui lligada a aquesta casa.

Als meus nous companys d'ecocardiografia, el Dr Carles Paré, el Dr Manel Azqueta, la Dra Barbara Vidal, la Dra Silvia Montserrat, la Dra Rocio Robles, als tècnics i infermeres, que m'ensenyen cada dia que pots anar a dormir sabent una cosa més. Al Dr José Tomás Ortiz, qui sempre em dóna savis consells, a la Dra De Caralt i a la Dra Perea, amb qui tinc la sort de poder treballar i compartir hores a la resso i a la "mezquita".

Als meus amics, voldria citar-vos a tots, però si per casualitat em deixés algú no m'ho perdonaria. Ja sabeu que lluny o aprop sempre heu estat amb mi i, alguns, fins i tot compartint el nostre 6è sense ascensor.

I a la meva família, la de sempre i la nouvinguda. Als meus sogres per la fe que tenen en mi, als meus cunyats, al meu germà i a la meva germana (que espero que no es presentin amb una pancarta el dia de la lectura), als tiets, a les tietes, a la meva iaiona (que està esperant a fer els 90 per celebrar aquesta tesis juntes). I sobretot als meus pares, que ara que sóc mare puc entendre molt millor tot el què han fet, fan i faran per mi cada dia.

I a l'Oriol, a qui dedicar-li la tesi em sembla poc, així que li dedicaré a la nostra millor "feina", la nostra filla Clàudia, a qui intentarem en els futurs anys poder-li ensenyar aquest camí barrejat, de ciència i aventures, que el seu pare i jo hem tingut la sort de poder realitzar i disfrutar.





# ÍNDICE

---

## ABREVIATURAS

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>19</b>
1.1 Epidemiología y fisiopatología del infarto agudo de miocardio	19
1.2 Betabloqueantes en el infarto agudo de miocardio	20
1.3 Conceptos: área en riesgo y miocardio salvado	25
1.4 Papel de la resonancia magnética cardíaca en el infarto agudo de miocardio	27
1.4.1 Aspectos técnicos de la RMC: Secuencias en el estudio del infarto	29
1.4.1.1 Secuencia de cine para analizar la función ventricular izquierda	29
1.4.1.2 Secuencia de realce tardío para determinar el tamaño del infarto	30
1.4.1.3 Secuencia de edema para estimar el miocardio en riesgo	34
1.5 Daño por reperfusión	35
1.6 Modelos animales de experimentación	38
<b>2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS</b>	<b>43</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>47</b>
3.1 Modelo experimental animal	49
3.1.1 Animales de experimentación	49
3.1.2 Modelo porcino de infarto agudo de miocardio	49
3.2 Resonancia magnética cardíaca: protocolos	52
3.3 Análisis de los datos de la RMC	54
3.3.1 Análisis de los volúmenes ventriculares y la fracción de eyección	54
3.3.2 Análisis de la área edematosa y de la área necrótica	55
3.3.3 Estimación del miocardio salvado	55
3.3.4 Índice de extensión transmural global y regional	57



3.3.5	Parámetros de calidad de la señal	57
3.4	Determinaciones en tejidos	57
3.4.1	Histología del tamaño del infarto	57
3.4.2	Estudio del daño por reperfusión	59
3.5	Análisis estadístico	60
3.5.1	Estudio 1	60
3.5.2	Estudio 2	61
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>65</b>
4.1	Estudio 1 :	65
4.1.1	Análisis de la RMC: efecto del metoprolol sobre el miocardio salvado y la función VI.	65
4.1.2	Correlación Histología-RMC	69
4.2	Estudio 2:	70
4.2.1	Efecto de los diferentes regímenes de administración del metoprolol sobre la función del VI y del miocardio salvado	70
4.2.2	Efectos de los diferentes regímenes de administración del metoprolol en el daño por reperfusión	72
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>79</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>89</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>93</b>
<b>8.</b>	<b>APÉNDICE</b>	<b>110</b>

## **ABREVIATURAS**



## **ABREVIATURAS**

IAM: infarto agudo de miocardio.

IAMEST: IAM con elevación del segmento ST.

ADA: arteria descendente anterior.

RMC : resonancia magnética cardíaca.

RMC-rt: resonancia magnética cardíaca con realce tardío.

VI: ventrículo izquierdo

FEVI: Fracción de eyección del ventrículo izquierdo.

VTDVI: volumen telediastólico de ventrículo izquierdo.

VTSVI: volumen telesistólico del ventrículo izquierdo.

TI: tiempo de inversión.

MPO: mieloperoxidasa

mPTP: poro de transición mitocondrial

i.v.: intravenoso

v.o.: vía oral



## INTRODUCCIÓN



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 EPIDEMIOLOGIA Y FISIOPATOLOGIA DEL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO

El infarto agudo de miocardio (IAM) es la principal causa de muerte en el mundo occidental, ocasionando más de 3.5 millones de muertes cada año. El infarto es el resultado de una oclusión de una arteria coronaria epicárdica, interrumpiéndose la circulación del flujo anterógrado en dicha arteria. La zona de miocardio que estaba alimentada por esta arteria deviene isquémica, perdiendo la habilidad de contraerse. Si la isquemia es breve el miocardio no se necrosa. No obstante, la isquemia prolongada produce muerte celular. El miocardio severamente isquémico termina necrosándose de forma progresiva desde el subendocardio hacia el epicardio. Reconocer que la progresión de la necrosis miocárdica es dependiente del tiempo es la base de todos los esfuerzos realizados y los tratamientos de intervención propuestos para salvar el miocardio <sup>1</sup>. Actualmente se acepta que el factor más importante para aumentar la cantidad y la calidad del miocardio salvado es el tiempo de reperfusión. Además, el tamaño final del infarto residual es el factor más importante de mortalidad y remodelado post-infarto <sup>2</sup>.

Recientemente, se ha demostrado que una intervención percutánea coronaria precoz (reperfusión mecánica) es la mejor estrategia disponible para reinstaurar el flujo de sangre en el miocardio isquémico siempre y cuando ésta pueda hacerse en un tiempo adecuado y en centros con experiencia suficiente. Ello ha motivado el desarrollo de programas que permitan una reperfusión temprana en pacientes con un IAM <sup>3</sup>, con la finalidad de reducir la extensión del



tamaño de la necrosis miocárdica. A pesar de estos programas y de una reperfusión temprana, el área necrótica final tras el IAM continúa siendo extensa en muchos pacientes. Ello a su vez, se relaciona con una incidencia elevada de nuevos eventos cardiovasculares, insuficiencia cardíaca y discapacidad crónica en el seguimiento. Por consiguiente, las intervenciones cardioprotectoras que permitan limitar en mayor medida el tamaño del IAM están siendo objeto de intensa investigación.

En el contexto de este trabajo de tesis doctoral la reducción del tamaño del infarto durante un IAMEST se denominará cardioprotección.

### **1.2 . BETABLOQUEANTES EN EL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO**

Los betabloqueantes (desde ahora  $\beta$ -bloqueantes) son inhibidores competitivos de las catecolaminas en los adrenoreceptores ( $\beta$ -R) produciendo un antagonismo reversible de los efectos beta adrenérgicos en varios órganos. Estos están clasificados como cardiosselectivos o no cardiosselectivos dependiendo de su capacidad de bloquear los receptores  $\beta_1$  (cardiosselectivos). No obstante, se conoce actualmente que el músculo cardíaco también posee receptores  $\beta_2$ , los cuales pueden ser importantes en algunas situaciones patológicas como la insuficiencia cardíaca congestiva y la isquemia miocárdica, e incluso receptores  $\beta_3$ -adrenérgicos <sup>4</sup>. Los  $\beta$ -bloqueantes tienen un uso extendido en el tratamiento de distintas enfermedades cardiovasculares incluyendo la cardiopatía isquémica, la hipertensión <sup>5</sup>, la insuficiencia cardíaca <sup>6, 7</sup> y también como fármacos antiarítmicos <sup>8, 9</sup>. Uno de los fármacos más estudiados dentro de este grupo es el metoprolol (un antagonista selectivo del receptor adrenérgico  $\beta_1$ ). Es un agente relativamente cardiosselectivo ya que

inhibe el receptor  $\beta_1$ , produciendo menor inhibición del receptor  $\beta_2$ . Este fármaco ha demostrado mejorar la supervivencia de pacientes con infarto de miocardio <sup>10</sup> y con insuficiencia cardíaca <sup>11</sup>.

Los  $\beta$ -bloqueantes han sido estudiados detalladamente en el contexto del IAM con elevación del segmento ST (IAMEST) y constituyen el tratamiento de primera línea en la prevención secundaria tras un IAM ya que han demostrado reducir la mortalidad cuando se han administrado después del infarto de miocardio <sup>12</sup>. Asimismo, han demostrado reducir la incidencia de reinfarto, de isquemia recurrente, de arritmias malignas y prevenir el remodelado ventricular izquierdo <sup>13</sup>.

En consecuencia, las actuales guías para la práctica clínica recomiendan el empleo de un  $\beta$ -bloqueante oral dentro de las primeras 24 horas tras el IAM como indicación clase IA <sup>3</sup>. Aunque no hacen énfasis en cuando deber ser el inicio de este tratamiento antes de la reperfusión <sup>14</sup>.

A pesar de los beneficios clínicos demostrados de los  $\beta$ -bloqueantes, su efectividad como agentes cardioprotectores ha sido estudiada con resultados poco concluyentes. Modelos experimentales de infarto reperfundido <sup>15, 16</sup> y no reperfundido <sup>17-19</sup> muestran, de hecho, efectos contrapuestos con reducción <sup>15, 18</sup> o, ningún efecto en el tamaño final del infarto <sup>16, 17, 19</sup>.

En cuanto al ámbito clínico, sigue también sin haber respuesta a la pregunta de si los  $\beta$ -bloqueantes reducen realmente el tamaño del IAM.

La mayor parte de los ensayos clínicos en pacientes con IAMEST fueron realizados en la era previa a la reperfusión coronaria y sus resultados fueron contradictorios <sup>10, 20, 21</sup>. Con el inicio del tratamiento trombolítico se realizaron algunos estudios probando el uso precoz de los  $\beta$ -bloqueantes. En el ensayo

TIMI-IIB<sup>22</sup> se investigó el efecto del  $\beta$ -bloqueo inmediato, en comparación con el tardío, en pacientes con IAMEST tratados con trombolisis. El inicio precoz de un tratamiento intravenoso (i.v.) con metoprolol produjo una reducción significativa de los reinfartos a las 6 semanas. No se dispone de datos respecto al efecto de ambas estrategias en el tamaño del infarto.

Finalmente, en la era de la reperfusión mecánica mediante angioplastia primaria el efecto de los  $\beta$ -bloqueantes ha sido poco estudiado y de una manera no aleatorizada<sup>23</sup>.

Además, de los escasos y contradictorios estudios disponibles, otra limitación frecuente de los estudios clínicos que evalúan las propiedades cardioprotectoras de los  $\beta$ -bloqueantes es que el tamaño del infarto se ha cuantificado con métodos indirectos como cambios electrocardiográficos o liberación de marcadores plasmáticos de daño miocárdico. Asimismo, todos los estudios con animales que analizaron el tamaño del infarto lo hicieron post-mortem o ex vivo y en la mayoría de los casos con unos tiempos de reperfusión muy cortos (hoy día se sabe que el tamaño del infarto no se “completa” hasta pasadas al menos 24-48 horas).

Otro inconveniente importante de estos estudios con  $\beta$ -bloqueantes, es la heterogeneidad existente en el inicio de su administración. No se sabe cuántos pacientes de cada ensayo han recibido el  $\beta$ -bloqueante antes, durante o después de la reperfusión. Dada la relevancia del daño por reperfusión como factor que contribuye de manera determinante al tamaño final del infarto, creemos que esta cuestión (administración de  $\beta$ -bloqueantes antes o después de la reperfusión) influye en lo que respecta al tamaño final del infarto.

Por otro lado, es importante señalar que no hay ningún estudio clínico que haya

comparado prospectivamente las vías de administración de los  $\beta$ -bloqueantes que se proponen en su uso actual, administración intravenosa antes y oral después de la reperfusión coronaria. Dos de los pocos estudios existentes a este respecto son los del análisis retrospectivo post-hoc de los ensayos CADILLAC (*Controlled Abciximab and Device Investigation to Lower Late Angioplasty Complications*) y PAMI (*Primary Angioplasty in Myocardial Infarction*)<sup>24, 25</sup>. Ambos estudios coincidieron en la observación de que, pese a que no se evaluó el tamaño del infarto, la mortalidad inicial y tardía fue significativamente inferior en el grupo de los pacientes tratados con  $\beta$ -bloqueantes i.v. antes de la reperfusión, en comparación con los tratados posteriormente con  $\beta$ -bloqueantes orales. Además, la recuperación de la motilidad del VI a los 6 meses en la cohorte del estudio CADILLAC mostró una mejoría significativa en los pacientes tratados con  $\beta$ -bloqueantes i.v. antes de la reperfusión en comparación con los tratados con  $\beta$ -bloqueantes orales posteriormente<sup>24</sup>.

Con estas evidencias y en base a los resultados del ensayo COMMIT, las guías clínicas actuales<sup>3</sup> aceptan situaciones en las que los  $\beta$ -bloqueantes podían estar desaconsejados.

Los datos obtenidos en el ensayo COMMIT han planteado dudas respecto a la utilidad de la administración i.v. temprana de metoprolol en el IAM<sup>26</sup>. En este ensayo, más de 40.000 pacientes con IAM tratados con trombolisis (la reperfusión con angioplastia primaria era un criterio de exclusión del estudio) fueron incluidos en la asignación aleatoria al empleo i.v. muy temprano de metoprolol seguido del fármaco por vía oral o al de un placebo indistinguible. A pesar de que hubo una reducción significativa de las tasas de reinfartos y de

fibrilación ventricular en el grupo de metoprolol, no se observaron diferencias en cuanto a la mortalidad. Esto se debió principalmente a un exceso de casos de shock cardiogénico en el grupo del  $\beta$ -bloqueante. No hay datos relativos al efecto de los tratamientos en el tamaño del infarto. Al analizar estos resultados, es preciso resaltar dos puntos. En primer lugar, la asignación aleatoria de los pacientes se realizó en las primeras 24 horas tras el inicio del IAM y el empleo de fibrinólisis se efectuó en promedio a las  $10 \pm 6$  horas del inicio de los síntomas. El porcentaje de miocardio en riesgo que puede rescatarse con cualquier intervención, incluida la propia revascularización, diez horas después de la oclusión coronaria, es escaso. En segundo lugar, es de destacar que, si bien la mortalidad se redujo en el grupo de metoprolol de los pacientes con IAM en los pacientes en clases de Killip I y II, fue un 19% superior en los pacientes de la clase de Killip III. Además, los pacientes con presión arterial sistólica  $< 120$  mmHg presentaron también un aumento de la mortalidad al ser tratados con metoprolol. Estos resultados refuerzan los criterios clásicos de contraindicación para el tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes en los pacientes con insuficiencia cardíaca franca. Este tipo de pacientes han sido excluidos sistemáticamente de otros estudios con  $\beta$ -bloqueantes. De hecho, un metanálisis realizado por los propios investigadores del estudio COMMIT, en el que se incluyeron los datos de pacientes de dicho ensayo con presión arterial sistólica  $> 105$  mmHg, frecuencia cardíaca  $> 65$  lpm y clase de Killip I, indican que el empleo temprano de un tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes i.v. comporta menor frecuencia de episodios de la variable combinada de muerte, reinfarto y parada cardíaca.

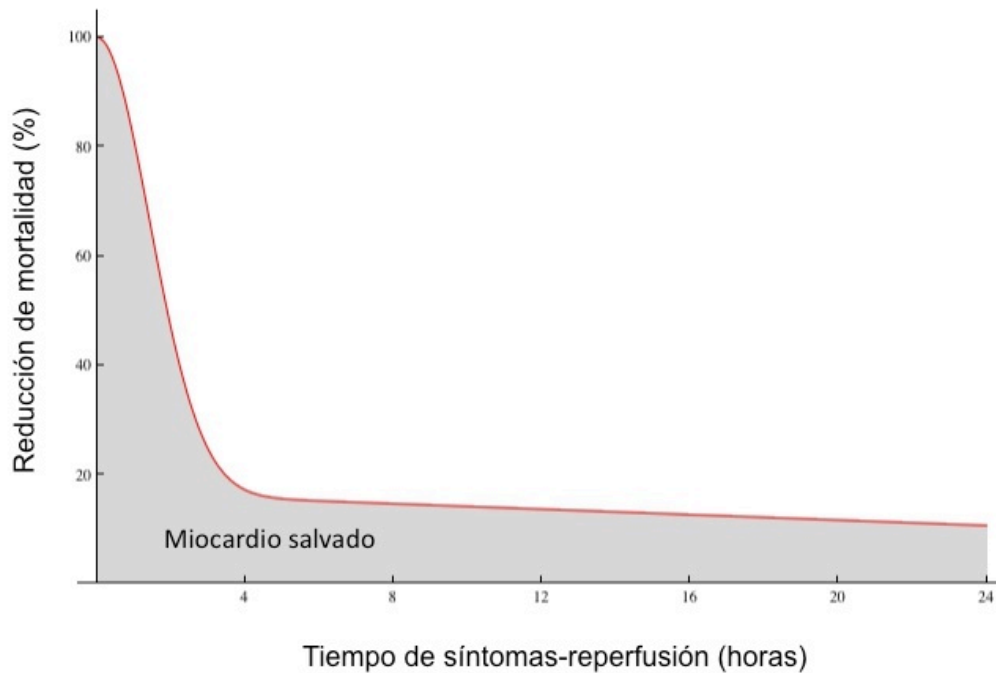
Así pues, hay que valorar con precaución los resultados del estudio COMMIT,

puesto que no puede descartarse que el metoprolol produjera un resultado positivo si los criterios de inclusión hubiesen sido más estrictos y uniformes.

En conjunto, los datos previos sugieren que la administración precoz de  $\beta$ -bloqueantes en el IAMEST en aquellos pacientes sin contraindicaciones podría tener un beneficio clínico. Este beneficio podría ser secundario a una reducción del tamaño del infarto, si bien esto último no ha sido demostrado .

### **1.3 MIOCARDIO EN RIESGO Y MIOCARDIO SALVADO**

El área en riesgo en el contexto de un IAM se define como la parte de miocardio que está sufriendo isquemia y por tanto está en peligro de necrosarse durante la oclusión de una arteria coronaria. El análisis preciso del área en riesgo en un IAMEST es crucial para la evaluación del impacto de las terapias de reperfusión y de la determinación del miocardio salvado. La cuantificación del miocardio salvado se realiza mediante la obtención de la diferencia entre el tamaño del infarto y el área miocárdica en riesgo (todo miocardio en riesgo no necrosado se denomina miocardio salvado). El miocardio en riesgo puede ser cuantificado mediante diferentes técnicas de imagen cardíaca (angiografía, SPECT, RMC). El tamaño del infarto también puede cuantificarse de manera indirecta mediante la determinación de la liberación de enzimas de daño miocárdico o por cambios electrocardiográficos o de manera directa mediante histología en especímenes ex-vivo. Existe una clara relación entre la cantidad de miocardio que se consigue salvar con las terapias de reperfusión y el beneficio en mortalidad atribuido a las mismas, que principalmente depende de la rapidez de instauración del tratamiento (Figura 1).



*Figura 1- Relación entre el tiempo de inicio de los síntomas hasta la reperfusión, el miocardio salvado y la reducción de la mortalidad por infarto agudo de miocardio. Se observa que la reperfusión después de las 4 horas consigue salvar un porcentaje relativamente pequeño de miocardio y no muestra un claro beneficio en mortalidad. Modificado de Gersh et al.<sup>27</sup>*

El método más utilizado hasta el momento para el estudio de la área en riesgo, y el índice de miocardio salvado es el SPECT<sup>28, 29</sup>. Se inyecta un trazador tecnecio antes de la reperfusión, y el escáner se realiza hasta las 6h después. Se repite una gammagrafía de perfusión en reposo en las semanas posteriores a la reperfusión, para estimar el tamaño final del infarto. Una comparación de la zona con el defecto de perfusión inicial con el defecto posterior permite estimar el miocardio salvado. Aunque el SPECT es un método aceptado y utilizado, la exposición a la radiación, su baja resolución espacial y la dificultad logística de inyectar un trazador antes de la reperfusión

hace que se busquen otros nuevos métodos para estudiar el área en riesgo y el tamaño del infarto para evaluar la eficacia de las terapias de reperfusión. Además, dada su baja resolución espacial, diferencias no muy grandes en cuanto a reducción de tamaño de infarto entre dos tipos de intervención pueden pasar inadvertidas.

En la era de la reperfusión percutánea mediante angioplastia primaria se han propuesto baremos angiográficos para cuantificar el área miocárdica en riesgo, como el Bypass Angioplasty Revascularization Investigation (BARI) y el Alberta Provincial Project for Outcome Assessment in Coronary Heart Disease (APPROACH) <sup>30, 31</sup>. Estos baremos se basan en la distribución, longitud y en el calibre de los vasos coronarios. Ortiz-Pérez *et al.* encontraron una excelente correlación entre los dos baremos, BARI y APPROACH y el tamaño del infarto en un subgrupo de pacientes con infartos casi transmurales, sugiriendo que estas técnicas pueden ser útiles para medir indirectamente el área en riesgo <sup>32</sup>.

En estos últimos años, la RMC se ha propuesto como un método útil para el estudio del área en riesgo, del miocardio infartado, y en consecuencia del miocardio salvado.

#### **1.4 PAPEL DE LA RESONANCIA MAGNÉTICA CARDÍACA EN EL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO .**

Después de un IAM, tanto la fracción de eyección del VI (FEVI) como el volumen telesistólico del VI (VTDVI) han mostrado de manera constante un notable valor predictivo respecto a los eventos cardiovasculares adversos (incluida la mortalidad por todas las causas) <sup>33</sup>. Sin embargo, la cuantificación



de la FEVI y de los volúmenes del VI en una fase temprana (< 1 mes) después de un IAM es un instrumento poco específico para evaluar la extensión de la lesión miocárdica irreversible. Con el desarrollo de nuevas tecnologías no invasivas como la RMC es posible detectar y analizar directamente in vivo el tamaño del infarto <sup>34</sup> así como el área en riesgo <sup>35</sup>.

La RMC con realce tardío (RMC-rt) con gadolinio es una técnica precisa para evaluar con exactitud el tamaño del infarto de miocardio <sup>36</sup>, con una elevada reproducibilidad por lo que respecta a la cuantificación del tejido necrótico <sup>37</sup>

Muchos estudios avalan la precisión de la RMC-rt en la detección y cuantificación del tamaño del IAM en fase aguda y crónica en comparación con un método establecido como la tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT) <sup>38-40</sup>. La principal ventaja de la RMC-rt en comparación con las técnicas de medicina nuclear es su mayor resolución espacial permitiendo alcanzar mayor sensibilidad en la detección del infarto <sup>39</sup>. Además, la RMC-rt tiene una reproducibilidad superior a la de la SPECT en la cuantificación del tamaño del infarto, lo cual permite reducir el tamaño muestral de los ensayos <sup>36</sup>. Por otra parte, la RMC-rt no requiere una radiación añadida para el paciente (sobretudo actualmente en que el paciente ya ha recibido la radiación propia del cateterismo en la gran mayoría de los casos).

Por último, recientemente se ha demostrado en estudios prospectivos que la extensión de la necrosis cuantificada mediante RMC-rt es un factor predictivo de eventos cardiovasculares más potente que la FEVI o que el VTDVI <sup>41, 42</sup>.

## 1.4.1 ASPECTOS TÉCNICOS: Secuencias de RMC en el protocolo IAM

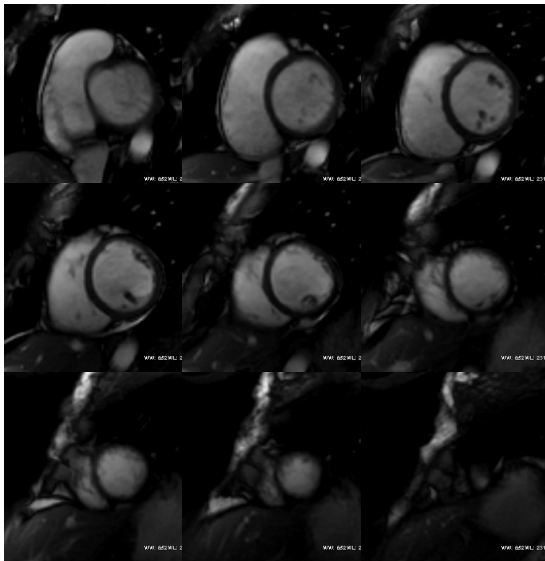
### 1.4.1.1 Secuencia de cine para la función ventricular izquierda

La RMC es considerada el método de referencia para el estudio no invasivo de los volúmenes y la masa ventricular<sup>37, 43</sup>. Las secuencias de precesión libre en estado estacionario (en inglés, *SSFP*) son actualmente las secuencias de elección por su corto tiempo de adquisición, su buena reproducibilidad y su buen contraste sangre-endocardio, que permiten delimitar el borde endocárdico y epicárdico con una definición excelente<sup>44, 45</sup> (Figura 2). La sincronización con el electrocardiograma (ECG) posibilita la obtención de imágenes cardíacas en momentos concretos del ciclo.

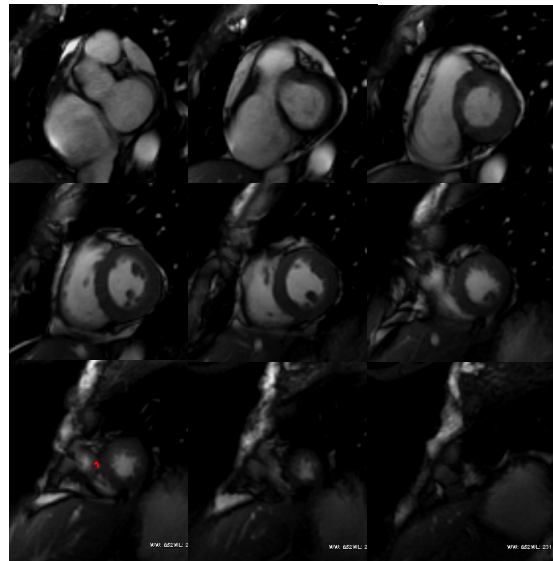
Para el estudio de los volúmenes ventriculares se realizan múltiples cortes en eje corto consecutivos desde la base del ventrículo izquierdo hasta el ápex usando la secuencia de cine *SSFP* con una sincronización retrospectiva del ECG. Usando una estación de trabajo (según vendedor) se pueden cuantificar los volúmenes telediastólicos (VTDVI) y los volúmenes telesistólicos del ventrículo izquierdo (VTSVI), así como la masa ventricular. Con este método no se hacen asunciones geométricas y puede utilizarse en presencia de alteraciones de la contractilidad segmentaria. La reproducibilidad de este método es excelente comparando con otras técnicas<sup>46, 47</sup>, lo que permite reducir el número de sujetos de estudio necesario para demostrar el efecto de una intervención. Como ejemplo, la detección de un cambio del 3% en la FEVI (con un poder estadístico del 90%,  $p=0,05$ ) requeriría una muestra de 87 pacientes usando ecocardiografía, pero sólo 11 pacientes utilizando la RMC.

Debido también a la alta reproducibilidad en el cálculo de los volúmenes y masa del VI por RMC , esta técnica permite evaluar cambios evolutivos en la historia natural de la enfermedad o debido a la respuesta a distintos tratamientos <sup>48, 49</sup>

A



B



*Figura 2 - Secuencia de cine con cortes consecutivos del ventrículo izquierdo, panel A en telediástole y panel B en telesístole.*

#### **1.4.1.2 Secuencia de realce tardío para determinar el tamaño del infarto**

La visualización del miocardio infartado con RMC-rt se basa en la utilización de una secuencia de adquisición específica, siendo la más estandarizada, una secuencia eco-gradiente con pulso de inversión-recuperación potenciada en T1, tras la administración de gadolinio <sup>50</sup>. Como resultado, la región infartada muestra una intensidad de señal mayor (hiperintensidad) que el miocardio normal después de 5-30 minutos de la administración de gadolinio ( fenómeno conocido como realce tardío, rt) (Figura 3).



*Figura 3- Ejemplo de una imagen de IAM con la secuencia de realce tardío. Se observa un realce transmural, hiperintenso en blanco (flecha) y un miocardio normal (negro) en el VI.*

### **Cinética del contraste con gadolinio**

Para la realización de la técnica de realce tardío se utiliza gadolinio quelado a ácido dietileno-triaminopentaacético (Gd-DTPA)<sup>51</sup>. Los compuestos quelantes de gadolinio presentan una rápida difusión hacia el exterior de los capilares, alcanzado el tejido, pero no pueden atravesar las membranas celulares intactas. Su vida media en sangre periférica es de unos 20 minutos. Por eso, tras un bolo i.v. se observa una acumulación pasiva del Gd-DTPA, tanto en el miocardio normal como en el patológico. En la fase aguda del infarto, los miocitos presentan una rotura de la membrana plasmática y se altera la cinética del gadolinio al aumentar el volumen de distribución y disminuir la tasa de aclaramiento tisular del mismo, mostrando una cantidad ligeramente mayor de Gd-DTPA por unidad de volumen<sup>52</sup>. En cambio en la fase crónica del infarto,

el acúmulo de quelantes de gadolinio se debe probablemente al aumento de la extensión de la matriz extracelular por unidad de masa de miocardio (Figura 4).

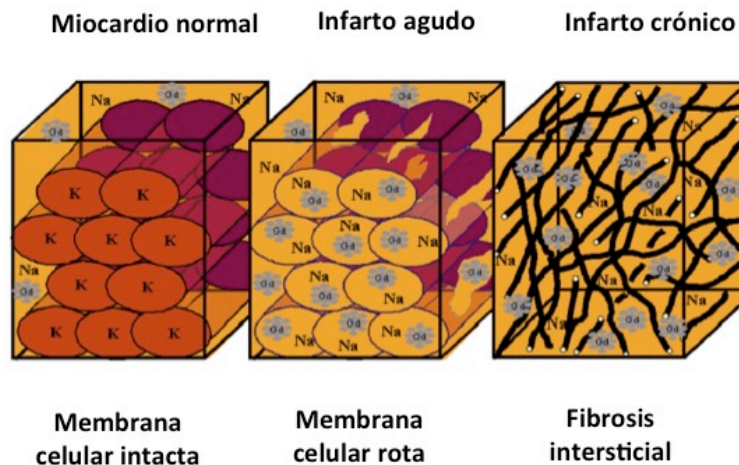


Figura 4. En un miocardio normal el gadolinio se distribuye en el espacio extracelular, mientras que en el IAM hay un aumento de su volumen de distribución a expensas de su difusión al espacio intracelular. En el estado crónico del IAM el volumen de distribución del gadolinio aumenta a expensas del incremento de la matriz extracelular. Modificado de<sup>53</sup>

Una vez se ha administrado un contraste quelante de gadolinio con una dosis de 0.1-0,2 mmol/kg<sup>54</sup> se adquiere la secuencia de realce tardío previamente descrita. A destacar que estas secuencias son muy sensibles al tiempo de inversión elegido. Este tiempo es el que pasa desde la administración del impulso de radiofrecuencia hasta el inicio de la adquisición de la imagen. El operador selecciona visualmente el tiempo de inversión o TI, de manera que se elimina el miocardio de fondo normal, que no envía ningún tipo de señal y que aparece como una estructura negra. Las regiones con propiedades magnéticas

diferentes (T1) (lo que en el miocardio implica la presencia de concentraciones distintas de Gd) muestran una coloración blanca brillante con realce tardío de Gd, como le pasa al miocardio infartado.

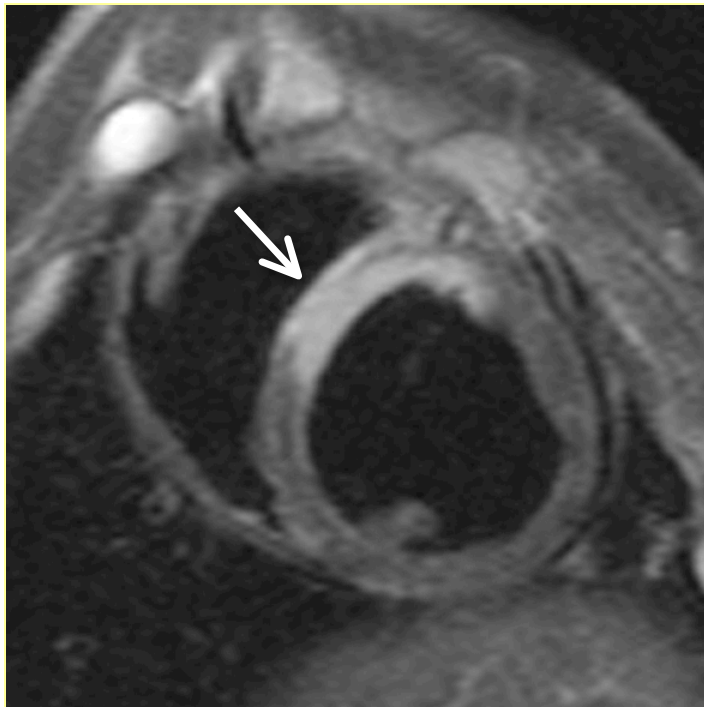
Actualmente muchos equipos disponen de una secuencia de adquisición rápida, *single-shot SSFP T1 scout*, donde se adquieren distintas imágenes usando diferentes TI en una sola apnea, para facilitar la elección del TI correcto

<sup>55</sup>.

En la práctica clínica, el análisis de la presencia y extensión del realce tardío normalmente es visual <sup>56</sup>. El método semicuantitativo más extendido es el que estima el porcentaje de espesor de la pared con realce en relación al espesor total del miocardio ventricular (0%, 1-25%, 26-50%, 51-75%, 75-100%). Por otra parte, se puede cuantificar la masa del infarto mediante planimetría manual, multiplicando este valor (área) por el grosor del corte y por 1.05 que representa la densidad del miocardio expresada en g/ml. Se han descrito distintos algoritmos para una cuantificación automática, pero no hay consenso claro de cual de ellos sería el más óptimo. En estos algoritmos se requiere trazar los márgenes epicárdicos y endocárdicos y determinar un umbral en la intensidad de señal que permita diferenciar lo que es miocardio infartado (hiperintenso) del normal (negro). Clásicamente se considera tejido infartado el tejido que muestra una intensidad de señal superior a 3 desviaciones estándar respecto a la intensidad del miocardio sano <sup>57, 58</sup>. Otros grupos como el de Amado y col. <sup>59</sup> han utilizado como intensidad de señal superior al 50% del rango máximo existente en la imagen con buenos resultados en comparación con la histología y con una variabilidad menor que la descrita para la planimetría manual <sup>60</sup>.

### 1.4.1.3 Secuencia de edema para el estudio del área en riesgo

La isquémica miocárdica que se produce con la oclusión de una arteria coronaria conlleva inflamación y edema en el territorio miocárdico dependiente de dicha arteria <sup>61</sup>. A la vez, este edema produce cambios en las propiedades magnéticas del miocardio <sup>62</sup>. Usando secuencias potenciadas en T2, la RMC puede detectar edema desde las 24 horas post IAM hasta algunos meses después del episodio agudo <sup>63</sup>. Con estas secuencias el área edematosa se ve como una hiperintensidad de señal (Figura 5). Se ha demostrado que la extensión de esta área hiperintensa en las imágenes de edema sobrestima el tamaño del IAM comparado con histología y, en cambio, se correlaciona bien con la “área en riesgo” <sup>35, 64</sup>. Además esta secuencia ha demostrado ser útil para diferenciar un IAM agudo versus uno crónico <sup>65</sup>.



*Figura 5. Imagen de un corte en eje corte con la secuencia de edema donde éste se visualiza como una hiperintensidad de señal (blanco, flecha) y el miocardio normal es isointenso (gris)*

Por todo lo descrito anteriormente, la RMC es la técnica ideal para evaluar las capacidades cardioprotectoras de cualquier intervención. Es por ello que es la técnica que elegimos para resolver las cuestiones presentadas en esta tesis doctoral.

## **1.5 DAÑO POR REPERFUSIÓN**

Está totalmente establecido que el objetivo primordial en el tratamiento del infarto agudo de miocardio es reducir el tiempo de isquemia (tiempo a la reperfusión) ya que es el determinante mayor para salvar el miocardio y en consecuencia, el mayor determinante del tamaño final del IAMEST.

Paradójicamente, el proceso de restaurar el flujo en la zona isquémica puede inducir un daño adicional en el miocardio (el llamado daño por reperfusión), reduciendo los efectos beneficiosos de la reperfusión, fenómeno ya descrito en 1960 por Jennings y colaboradores <sup>66</sup>. Esta forma de daño, que en sí mismo puede inducir la muerte de los cardiomiocitos y aumentar el área de infarto puede explicar, en parte, porque, aún con una reperfusión óptima, la incidencia de muerte y insuficiencia cardíaca después de un infarto persiste alta <sup>67</sup>.

Durante la reperfusión se produce una reinstauración del flujo sanguíneo. Esto produce enormes cantidades de oxígeno, las cuales inducen en la cadena mitocondrial una sobreproducción de oxígeno y, en consecuencia, un importante estrés oxidativo<sup>68</sup>. Se ha visto que el estrés oxidativo, por un lado, promueve la adhesión de leucocitos al endotelio dañado y, por otro, disminuye la biodisponibilidad de óxido nítrico, que es un potente vasodilatador. Este proceso favorece el fenómeno de no reflujo, que a su vez empeora o perpetúa



la isquemia.

Por otra parte, esta biodisponibilidad de oxígeno reactiva la cadena mitocondrial para la producción de energía, produciéndose un aumento de ATP. Este aumento, no solo favorece la captación de calcio por parte del retículo sarcoplasmático sino que también lo libera en el espacio intracelular. Este aumento del calcio intracelular, activa proteasas y fosfolipasas que acaban rompiendo la membrana que recubre los miocardiocitos, acelerando el proceso de necrosis, que es el que se inicia durante la isquemia <sup>69</sup>. La reperfusión no sólo produce muerte celular por necrosis. En los últimos años se ha visto que, por otra parte, lo que produce es una normalización del pH, que junto con las especies reactivas de oxígeno abren el poro de transición mitocondrial (*mPTP*) <sup>70</sup>. Este poro de transición mitocondrial juega un papel clave no sólo favoreciendo la ruptura de la membrana, sino permitiendo la liberación de proteínas pro-apoptóticas por parte de la mitocondria, como el citocromo c, produciendo una activación de las caspasas (caspasa-3 y 8) y la consiguiente muerte intracelular por apoptosis (Figura 6).

Además, la reperfusión favorece la muerte celular por apoptosis por una vía p53 dependiente que podría intervenir a nivel mitocondrial o a través de p21 produciendo una muerte independiente por caspasas. A nivel histológico, mediante el análisis con microscopía confocal, se ha podido observar que realmente todo ello conlleva una marcada muerte celular por apoptosis tras la reperfusión del corazón isquémico.

Además, el corazón es particularmente sensible a la isquemia seguida de la reperfusión (I/R). La reacción inflamatoria local que sigue la reperfusión

involucra citoquinas como el factor nuclear  $\alpha$ -TNF, así como la infiltración de neutrófilos y un aumento de la actividad de la mieloperoxidasa (MPO).

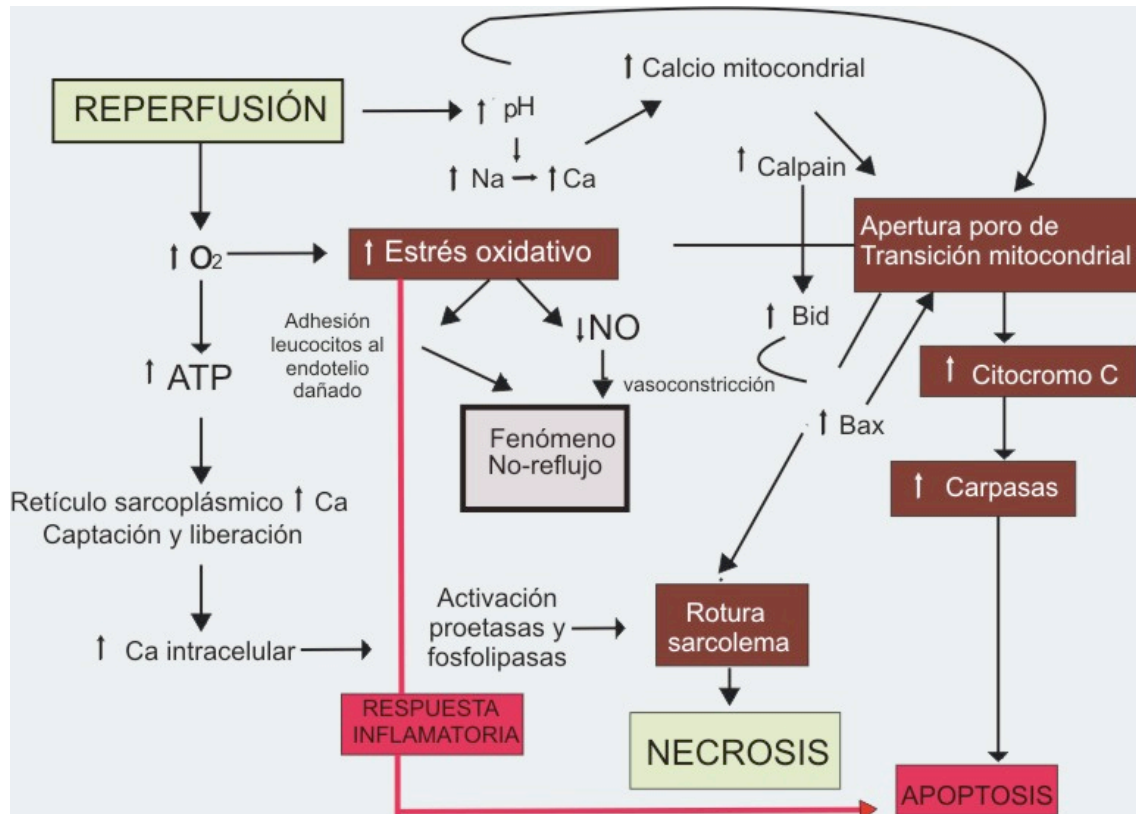


Figura 6. Esquema de la reperfusión miocárdica. Modificado de comunicación personal de Vilahur G. en MedicinaCardiovascular2010

Pero en el proceso de la reperfusión también se activan vías cardioprotectoras. Cabe destacar el “mecanismo programado de defensa”, la llamada vía RISK (*reperfusion injury salvage kinase*), que es el término dado a un grupo de proteínas quinasas de supervivencia (incluyendo la Akt y Erk1/2), que confieren una cardioprotección cuando son específicamente activadas durante la reperfusión. Estudios preclínicos han demostrado que un número creciente de ligandos como la adenosina, insulina, eritropoyetina, etc, cuando son administrados específicamente durante la reperfusión reducen el tamaño del

infarto activando la vía RISK<sup>71, 72</sup>. Brevemente, la activación (por fosforilación) de la PI3K/Akt produce la activación de una familia de quinasas que bloquean la apertura del *mPTP*, bloqueando finalmente el proceso de apoptosis<sup>73, 74</sup>.

El potencial efecto cardioprotector de los betabloqueantes es probablemente multifactorial. Además de su efecto antiisquémico al reducir la demanda miocárdica por sus efectos cronotrope e inotropo negativos, los betabloqueantes podrían ejercer un efecto beneficioso limitando el daño por reperfusión. En este sentido, estudios recientes sugieren que el metoprolol puede bloquear la migración de neutrófilos *in vitro*<sup>75</sup> e *in vivo*<sup>76</sup> y que además puede presentar propiedades antiapoptóticas en distintas condiciones como la insuficiencia cardíaca<sup>77</sup>.

## **1.6 MODELOS ANIMALES DE EXPERIMENTACION**

El sistema cardiovascular porcino muestra similitud con la anatomía y fisiología cardíaca humana. Dada esta similitud el modelo porcino de infarto agudo de miocardio se ha utilizado extensamente por distintos grupos<sup>78</sup>, incluyendo el nuestro<sup>79</sup>, para entender la patofisiología de la aterotrombosis, para la isquemia aguda y crónica. Otras particularidades del corazón del cerdo lo hacen apropiado para los estudios de isquemia-reperfusión. Primero la distribución de las arterias coronarias se similar a la de los humanos. Segundo, el cerdo tiene una red de vasos colaterales poco desarrollada y una pobre capacidad de reclutar nuevas colaterales durante el evento isquémico agudo, una característica similar al corazón humano que no tiene enfermedad coronaria crónica, contrastando con otros animales grandes como el conejo o el perro. Además, el tamaño del cerdo (y su corazón) permiten estudiar la

efectividad de diferentes protocolos cardioprotectores en corazones parecidos en tamaño a los humanos, usando los mismos protocolos y dispositivos. Por lo tanto, los resultados obtenidos se pueden trasladar y aplicar directamente en la práctica clínica en humanos.

En resumen, , el tamaño final del infarto es un predictor importante de eventos clínicos posteriores. Aunque el tiempo de isquemia se ha mostrado como el mayor determinante para aumentar el miocardio salvado, hay interés en buscar otras terapias que ayuden a reducir el tamaño del infarto (cardioprotección) y que limiten el daño por reperfusión. Los betabloqueantes han demostrado eficacia clínica cuando se administran en las primeras hora del infarto, y así queda reflejado en las guías como indicación de clase IA pero hay controversia de cuando y como administrarlos. Por lo tanto, el presente proyecto se centrará en analizar si la administración endovenosa de metoprolol antes de la reperfusión se traduce en un efecto cardioprotector (en terminos de reducción del tamaño del infarto) , y en evaluar los potenciales mecanismos a través de los que ejerce este efecto beneficioso, como podría ser la reducción del daño por reperfusión.



## **HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**



## 2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

La hipótesis de trabajo de la presente tesis doctoral es que el  $\beta$ -bloqueante (metoprolol) i.v. administrado precozmente en la fase aguda del infarto de miocardio (durante el periodo de isquemia coronaria antes de la reperfusión) puede aumentar la extensión del miocardio salvado, mediado al menos por una reducción del daño por reperfusión.

De acuerdo con ella, los objetivos de este trabajo se desglosan en:

**Objetivo 1:** Analizar el efecto sobre la extensión de necrosis miocárdica de la administración temprana de  $\beta$ -bloqueante (metoprolol) i.v. sobre el miocardio en riesgo en un modelo porcino de infarto agudo de miocardio mediante RMC.

**Objetivo 2:** Comparar la extensión de miocardio salvado asociado a dos estrategias distintas de administración de metoprolol (estrategia precoz: inicio i.v. pre-reperfusión, o estrategia diferida: vía oral post-reperfusión).

**Objetivo 3:** Estudiar el efecto de las dos estrategias de administración de metoprolol en relación a marcadores del daño por reperfusión.





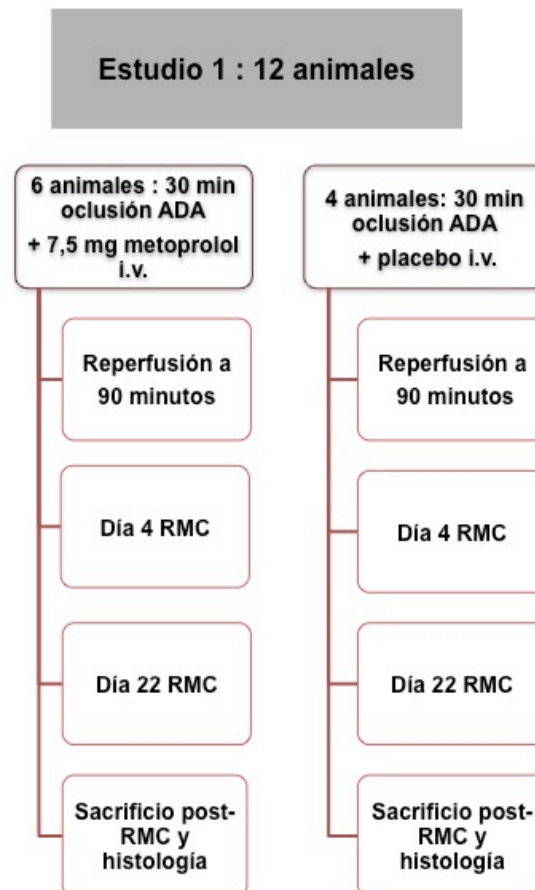
## **MATERIAL Y MÉTODOS**



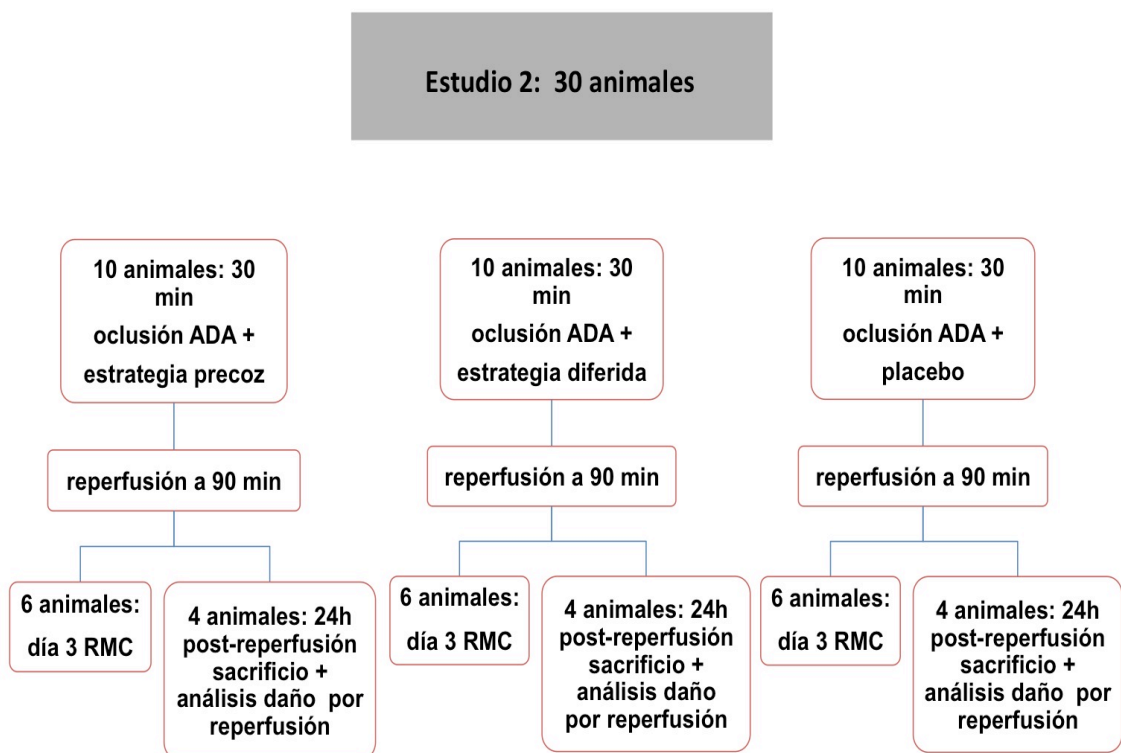
### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

Este proyecto de tesis se subdividió en 2 estudios:

1.- ESTUDIO 1: En un modelo porcino de infarto de miocardio en 12 animales se aleatorizó a metoprolol i.v. durante la oclusión coronaria o placebo. Se analizó la función global del VI, la extensión del miocardio en riesgo y la necrosis miocárdica a los 4 y 22 días mediante RMC. La figura 7 muestra un esquema resumido del protocolo seguido



2.- ESTUDIO 2: En un segundo tiempo, con el mismo modelo animal de infarto agudo de miocardio se aleatorizó una muestra de 30 cerdos a metoprolol i.v. pre-reperusión (estrategia precoz), post-reperusión vía oral (estrategia diferida) o placebo. Se analizó la función global del VI, la extensión del miocardio en riesgo y la necrosis miocárdica a los 3 días. En este estudio se analizaron también marcadores implicados en el daño por reperusión. La figura 8 muestra un esquema del protocolo realizado.



### **3.1 MODELO EXPERIMENTAL:**

#### **3.1.1 Animales de experimentación**

Se utilizaron cerdos Yorkshire-Albino de 4 a 6 meses de edad de entre 28-35 kg. Desde su llegada fueron estabulados y cuidados en el Center of Comparative Medicine and Surgery (CCMS) New York USA, donde recibieron seguimiento veterinario diario y para evitar el potencial sesgo por estrés de recolocación no se les realizó ningún procedimiento en los 7 primeros días a su llegada. Todos los procedimientos se realizaron según las directrices de la *Association for Assesment & Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC)*.

#### **3.1.2 Modelo porcino de infarto agudo de miocardio**

Los infartos de miocardio en los animales de experimentación se realizaron según el siguiente protocolo:

La mañana del procedimiento el animal recibió buprenorfina (0.03mg/kg) y cefazolona (25 mg/kg) como profilaxis del dolor y de la infección de la herida respectivamente. Esta medicación se repitió después cada 12 horas por 5 días.

La anestesia en el animal se indujo con una inyección intramuscular de ketamina (30 mg/kg), xylazina (2.2 mg/kg) y atropina (0.05 mg/kg). Los animales fueron intubados y la anestesia mantenida con inhalación de isoflurano. Se monitorizó continuamente el ritmo cardíaco, una oximetría arterial y la presión arterial central durante el procedimiento.

Se administró al comienzo del procedimiento perfusión continua de amiodarona en todos los cerdos para la profilaxis de las arritmias ventriculares malignas.

Se realizó una oclusión mediante angioplastia sobre la DA media en todos los

cerdos. Después de colocar el introductor en la ingle el animal fue heparinizado (100 IU/Kg i.v.) y se colocó una guía y un catéter de angioplastia de 6F en el tronco común. Después de la inyección de nitroglicerina (0,2 mg) se inyectó contraste y por escopia se midió el diámetro de la arteria coronaria descendente anterior. La guía coronaria se colocó en la arteria descendente anterior (ADA) distal y se colocó un catéter de angioplastia (balón) a nivel de la ADA media inmediatamente después del origen de la rama primera diagonal. Se infló el balón y se realizó otra inyección de contraste para comprobar que no había contraste por debajo del mismo (signo de oclusión total de la arteria) y que además la primera diagonal tenía contraste (permeable). La oclusión fue distal a este punto (Figura 9).

Si durante el procedimiento aparecían extrasístoles ventriculares frecuentes, o taquicardia ventricular (sostenida o no) se administraba un bolus de 20 mg de lidocaína. Si aparecía fibrilación ventricular o taquicardia ventricular sin pulso se trataba con desfibrilaciones externas y medidas de reanimación cardiopulmonar básicas.

Después de noventa minutos de oclusión de la ADA, el balón de angioplastia fue retirado, y después de una nueva inyección de nitroglicerina se comprobó la permeabilidad de la arteria DA. Los animales después fueron seguidos y controlados por los veterinarios

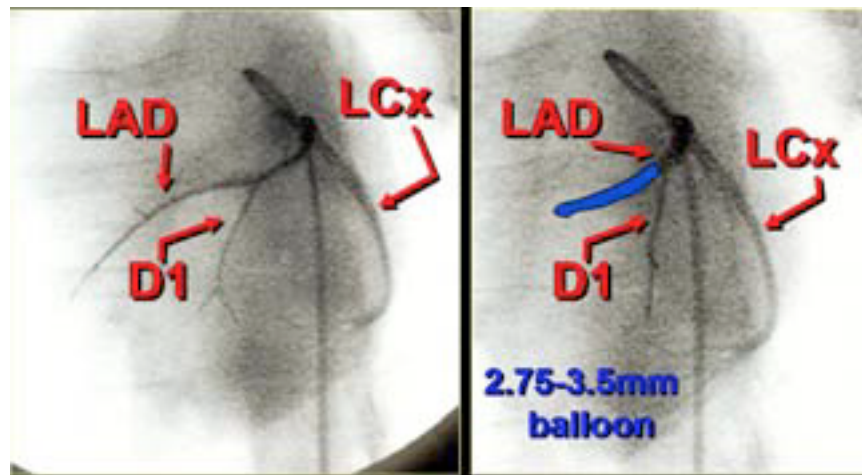


Figura 9- Proyección lateral antes (izquierda) y después (derecha) dilatación del balón inmediatamente después del origen de la primera diagonal. (LAD- Arteria descendente anterior, LCX- arteria circunfleja, D1 – arteria primera diagonal)

#### Aleatorización estudio 1

Antes del inicio del protocolo se aleatorizó a los animales a una de las dos estrategias de intervención: metoprolol o placebo. El metoprolol o placebo se administró en jeringas iguales sin marcar por investigadores ciegos a la aleatorización. Treinta minutos después de la oclusión de la ADA, los animales recibieron: placebo o metoprolol 7,5 mg: tres inyecciones de 2.5 mg cada 3 minutos a través de la vía intravenosa. Estas dosis equivalen ajustadas por peso a las usadas previamente en estudios animales y en estudios humanos<sup>22</sup>

#### Aleatorización estudio 2

Antes del inicio del protocolo se aleatorizó a los animales a una de los tres brazos de tratamiento. El metoprolol o placebo se administró en jeringas iguales sin marcar por investigadores ciegos a la aleatorización. Treinta minutos después de la oclusión de la ADA se realizó la estrategia precoz administrando 7.5 mg de metoprolol i.v.(3 bolus de 2.5 mg de metoprolol



tartrato cada 3–5 minutos), la estrategia diferida (administrando placebo i.v.) y placebo i.v.. Los animales aleatorizados a estrategia precoz y diferida recibieron 50 mg de metoprolol oral cada 12h hasta terminar el estudio, empezando 4 horas después de la reperfusión. Los animales aleatorizados a placebo no recibieron metoprolol en ningún momento del estudio. La Tabla 1 resume los tratamientos administrados a cada grupo de tratamiento.

**Tabla 1- Aleatorización y tratamiento de los animales del estudio 2.**

	<b>30 min. isquemia (60´ antes de reperfusión)</b>	<b>&gt; 4 horas</b>
Grupo estrategia precoz	Metoprolol 7.5 mg i.v.	50mg/12h vo
Grupo estrategia diferida	Placebo (salino)	50 mg/12h vo
Grupo placebo	Placebo (salino)	No tratamiento

vo- vía oral

### **3.2 RESONANCIA MAGNETICA CARDIACA: PROTOCOLOS**

Los animales fueron estudiados a los 4 y 22 días con RMC. Para la realización de estos estudios los animales fueron anestesiados con una inyección intramuscular de ketamina, xylacina y atropina. Se intubaron y se mantuvieron con ventilación mecánica (equipo RMC compatible) con una perfusión de propofol (100mg en 1000ml de suero fisiológico a 250 ml/h) para la anestesia.

Los estudios de RMC se realizaron en un imán de 1.5 T (Magnetom Sonata®, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany) usando una bobina de superficie sincronizada con el electrocardiograma y en apnea.

Primero se registraron imágenes contiguas en eje corto cubriendo todo el ventrículo izquierdo, desde la base hasta el ápex usando una secuencia cine estándar de precesión en estado estacionario (SSFP del inglés *Steady State*

*Free Precession* ). (Tabla 2)

**Tabla 2– Parámetros técnicos de la secuencia de cine (SSFP).**

TR	TE	ángulo giro	FOV mm	matriz	grosor corte	bandwidth	líneas
3.5 ms	1.5ms	60-90°	200x150	192x115	6 mm	930 Hz/px	11/ segmento

Después, obtuvimos las imágenes para evaluar el edema miocárdico con una secuencia potenciada en T2, triple inversión recuperación turbo spin-eco. (Tabla 3)

**Tabla 3- Parámetros técnicos utilizados para la secuencia de edema (T2).**

TR	TE	TI	FOV mm	matriz	grosor corte	bandwidth	Tren ecos
2-3 lat.	65 ms	100 ms	300x225	256x125	6 mm	349 Hz/px	17

Finalmente, la secuencia de realce tardío para detectar el infarto se realizó 15 minutos después de la administración de 0,2 mmol/kg gadolinio (gadopentate Dimeglumine, Magnevist) usando una secuencia estándar de inversión recuperación de eco gradiente rápida. (Tabla 4)

**Tabla 4- Parámetros técnicos utilizados para la secuencia de realce tardío.**

TR	TE	TI	FOV mm	matriz	grosor corte	bandwidth	líneas
8 ms	4ms	Optimizado	300x225	144x115	6 mm	160 Hz/px	23/ segmento

La posición de las imágenes de la secuencia de edema y de la de realce tardío era la misma que la de la secuencia de cine para permitir una mejor comparación. Es decir, se adquirieron imágenes consecutivas del eje corto del VI cubriendo desde su base hasta el ápex.

### 3.3 ANALISIS DE DATOS DE LA RMC

#### 3.3.1 Análisis de los volúmenes ventriculares y la fracción de eyección

El análisis de la función ventricular izquierda fue realizado un software específico (Argus©, Siemens Medical Solutions) donde trazando los contornos endo- y epicárdico se obtiene el VTDVI, el VTSVI y la FEVI. Se dividió cada eje corto en 6 segmentos equiangulares usando el punto de inserción del septum anterior en el ventrículo derecho como referencia. Para cada segmento, se calculó con este mismo software el porcentaje del engrosamiento sistólico.(Figura 10 y 11)

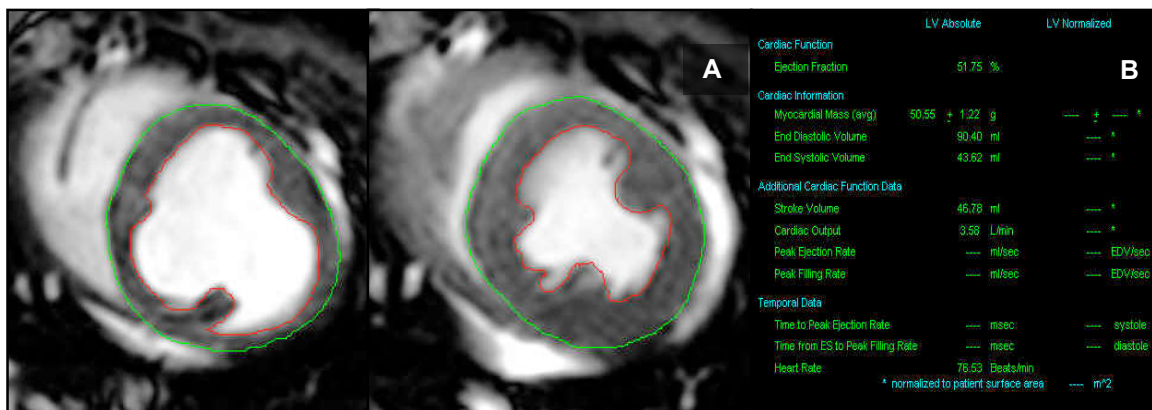


Figura 10: Contornos telediastólico y telesistólico trazados en un eje corto (A) para cuantificación de los volúmenes ventriculares izquierdos y parámetros funcionales (B)

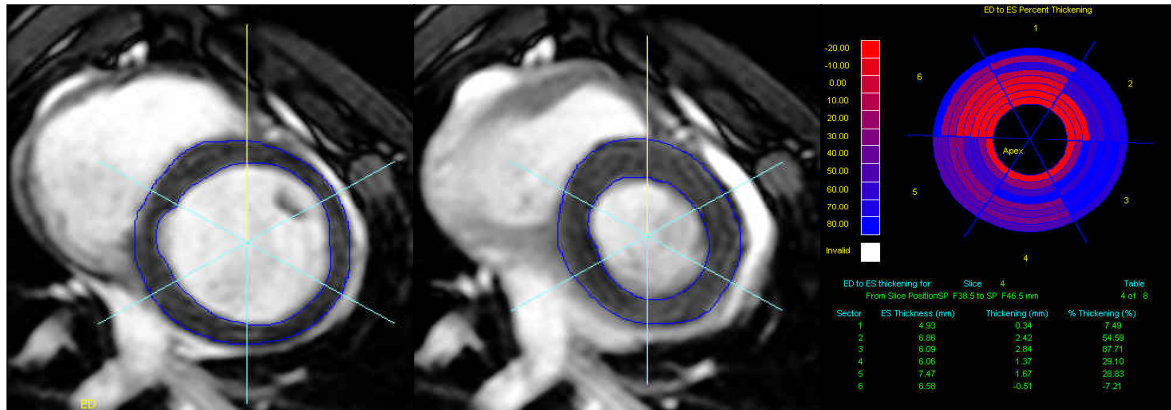


Figura 11: Ejemplo de segmentación y trazado de contornos en eje corto de un cerdo con un infarto agudo (izquierda). La imagen de ojo de buey (derecha) muestra el engrosamiento sistólico, mostrando disminución del mismo en los segmentos anteroapicales

### 3.3.2 Análisis de la área edematosa y de la área necrótica

La extensión del miocardio edematoso y necrosado de cada imagen fue cuantificado con un software prototipo (VPT©, Siemens Corporate Research, New Jersey) <sup>58</sup>. Para ello se trazaron manualmente los contornos endo y epicárdicos del ventrículo izquierdo, y después se dibujó una región de interés amplia en el segmento de miocardio normal. Las áreas anormales por cada secuencia, definidas como aquellas regiones que mostraron una intensidad de señal 3 desviaciones estándar (DS) por encima de la intensidad de señal media del miocardio normal <sup>57</sup> se colorearon y se cuantificaron automáticamente. La necrosis miocárdica (infarto) fue definida como la extensión de realce tardío anormal. El área de miocardio en riesgo fue definida como la extensión de edema (hiperintensidad en las imágenes potenciadas en T2) en la primera RMN, día 4 <sup>80</sup>.

### 3.3.3 Estimación del miocardio salvado

El miocardio salvado fue definido como la diferencia entre el miocardio en

riesgo y la necrosis miocárdica. Todas las medidas fueron expresadas como porcentaje del volumen total del ventrículo izquierdo (Figura 12). El tamaño absoluto del infarto determinado como masa del infarto fue cuantificado en gramos (calculado como volumen multiplicado por la densidad miocárdica (1,05 g/cm<sup>3</sup>).

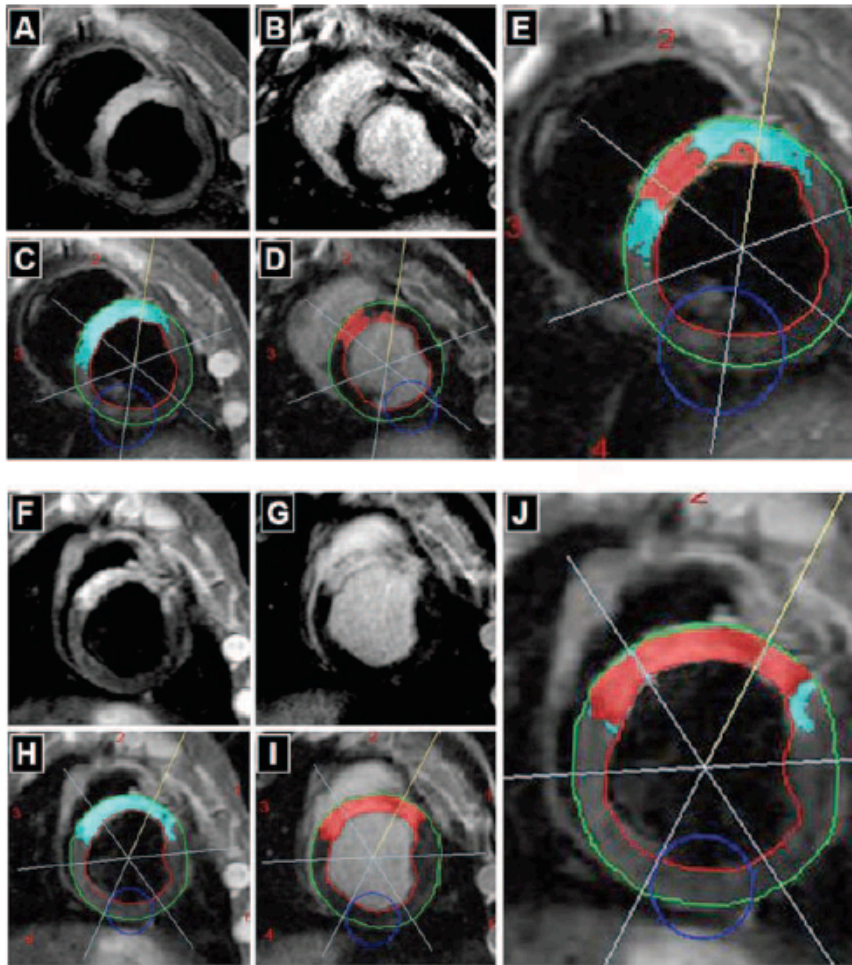


Figura 12: Imágenes de RMC en eje corto obtenidas en el mismo nivel del VI a los 4 días en un animal tratado con metoprolol (de A a E) y en un animal que recibió placebo (de F a J). A y F son imágenes potenciadas en T2 donde la zona hiperintensa (blanca) indica la presencia de edema. B y G, son imágenes de realce tardío donde se detecta el infarto (blanca). C,D, H y I corresponden a A,B,F y G después de una cuantificación automática del edema (turquesa) y del área infartada (roja). Además se observa la región de interés (ROI azul) para cuantificar la intensidad de señal del miocardio normal y las líneas de segmentación (6 segmentos por corte) para el análisis regional. Tomado de Ibanez et al<sup>81</sup> con permiso del titular del copyright.

### **3.3.4 Índice de extensión transmural global y regional**

El índice de extensión de transmuralidad del IAM fue calculado en cada segmento como porcentaje del área total del segmento <sup>82</sup>. El índice de extensión transmural global fue calculado como la media de todos los índices de los segmentos positivos para realce tardío. Además, 3 cortes consecutivos en eje corto con edema y realce tardío fueron seleccionados en cada animal para el estudio segmentario (regional) del edema y la distribución del realce tardío.

### **3.3.5 Parámetros de calidad de la señal**

En las secuencias potenciadas en T2 y en las de realce tardío se midieron también parámetros de calidad de la señal:

Relación señal-ruido (*SNR*) del miocardio normal y el patológico (isquémico): se calculó como la media de la intensidad de señal en una región de interés dividido por la media del valor del ruido (obtenido de una región de interés en el aire).

Relación contraste-ruido (*CNR*) del miocardio normal versus el patológico : se calculó como la diferencia entre sus relaciones señal ruido.

## **3. 4– DETERMINACIONES EN TEJIDO**

### **3.4.1 Histología del tamaño del infarto**

Con el fin de comprobar una adecuada correlación de nuestras estimaciones del tamaño del infarto realizamos determinaciones histológicas. En el estudio 1 después de la RMC a los 22 días los animales fueron heparinizados (100 IU/kg) y eutanizados con fenobarbital (Sleepaway 75 mg/kg, Fort Dodge, Wyeth, Overland Park, Kan) y su corazón fue extraído y lavado con un tampón fosfato

salino (siglas en inglés PBS) para el estudio histopatológico. Los especímenes cardiacos fueron disecados (2 piezas de la zona infartada y 2 de la zona normal, no infartada) y fueron inmediatamente congelados en nitrógeno líquido y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta procesarlos. Para hacerlo, el corazón fue perfundido con un tampón fosfato salino frío durante 24 horas. Después, el corazón fue cortado perpendicularmente a su eje largo, reproduciendo el eje corto obtenido en la RMC, en cortes de 6 mm de grosor usando un cortador comercial. Los cortes fueron incubados durante 5-7 minutos en una solución a  $37^{\circ}\text{C}$  de 1% TTC (*trimethyl tetrazolium chloride*) y después sumergidos en una solución de paraformaldeido al 4% durante 12h para una mejor penetración del fijador en el tejido. Después de la fijación, se obtuvieron imágenes de alta resolución de todos los cortes y de las áreas de infarto (negativas para TTC) y de miocardio normal (TTC positivo) para cuantificarlas con el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Md) (Figura 13).

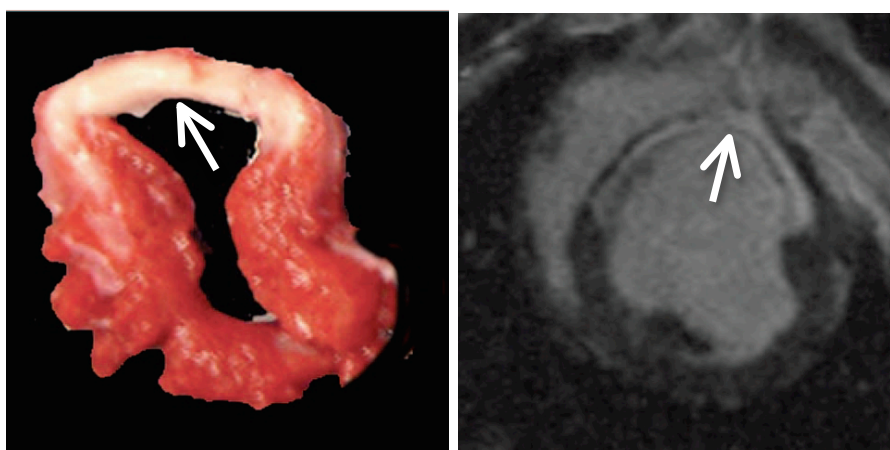


Figura 13: Imágenes de histología (izquierda) y del mismo nivel de RMC-rt (derecha) demostrando la correspondencia entre la zona infartada por histología (tinción TTC negativa; blanca) y la extensión de la zona infartada en la RMC-rt (blanca). Tomado de Ibanez et al <sup>81</sup> con permiso del titular del copyright.



### **3.4.2 . Estudio del daño por reperfusión**

En el estudio 2 , cuatro cerdos de cada uno de los 3 grupos se incluyeron para el estudio del daño por reperfusión. Veinticuatro horas después de la reperfusión, estos animales fueron heparinizados y eutanizados con fenobarbital. La DA fue reocluida (inmediatamente distal a la primera diagonal) y los corazones fueron retro perfundidos con azul de Evans. Pequeñas muestras de miocardio isquémico (negativo por azul de Evans) se cortaron y se lavaron con una solución tampón estéril e inmediatamente fueron congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta que fueron utilizadas para estudiar la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) y para la expresión de proteínas.

El daño por reperfusión se evaluó mediante tres procesos distintos:

#### **1) Análisis de la inflamación miocárdica**

La infiltración de neutrófilos de la zona isquémica fue determinada mediante una determinación colorimétrica semicuantitativa de la actividad mieloperoxidasa (MPO) usando un kit comercial (Myeloperoxidase Assay Kit, Cytostore, Calgary, Alberta, Canada). El tejido miocárdico congelado fue pulverizado y 50  $\mu\text{g}$  de tejido fue pesado y homogenizado en el tampón de muestra del kit. Después de añadir el reagente de desarrollo, se midió la absorbancia (a 450 nm) en intervalos de 1 min cada uno. Los resultados fueron expresados como unidades MPO por mg de tejido.

#### **(2) Apoptosis miocárdica**

Para estudiar la apoptosis analizamos la expresión de proteínas de la caspasa-3 activada mediante la técnica de Western Blot.

**3) Activación de la fosfoquinasa Akt**, proteína representante de la vía de



*Reperfusion Injury Salvage Kinasa* (RISK). Los niveles de la proteína fosfo-Akt, fueron estudiados también para comprobar el grado de activación de la vía RISK también utilizando la técnica de Western Blot

### **3.5-ANALISIS ESTADÍSTICO**

#### **3.5.1 . Estudio 1**

Las variables continuas se expresan como media y desviación estándar y se comparan mediante el test T de *Student* para datos apareados y no apareados. Se usó el coeficiente de Pearson para analizar la correlación de variables cuantitativas.

Los límites de concordancia entre el tamaño de infarto por RMC-rt y la histología fueron analizados por el método de Bland-Altman.

Se utilizaron dos modelos de regresión lineal para predecir cambios en la fracción de eyección global del ventrículo izquierdo y el engrosamiento sistólico segmentario. Las variables basales (día 4) que o bien tenían una relación plausible con la mejoría de la función o bien parecían estar asociadas a un incremento de la FEVI o del grosor sistólico, indicado con un valor de P: 0,02 en el análisis univariado, fueron usadas como variables en el análisis multivariado. Para la mejoría funcional global y regional, las variables independientes fueron la FEVI, el volumen del miocardio sano, el índice de transmuralidad global, la extensión del miocardio salvado (global) y el porcentaje del grosor sistólico en cada segmento, el volumen segmentario del miocardio sano, el índice de transmuralidad del IAM, y la extensión del miocardio salvado (regional). Un valor de P=0.05 (2 colas) fue considerado estadísticamente significativo.

### **3.5.2 . Estudio 2**

Las variables continuas se expresaron como media y desviación estándar. Las comparaciones estadísticas de medias se calcularon con ANOVA. Si aparecieron diferencias se aplicó el método de Tukey-Kramer para comparaciones de pares. Un valor de  $P = 0.05$  (2 colas) se consideró estadísticamente significativo.

Todos los análisis estadísticos de los dos estudios se realizaron con el paquete informático SPSS versión 11.0-15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).



## **RESULTADOS**



## 4. RESULTADOS

### 4.1-Estudio 1: Efecto cardioprotector del metoprolol en fase aguda de IAMEST

En los 12 animales se pudo realizar una oclusión de la arteria descendente anterior con éxito. Dos animales aleatorizados a placebo murieron durante el procedimiento por fibrilación ventricular refractaria a las maniobras de reanimación. Así pues se estudiaron un total de 10 cerdos (6 en el grupo del metoprolol y 4 en el grupo placebo).

De forma destacada, los dos grupos mostraron unas frecuencias cardiacas medias similares ( $66 \pm 2$  y  $65 \pm 3$  lpm para el grupo del metoprolol y placebo, respectivamente;  $P= NS$ ).

#### 4.1.1 Análisis de la RMC: efecto del metoprolol sobre el miocardio salvado y la función VI

Se pudo realizar la RMC en los 10 animales (6 del grupo metoprolol y 4 del grupo placebo. En el análisis de los parámetros de calidad de señal obtuvimos que en la secuencia potenciada en T2 para el edema, el SNR de la área edematosa fue  $9.94 \pm 0.5$  y  $3.77 \pm 1.7$  en el miocardio normal ( $p < 0.001$ ). Los valores correspondientes en la secuencia de RT fueron  $6.68 \pm 0.3$  para el miocardio infartado y  $1.57 \pm 0.1$  para el miocardio normal, respectivamente. El CNR entre las dos secuencias entre el miocardio normal y el patológico fue similar en las dos secuencias ( $6.17 \pm 0.5$  para secuencia potenciada T2,  $5.11 \pm 0.3$  para la secuencia de realce tardío:  $p=NS$ )

Los resultados de los parámetros derivados de la RMN en los días 4 y 22 post infarto agudo de miocardio se muestran en la Tabla 5.

En la RMC del día 4 no se observaron diferencias significativas en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) entre los dos grupos de estudio. Desde el día 4 al 22 la FEVI mejoró significativamente en el grupo del metoprolol ( $P=0.037$ ) y no se modificó en el grupo placebo (5.8 % versus - 0.1%;  $P=0.079$ ).

**Tabla 5- Parámetros derivados de la RMC**

	Metoprolol	Placebo	P
<b>Día 4 RMC</b>			
VTDVI, ml	96±6	123±12	0,6
VTSVI, ml	59±3	82±15	0.1
FEVI, %	37.2±3.3	35.1±5.7	0.7
Miocardio en riesgo*, % de VI con edema	30.9±1.9	30.6±1.0	0.6
Volumen de infarto, % de VI	20.9±1.6	28.7±2.3	0.02
Masa de infarto , g	12.7±0.7	21.9±2.3	0.002
Miocardio salvado † % del VI	10.0±2.3	1.9±1.2	0.028
Porcentaje miocardio salvado ‡	32.4±6.0	6.2±6.8	0.015
<b>Día 22 RMC</b>			
VTDVI, ml	109±8	132±9	0.1
VTSVI, ml	62±5	86±10	0.09
FEVI %	43.0±2.8§	35.0±3.0	0.1
VI con edema, %	15.2±2.5§	20.0±2.5§	0.2
Volumen de infarto, % del VI	16.6±1.3	20.6±1.7§	0.1
Masa de infarto, g	11.5±1.2	16.4±1.4§	0.04

Valores en medias ± EEM (error estándar de la media) cuando apropiado. VTDVI-volumen telediastólico VI, VTSVI- volumen telesistólico VI.

\* miocardio en riesgo = miocardio edematoso: % de VI con edema en relación al miocardio total

† volumen del VI con edema pero no con RT en el día 4 en RMC

‡ Obtenido de:  $100 \times$  extensión de miocardio salvado/extensión de miocardio edematoso día 4 RMC.

§ Diferencias significativas entre el día 4 y 22 RMC.

El tratamiento con metoprolol resultó en una extensión de infarto significativamente menor en el día 4 post-infarto en comparación con la del grupo de animales que recibieron placebo en términos de masa absoluta de infarto y porcentaje del VI (volumen)

La extensión del miocardio en riesgo (volumen de edema en el día 4 por RMC) no difirió entre los dos grupos de estudio. Como resultado el porcentaje de miocardio salvado (la comparación primaria del estudio) fue significativamente mayor en el grupo del metoprolol ( $32.4 \pm 6.0\%$ ) que en el grupo placebo ( $6.2 \pm 6.8\%$ ;  $P=0.015$ ); (Tabla 5 y figura 14)

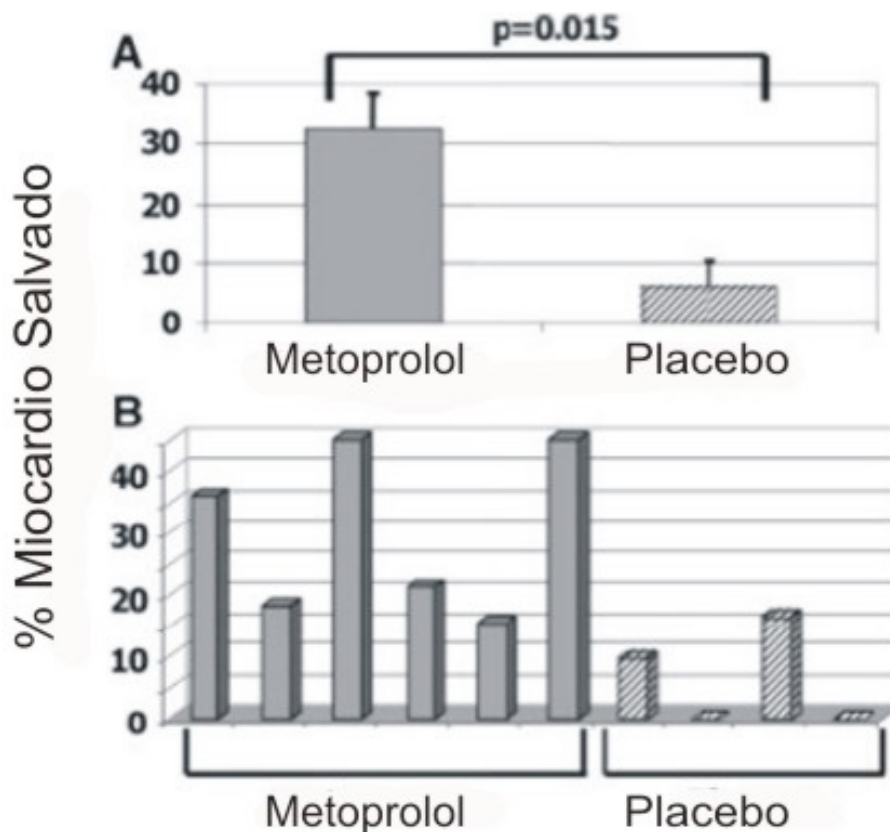


Figura 14. Porcentaje de miocardio salvado (miocardio salvado normalizado al área en riesgo). El eje y corresponde a "100 x extensión de miocardio salvado/extensión de miocardio en riesgo". **A**, media y desviación estándar de la media de los dos brazos de tratamiento; **B** valores individuales de cada uno de los animales estudiados.



En todos los casos, el índice de extensión transmural del infarto fue 100 % en  $\geq 4$  segmentos. El análisis regional de los segmentos positivos para realce tardío no mostró diferencias significativas en el índice de extensión transmural del IAM ( $73 \pm 3\%$  en el grupo de metoprolol versus  $68 \pm 3\%$  en el de placebo;  $P=NS$ ).

En conjunto, en el día 4, los segmentos positivos para edema mostraron un porcentaje de grosor sistólico significativamente menor que los segmentos no edematosos ( $20 \pm 2\%$  versus  $38 \pm 3\%$ ;  $P=0.001$ ) . (Figura 15)

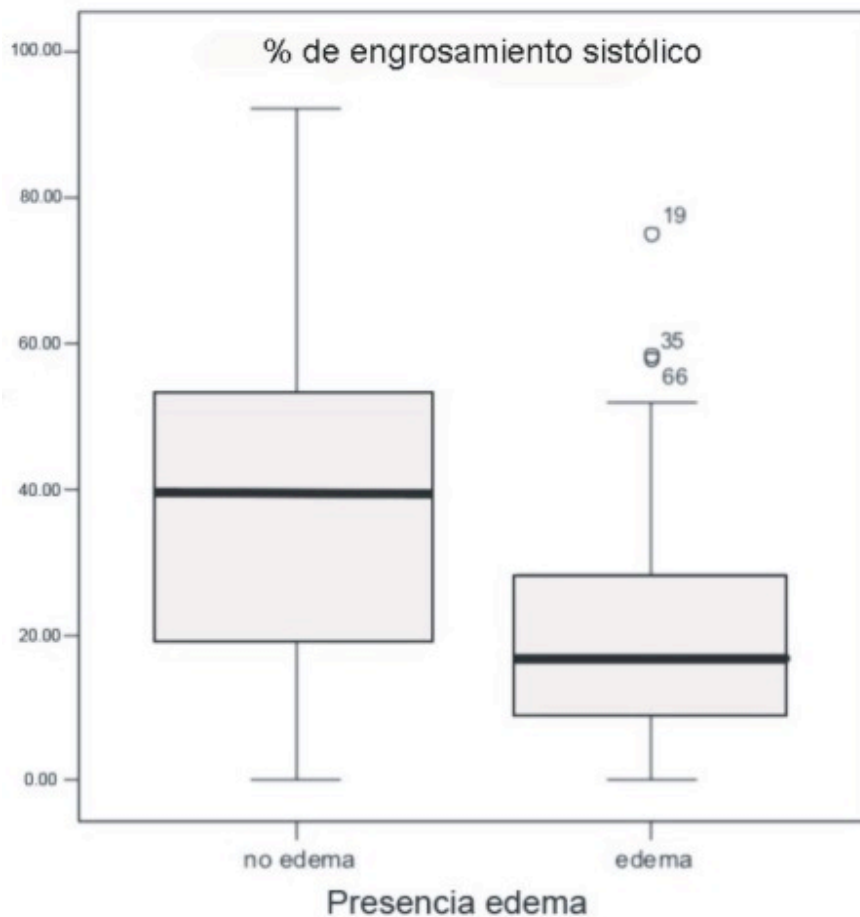


Figura 15. Distribución del porcentaje de engrosamiento sistólico según la presencia de edema. La línea central representa el percentil 50; el diagrama de caja ilustra el percentil 25 y 75. Los valores extremos se representan como puntos individuales

Asimismo, encontramos una relación inversamente proporcional y significativa entre la presencia de edema y el porcentaje de engrosamiento sistólico en el día 4. ( $R= 0.42$ ,  $P= 0.001$ ).

Para examinar qué parámetros de RMC en la fase aguda (día 4) predecían una mejoría funcional global o regional con el tiempo, usamos modelos de regresión multivariado. La FEVI basal ( $\beta= 0.979$ ,  $P=0.004$ ) y la extensión de miocardio salvado el día 4 ( $\beta= 0.897$ ,  $P= 0.039$ ) se asociaron fuertemente con la mejoría de la FEVI con el tiempo. El índice de extensión transmural global también mostró una asociación, pero no estadísticamente significativa ( $\beta= 0.854$ ,  $P= 0.065$ ) con la mejoría de la FEVI. A nivel segmentario, el tamaño regional del miocardio salvado al día 4 fue la única variable asociada con una mejoría en el porcentaje de grosor de la pared entre los días 4 y 22 ( $\beta=0.333$ ,  $P=0.036$ ).

#### **4.1.2 Correlación Histología-RMC**

La correlación entre el volumen del infarto en la histología (tinción TTC) y el volumen de realce tardío (infarto) en la última RMC (Figura 16) fue excelente ( $R=0.905$   $P=0.002$ ) y sin mostrar error sistemático (media de las diferencias,  $-2\%$ ; límites de concordancia,  $4.1\%$  y  $-8\%$ ). No se observó correlación entre el volumen de infarto en histología con el volumen de edema en al última RMC.

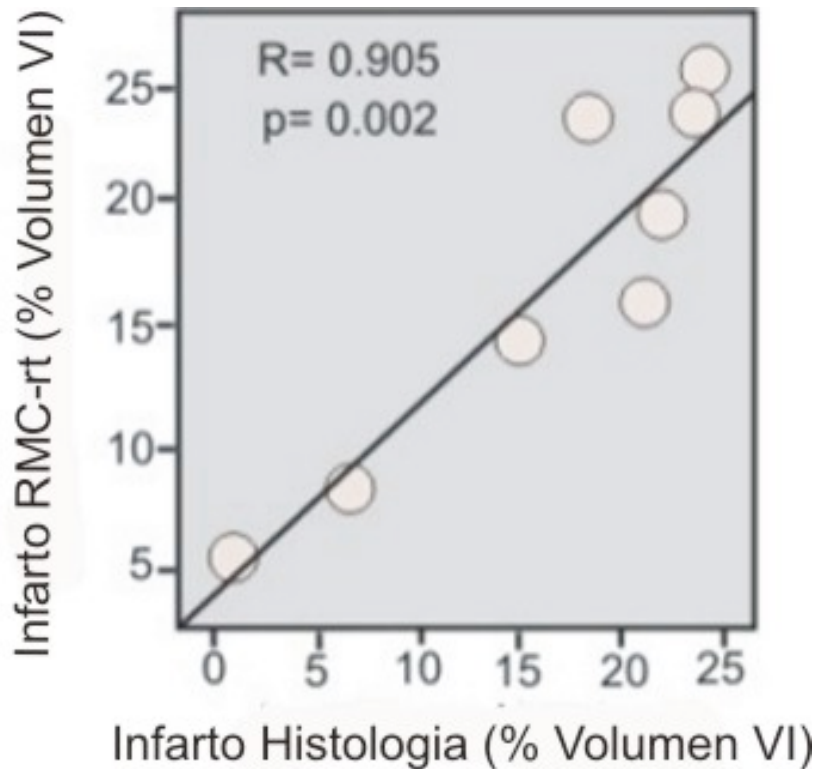


Figura 16. Existe muy buena correlación entre el área de infarto estudiado por histología (tinción TTC) y por RMC-rt.

#### 4.2-Estudio 2: Impacto de la estrategia de administración del metoprolol

Se realizaron 30 procedimientos con oclusión de la arteria descendente anterior con éxito. Todos los 3 grupos (10 animales en cada grupo) mostraron similar frecuencia cardíaca durante el procedimiento ( $66 \pm 2$ ,  $69 \pm 3$  y  $66 \pm 3$  lpm) respectivamente en el grupo de estrategia precoz, diferida y placebo ( $P = NS$ ).

##### 4.2.1. Efecto de los diferentes regímenes de administración del metoprolol sobre la función del VI y del miocardio salvado

A las 72 horas del infarto, los resultados de la RMC mostraron que los volúmenes y la fracción de eyección del VI fueron similares entre los 3 grupos. Los resultados de los parámetros derivados de la RMC se presentan en la Tabla 6.

**Tabla 6. Parámetros derivados de la RMC**

	<b>Estrategia precoz</b>	<b>Estrategia diferida</b>	<b>Placebo</b>
VTDVI, ml	92 ± 5	97 ± 7	116 ±12
VTSVI, ml	58±2	63±6	75±13
FEVI, %	36.2±2.9	35.3±3.6	34.3±5.3
Miocardio en riesgo (% del VI)	37.6±2.1	40.1±4.3	32.1±1.9
Miocardio salvado (% miocardio en riesgo)	30.8±4.0*†	13.1±6.2	7.4±3.2

Los datos son expresados como media ± desviación estándar de la media. N= 18 (6 por grupo). \*p=0,04 vs grupo estrategia diferida. † p=0,005 vs grupo placebo

Observamos que la extensión de miocardio en riesgo de los tres grupos no se diferenciaba significativamente. En cambio, el miocardio salvado era significativamente mayor sólo en el grupo de estrategia precoz. La extensión del miocardio salvado fue 31±4% del área en riesgo en el grupo de estrategia precoz comparado con el 13±6% en el grupo de estrategia diferida (p=0.04 vs. estrategia precoz) y 7±3% en el grupo placebo (p=0.005 vs. estrategia precoz). No se observaron diferencias significativas de miocardio salvado entre el grupo de estrategia diferida y el grupo placebo. (Figura 17).

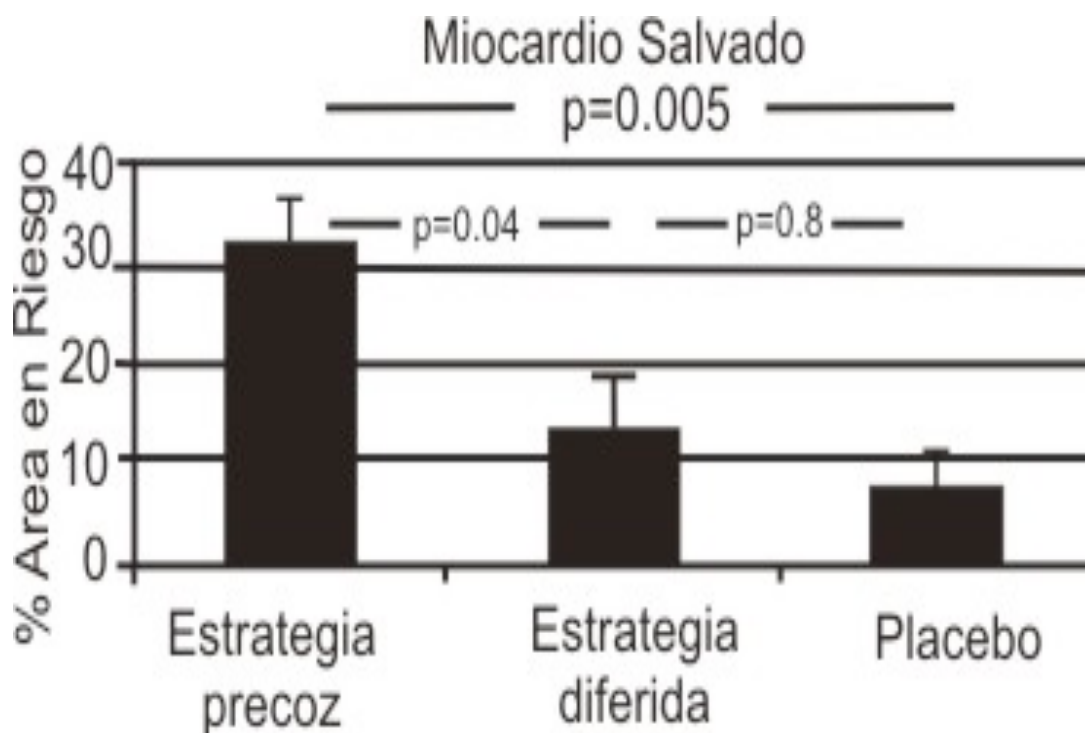


Figura 17. Cuantificación del miocardio salvado por RMC. Los datos son expresados como media  $\pm$  error estándar de la media. N=18 (6 por grupo)

#### 4.2.2 Efectos de los diferentes regímenes de administración del metoprolol en el daño por reperfusión

Cuando se estudió la inflamación en relación con los neutrófilos (actividad de la mieloperoxidasa) se observó que ésta era significativamente menor en el grupo de estrategia precoz comparada con los otros dos grupos:

0.27 $\pm$ 0.02 unidades de MPO en el grupo de estrategia precoz, 0.56 $\pm$ 0.05 en estrategia diferida (p=0.016 vs. estrategia precoz), y 0.54 $\pm$ 0.02 en el grupo placebo (p=0.036 vs. estrategia precoz).

No se observaron diferencias significativas entre los grupos de estrategia diferida y el placebo. (Figura 18)

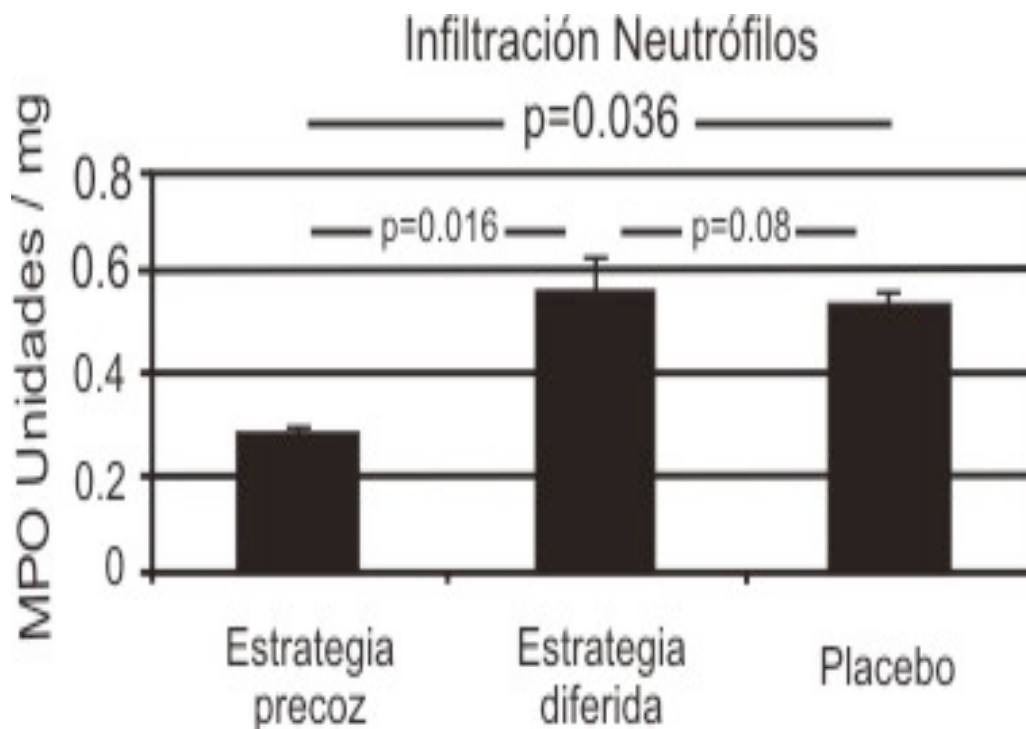
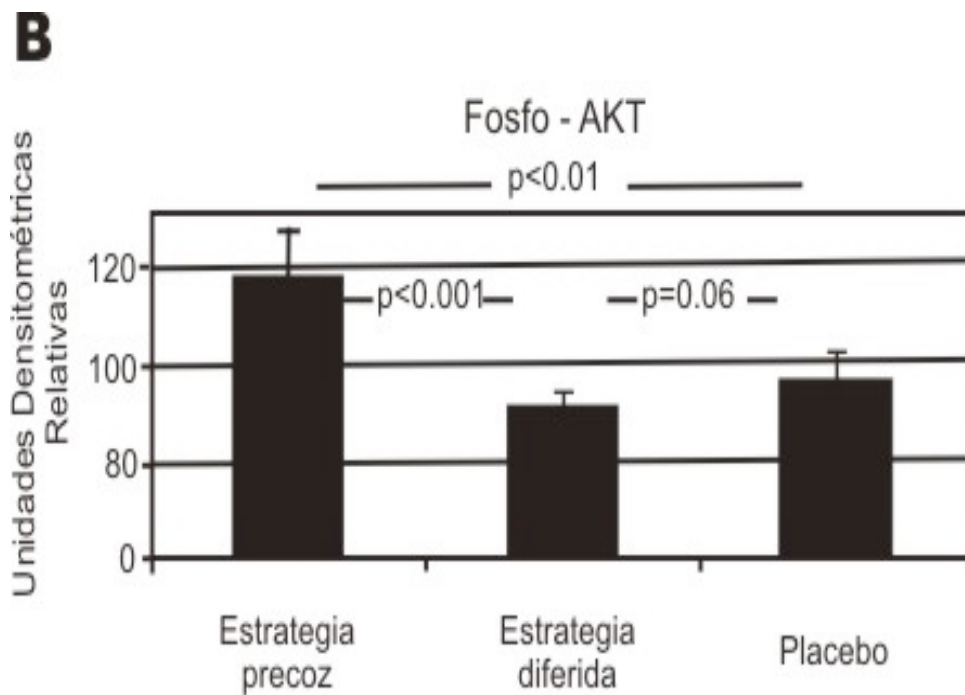
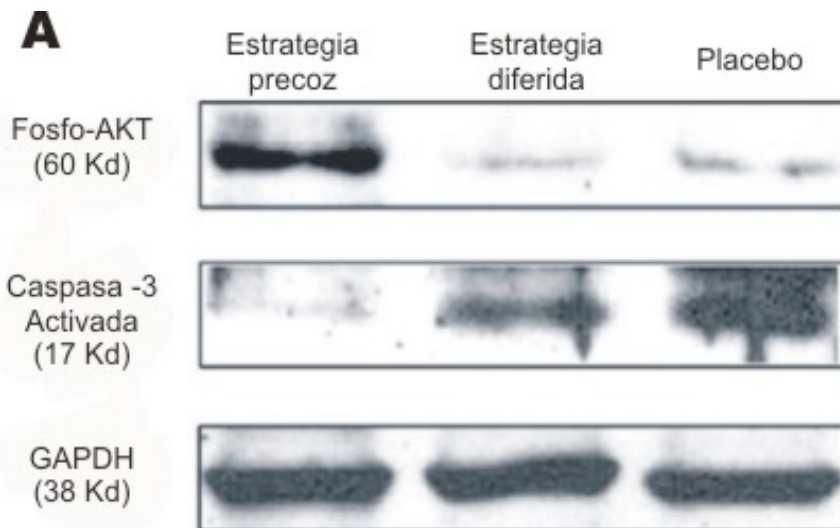


Figura 18. Infiltración de neutrófilos en el área isquémica. La actividad de la mieloperoxidasa (MPO) fue determinada por una determinación colorimétrica semicuantitativa. Los datos son expresados como media  $\pm$  error estándar de la media. N=18 (6 por grupo)

Un efecto similar se observó cuando analizamos el grado de apoptosis en el miocardio isquémico. Los animales pertenecientes al grupo de estrategia precoz mostraron niveles más bajos de caspasa-3 activada en la zona isquémica que los otros dos grupos:  $115 \pm 9$  unidades densitométricas relativas en el grupo de estrategia precoz,  $153 \pm 15$  en estrategia diferida ( $p < 0.001$  vs. estrategia precoz), y  $149 \pm 4$  en el grupo placebo ( $p < 0.01$  vs. estrategia precoz). De igual manera, aquí tampoco se observaron diferencias significativas entre el grupo de estrategia diferida y el placebo (Figura 18). Por el contrario, la estrategia precoz resultó en un grado significativamente mayor de activación de la vía RISK que fue evaluada con la expresión proteica de la fosfo-Akt. Los niveles de fosfo-Akt en el grupo de estrategia precoz fueron significativamente mayores que en los dos otros grupos:  $118 \pm 9$ ,  $91 \pm 3$ , y  $96 \pm 5$  unidades

densitométricas relativas, respectivamente. Las diferencias fueron significativas entre el grupo de estrategia precoz y los otros 2 grupos ( $p < 0.001$  y  $p < 0.01$ , respectivamente), pero no entre el grupo de estrategia diferida y el grupo placebo ( $p = 0.6$ ) (Figura 19)



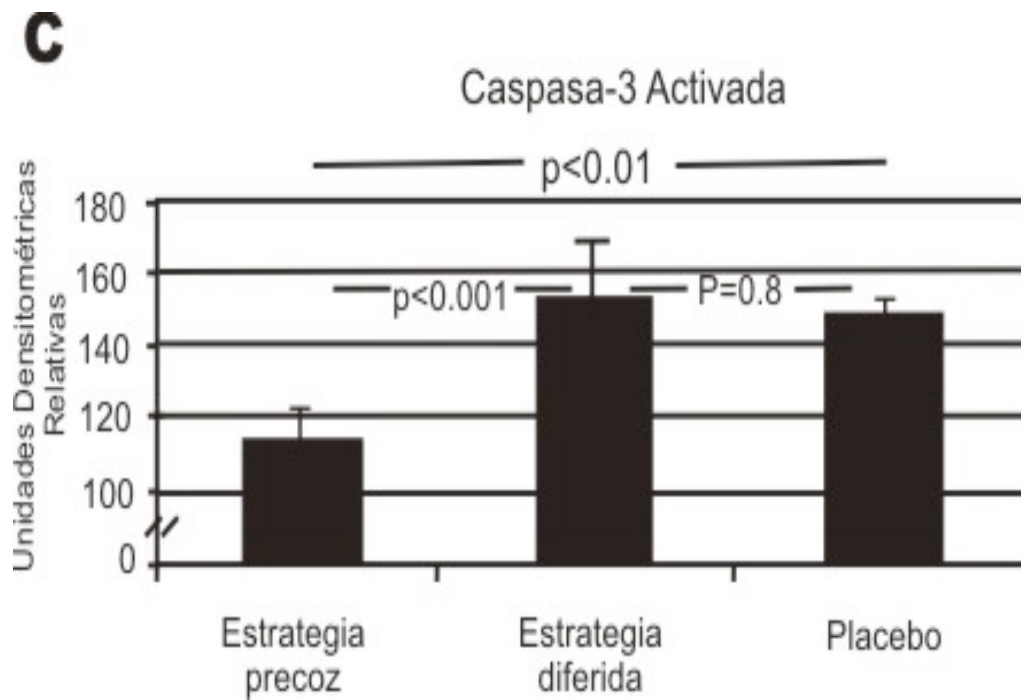


Figura 19. Expresión proteica de marcadores del daño por reperfusión. Western blot (panel A), y su cuantificación por unidades densitométricas relativas (panel B y C expresada como media  $\pm$  DS de la media) de la fosfo-Akt y de la caspasa—3 activada respectivamente en animales de estrategia precoz, diferida y placebo. Glicer aldehido-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), como control de carga. N= 12 (4 por grupo).





## **DISCUSIÓN**



## 5. DISCUSIÓN

En el primer estudio de esta tesis doctoral, describimos los beneficios asociados con la administración temprana del  $\beta$ -bloqueante metoprolol i.v. en la función del VI y en el miocardio salvado en un modelo experimental de oclusión aguda de una arteria coronaria con reperfusión posterior.

La funcionalidad y estructura del ventrículo izquierdo fueron estudiadas en un modelo porcino reproducible de infarto agudo de miocardio a lo largo de 22 días con la resonancia magnética cardíaca. La reproducibilidad del modelo experimental se ve demostrada en la pequeña dispersión que se observó entre los volúmenes del miocardio en riesgo ( $30.7 \pm 1.6\%$  del VI). En este trabajo aprovechamos la versatilidad y las características no invasivas que nos ofrecía la RMC, y validamos nuestros resultados con un análisis histopatológico convencional.

Los principales hallazgos de este primer estudio fueron:

- 1) la administración intravenosa de metoprolol durante la oclusión coronaria y antes de la reperfusión mecánica es una intervención cardioprotectora efectiva, resultando en infartos 27% más pequeños que en el grupo placebo, a pesar de presentar inicialmente el mismo miocardio en riesgo. Este efecto cardioprotector es independiente a sus efectos cronotrópicos negativos, demostrado por la ausencia de diferencias en la frecuencia cardíaca en los distintos grupos de animales estudiados.
- 2) la extensión del miocardio salvado fue un marcador independiente de la recuperación funcional del VI, tanto en términos de motilidad global como de la motilidad regional de la pared ventricular.

La ventaja de este modelo experimental controlado de IAM es que nos ha permitido evaluar los efectos independientes de la administración intravenosa de metoprolol en relación al tamaño del infarto. Esto puede ser mas difícil de conseguir en el ámbito clínico, donde otros muchos factores como la duración y el grado de oclusión coronaria, la existencia de enfermedad coronaria en otros territorios, el éxito de la reperfusión y el uso de medicación previa pueden jugar un rol en el tamaño final del IAM.

De todos modos, este modelo de reperfusión mecánica simula de cerca el ámbito clínico. En nuestro estudio empezamos la inyección intravenosa de metoprolol 75 minutos antes de la reperfusión para imitar el hipotético escenario humano en que los  $\beta$ -bloqueantes serían administrados al inicio de diagnóstico del IAM, cuando se da la “alerta” para la reperfusión mecánica (en pacientes sin contraindicaciones para los  $\beta$ -bloqueantes).

Como ya se ha comentado, tras un episodio de oclusión coronaria prolongado el área en riesgo se caracteriza por presentar un edema intracelular e intersticial, que además puede aumentar con la reperfusión<sup>83</sup>. El edema puede ser visualizado con la secuencia de RMC potenciada en T2 y ha estado validada previamente en otros grupos con diferentes modelos animales<sup>35, 80</sup>. Además, la extensión de la necrosis miocárdica puede ser estudiada con exactitud con el uso de la secuencia de RMC-rt, la cuál, en nuestro trabajo hemos validado con histopatología, obteniendo resultados similares a los descritos<sup>34</sup>.

Hasta el momento este es el primer estudio en vivo que de manera no invasiva, utilizando la RMC, ha estudiado el efecto de los  $\beta$ -bloqueantes sobre el tamaño del IAMEST. Además, en este estudio se ha realizado una caracterización *in*

vivo de la zona isquémica, no solo del tamaño del infarto sino también del miocardio salvado (miocardio en riesgo no infartado).

Aunque para el análisis cuantitativo del área en riesgo y infartada utilizando RMC han sido publicados distintos umbrales de intensidad de señal<sup>84</sup>, no hay una estandarización ni acuerdo de cuál es el mejor algoritmo. En un análisis preliminar, nosotros observamos que el umbral para la secuencia de realce tardío que mejor se relacionaba con la histología en nuestro modelo de infarto era una intensidad de señal 3 desviaciones estándar por encima de la intensidad de señal media del miocardio normal. De este modo usamos 3 desviaciones estándar para las dos secuencias (edema y realce tardío) para evitar introducir errores sistemáticos y sobreestimar el área de miocardio salvado<sup>85</sup>. Además, en nuestro modelo experimental, de infartos transmurales anteriores y anteroseptales, con posibilidad de apnea controladas con ventilación mecánica, obtuvimos una buena calidad de imagen, como demuestran nuestros valores de la relación señal-ruido (SNR) y la relación contraste-ruido (CNR). Posteriormente se han publicado algunos estudios con otro tipo de secuencia para detectar edema, como una secuencia T2 de precesión libre en estado estacionario (*T2-prepared SSFP*) o una secuencia de mapeo de T2, con la finalidad de mejorar problemas técnicos como artefactos de movimiento o pérdida de señal. No obstante los resultados de estos estudios son aun preliminares<sup>86, 87</sup>.

Otro hallazgo importante de este primer estudio es que la extensión del miocardio salvado en el día 4 post-IAM fue un predictor independiente de la recuperación funcional del VI. Esto está en concordancia con el estudio de Aletras y col. que mostró una mejoría de la contractilidad en segmentos

edematosos después de un IAM en un modelo animal canino<sup>80</sup>. La oclusión coronaria en perros normalmente resulta en infartos subendocárdicos debido a su extensa red de colaterales<sup>88</sup>. En estos casos, es difícil estar seguros si la presencia de edema proporciona información adicional a la extensión transmural del IAM para predecir la recuperación de la contractilidad. En cambio, en nuestro estudio, encontramos que la extensión del miocardio salvado era un fuerte predictor de la recuperación funcional global y regional del VI, independientemente del volumen total del miocardio no infartado<sup>89</sup>, de la extensión transmural del IAM<sup>90, 91</sup>, o del tamaño global de la zona edematosa<sup>80</sup>, proporcionando una información más completa. Así pues, este nuevo predictor de la mejoría de la FEVI, pone de manifiesto la importancia de estudiar tanto el tamaño final del infarto como la extensión del miocardio salvado. Esto puede ser relevante a nivel clínico para evaluar la eficacia de las terapias regenerativas y de cardioprotección.<sup>92</sup>

El tamaño del infarto ha demostrado ser un fuerte predictor de los eventos cardiovasculares<sup>41</sup>. Por ello, se ponen los máximos esfuerzos en intervenciones que lo reduzcan, como es la reperfusión precoz y las eventuales terapias de cardioprotección<sup>93</sup>.

Existe evidencia ya demostrada de que los  $\beta$ -bloqueantes reducen la mortalidad en el contexto del IAM cuando son administrados tempranamente<sup>2</sup>. El uso del  $\beta$ -bloqueante oral constituye una indicación Clase I en la guías de práctica clínica<sup>3</sup> pero no obstante su administración durante la fase aguda del IAM no ha sido universalmente adoptada en la era de la reperfusión<sup>94, 95</sup>. Además debido a la falta de consenso sobre los beneficios sustanciales la vía intravenosa temprana ha sido recientemente desaconsejada<sup>3, 96</sup>. Los

resultados de nuestro primer estudio mostrando una mejora en la FEVI a expensas de aumentar el miocardio salvado y reducir el tamaño final del infarto con la administración precoz de metoprolol i.v., coinciden con los resultados del estudio CADILLAC en donde la administración i.v. precoz (metoprolol) mejoró la FEVI <sup>24</sup>. Con esta premisa, en el segundo estudio quisimos investigar si este efecto cardioprotector estaba confinado a su administración antes de la reperfusión o no. Con la utilización de la RMC, observamos que una estrategia precoz (administración pre-reperfusión del metoprolol i.v.) resultó en un aumento significativo de aproximadamente 2,5 veces del miocardio salvado en comparación con su administración oral justo después de la reperfusión. Se trata del primer estudio donde sistemáticamente se compara la administración del  $\beta$ -bloqueante pre-reperfusión (precoz) con su administración oral post-reperfusión (diferida)

En el escenario clínico el impacto de tratamiento previo  $\beta$ -bloqueante en el daño miocárdico inducido por la angioplastia fue estudiado por Sharma y cols. <sup>97</sup>. Demostraron que los pacientes que estaban en tratamiento previo  $\beta$ -bloqueante tenían una menor liberación de enzimas de daño miocárdico tras una angioplastia que los que no tomaban  $\beta$ -bloqueantes previamente. Aunque con estos resultados, podría ser un argumento a favor de prescribir  $\beta$ -bloqueantes en pacientes de alto riesgo, su valor práctico no queda claro.

Por otra parte, el impacto de los  $\beta$ -bloqueantes i.v. antes de la reperfusión de un IAMEST fue estudiado en los estudios CADILLAC y PAMI <sup>24, 25</sup>. Ambos estudios coincidieron en la observación de que, pese a que no se evaluó el tamaño del infarto, la mortalidad inicial y tardía fue significativamente inferior en el grupo de los pacientes tratados con  $\beta$ -bloqueantes i.v. antes de la



reperfusión, en comparación con los tratados posteriormente con  $\beta$ -bloqueantes orales. Nuestros resultados coinciden con estos, mostrando que el momento de inicio de la terapia  $\beta$ -bloqueantes tiene un impacto significativo en el tamaño final del IAM, siendo éste último a su vez un fuerte predictor de eventos cardiovasculares <sup>41</sup>

Si nuestros resultados se repiten en el escenario clínico, el momento y la vía de administración tendrían que ser revisadas en pacientes sin contraindicaciones a los  $\beta$ -bloqueantes.

El mecanismo por el cuál el metoprolol tiene un efecto de cardioprotección no está claro. Hasta ahora, se había sugerido que los  $\beta$ -bloqueantes disminuían la magnitud del infarto disminuyendo el consumo de oxígeno secundario a la disminución de la frecuencia cardiaca durante o justo después del IAM <sup>3</sup>. No obstante, en nuestro estudio, la reducción del tamaño del infarto fue independiente a la frecuencia cardiaca observada durante el infarto. Usamos una perfusión continua de amiodarona durante todo el procedimiento como profilaxis para las arritmias malignas. Esto justifica, al menos en parte, porque la frecuencia cardiaca fue similar en ambos grupos. A este respecto, la amiodarona puede presentar una pequeña actividad  $\beta$ -bloqueante, y esto podría haber mitigado las diferencias entre el grupo del metoprolol y el placebo. En este sentido el uso de otros antiarítmicos sin propiedades  $\beta$ -bloqueantes hubiera sido deseable, pero en nuestra experiencia, la mortalidad en la inducción del IAM sin la perfusión de amiodarona es muy alta en este modelo animal. No obstante, como los dos brazos del estudio recibieron la misma perfusión de amiodarona desde el mismo momento del protocolo y con el mismo tiempo de infusión, el beneficio potencial de la misma hubiera sido

idéntico en los dos grupos. Así pues, las diferencias observadas en este trabajo son atribuibles exclusivamente a la administración de metoprolol.

En el primer estudio de esta tesis ya demostramos que la reducción del IAM proporcionado por el metoprolol i.v. era independiente a su efecto cronotropeo negativo <sup>81</sup> en el modelo animal porcino que no presenta colaterales <sup>98</sup>. En el segundo estudio, se confirmó que la extensión del el miocardio salvado era independiente al ritmo cardiaco presente durante la isquemia ya que fue similar en los 3 grupos.

Así pues, quisimos analizar si el metoprolol puede reducir la extensión de la necrosis reduciendo el daño por reperfusión. La infiltración precoz de neutrófilos y la apoptosis cardiaca están entre los mecanismos patológicos específicos asociados al daño de reperfusión en distintos órganos como el corazón, el cerebro y el riñón <sup>99-103</sup>. Por otro lado, la activación del “mecanismo programado de defensa”, la llamada vía RISK (*reperfusion injury salvage kinases*) protege al miocardio del daño de reperfusión. El grado de activación de esta vía modula la extensión del miocardio salvado y por lo tanto el tamaño resultante de IAM <sup>74, 104</sup>.

Nosotros observamos que la infiltración de neutrófilos era significativamente menor solamente en la estrategia precoz de administración de metoprolol. Estos resultados sugieren un efecto antiinflamatorio del metoprolol en el daño isquemia-reperfusión, en concordancia con observaciones similares descritas después de un traumatismo de la medula espinal <sup>76</sup>. Además, estudios previos ya habían evidenciado la inhibición de la quimiotaxis de los neutrófilos por el metoprolol, sugiriendo un efecto directo del mismo sobre los neutrófilos <sup>75</sup>.

También encontramos una reducción significativa de la expresión proteica de

la caspasa-3 activada, sugiriendo una reducción de la muerte por apoptosis cuando el metoprolol es iniciado vía intravenosa antes de la reperfusión. La muerte celular por apoptosis en el IAM es un fenómeno reconocido ligado a la reperfusión <sup>103</sup>. De hecho, la administración de inhibidores de la apoptosis después del inicio de la isquemia pero antes de la reperfusión ha mostrado limitar el tamaño del infarto <sup>105</sup>. Este efecto no está restringido al corazón. Daemen *et al*, demostraron que la administración pre-reperfusión de un inhibidor de la caspasa disminuía el daño de reperfusión en un modelo de isquemia renal. Lo que fue interesante es que cuando el inhibidor de la caspasa fue administrado pocas horas después de la reperfusión, estos efectos protectores renales desaparecieron <sup>99</sup>.

En nuestro trabajo, cuando el metoprolol fue administrado después de la reperfusión, sus efectos beneficiosos en la limitación de la apoptosis también desaparecieron. La actividad antiapoptótica del metoprolol ha sido también demostrada también en modelos experimentales de insuficiencia cardíaca <sup>77</sup>.

Los resultados derivados de este trabajo confirman las propiedades antiapoptóticas del metoprolol en distintas condiciones cardíacas.

## **CONCLUSIONES**



## 6. CONCLUSIONES

1. En un modelo porcino de infarto agudo de miocardio imitando a la anatomofisiología humana, una dosis única de metoprolol i.v. durante el infarto resultó en 5 veces mayor extensión de miocardio salvado y una reducción del 27% en el tamaño del infarto comparado con el grupo placebo.

2. Este aumento en el miocardio salvado es independiente a la disminución de la frecuencia cardiaca con la administración de este fármaco.

3. En un segundo tiempo y con el mismo modelo animal de infarto de miocardio demostramos que este efecto cardioprotector, evaluado a los 3-4 días del evento isquémico, está restringido a la administración antes de la reperfusión (cuando el infarto está aún en proceso).

4. Este efecto cardioprotector se asoció con una reducción significativa de la apoptosis miocárdica y de la infiltración de neutrófilos, sugiriendo que los efectos cardioprotectores del metoprolol pudieran, en parte, ser mediados, por la reducción del daño por reperfusión.

En resumen, estos resultados sugieren que en el contexto de un infarto agudo de miocardio los  $\beta$ -bloqueantes (metoprolol) tendrían que administrarse lo antes posible, cuando la arteria aun está ocluida (antes de la reperfusión coronaria).



## **BIBLIOGRAFÍA**





## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Roberts R, Kleiman N. Earlier diagnosis and treatment of acute myocardial infarction necessitates the need for a 'new diagnostic mind-set'. *Circulation*. 1994;89:872-881
2. Kloner RA, Rezkalla SH. Cardiac protection during acute myocardial infarction: Where do we stand in 2004? *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;44:276-286
3. Antman EM, Anbe DT, Armstrong PW, Bates ER, Green LA, Hand M, Hochman JS, Krumholz HM, Kushner FG, Lamas GA, Mullany CJ, Ornato JP, Pearle DL, Sloan MA, Smith Jr SC, Alpert JS, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Gibbons RJ, Gregoratos G, Halperin JL, Hiratzka LF, Hunt SA, Jacobs AK. 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). *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;44:E1-E211
4. Gauthier C, Rozec B, Manoury B, Balligand J-L. Beta-3 adrenoceptors as new therapeutic targets for cardiovascular pathologies. *Current Heart Failure Reports*. 2011;8:184-192
5. Cruickshank JM. ? Blockers in hypertension. *The Lancet*. 2010;376:415
6. Poole-Wilson PA, Swedberg K, Cleland JGF, Di Lenarda A, Hanrath P, Komajda M, Lubsen J, Lutiger B, Metra M, Remme WJ, Torp-Pedersen C, Scherhag A, Skene A. Comparison of carvedilol and metoprolol on clinical outcomes in patients with chronic heart failure in the carvedilol or

- metoprolol european trial (COMET): Randomised controlled trial. *The Lancet*. 2003;362:7-13
7. Domanski MJ, Krause-Steinrauf H, Massie BM, Deedwania P, Follmann D, Kovar D, Murray D, Oren R, Rosenberg Y, Young J, Zile M, Eichhorn E, for the Best I. A comparative analysis of the results from 4 trials of beta-blocker therapy for heart failure: BEST, CIBIS-II, MERIT-HF, and COPERNICUS. *Journal of Cardiac Failure*. 2003;9:354-363
  8. Harrison DC, Griffin JR, Fiene TJ. Effects of beta-adrenergic blockade with propranolol in patients with atrial arrhythmias. *New England Journal of Medicine*. 1965;273:410-415
  9. Grönefeld GC, Hohnloser SH. B-blocker therapy in atrial fibrillation. *Pacing and Clinical Electrophysiology*. 2003;26:1607-1612
  10. Hjalmarson A ED, Herlitz J,. Effect on mortality of metoprolol in acute myocardial infarction. A double-blind randomised trial. *Lancet*. 1981;2:823-827.
  11. Effect of metoprolol cr/xl in chronic heart failure: Metoprolol cr/xl randomised intervention trial in-congestive heart failure (MERIT-HF). *The Lancet*. 1999;353:2001-2007
  12. GROUP TMTR. Metoprolol in acute myocardial infarction (MIAMI). A randomised placebo-controlled international trial. *European Heart Journal*. 1985;6:199-226
  13. Effect of carvedilol on outcome after myocardial infarction in patients with left-ventricular dysfunction: The CAPRICORN randomised trial. *The Lancet*. 2001;357:1385-1390

14. Lopez-Sendon J, Swedberg K, McMurray J, Tamargo J, Maggioni AP, Dargie H, et al. Expert consensus document on beta-adrenergic receptor blockers. *European Heart Journal*. 2004;25:1341-1362
15. Hammerman H, Kloner R, Briggs L, Braunwald E. Enhancement of salvage of reperfused myocardium by early beta-adrenergic blockade (timolol). *J Am Coll Cardiol*. 1984;3:1438-1443
16. Van de Werf F, Vanhaecke J, Jang I, Flameng W, Collen D, De Geest H. Reduction in infarct size and enhanced recovery of systolic function after coronary thrombolysis with tissue-type plasminogen activator combined with beta-adrenergic blockade with metoprolol. *Circulation*. 1987;75:830-836
17. Lange R, Nieminen MS, Kloner RA. Failure of pindolol and metoprolol to reduce the size of non-reperfused infarcts in dogs using area at risk techniques. *Cardiovascular Research*. 1984;18:37-43
18. Rasmussen M, Reimer K, Kloner R, Jennings R. Infarct size reduction by propranolol before and after coronary ligation in dogs. *Circulation*. 1977;56:794-798
19. Kern KB, Hilwig RW, Warner A, Basnight M, Ewy GA. Failure of intravenous metoprolol to limit acute myocardial infarct size in a nonreperfused porcine model. *American heart journal*. 1995;129:650-655
20. Roberts R, Croft C, Gold HK, Hartwell TD, Jaffe AS, Muller JE, Mullin SM, Parker C, Passamani ER, Poole WK, Raabe DS, Rude RE, Stone PH, Turi ZG, Sobel BE, Willerson JT, Braunwald E. Effect of propranolol on myocardial-infarct size in a randomized blinded multicenter trial. *New England Journal of Medicine*. 1984;311:218-225

21. Van de Werf F JL, Brzostek T,. Short-term effects of early intravenous treatment with a beta-adrenergic blocking agent or a specific bradycardiac agent in patients with acute myocardial infarction receiving thrombolytic therapy. *Journal of the American College of Cardiology*. 1993;22:407-416.
22. Roberts R, Rogers W, Mueller H, Lambrew C, Diver D, Smith H, Willerson J, Knatterud G, Forman S, Passamani E. Immediate versus deferred beta-blockade following thrombolytic therapy in patients with acute myocardial infarction. Results of the thrombolysis in myocardial infarction (TIMI II-B) study. *Circulation*. 1991;83:422-437
23. Atar I, Korkmaz ME, Atar IA, Gulmez O, Ozin B, Bozbas H, Erol T, Aydinalp A, Yildirim A, Yucel M, Muderrisoglu H. Effects of metoprolol therapy on cardiac troponin-i levels after elective percutaneous coronary interventions. *European Heart Journal*. 2006;27:547-552
24. Halkin A, Grines CL, Cox DA, Garcia E, Mehran R, Tcheng JE, Griffin JJ, Guagliumi G, Brodie B, Turco M, Rutherford BD, Aymong E, Lansky AJ, Stone GW. Impact of intravenous beta-blockade before primary angioplasty on survival in patients undergoing mechanical reperfusion therapy for acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;43:1780-1787
25. Harjai KJ, Stone GW, Boura J, Grines L, Garcia E, Brodie B, Cox D, O'Neil WW, Grines C. Effects of prior beta-blocker therapy on clinical outcomes after primary coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *The American journal of cardiology*. 2003;91:655-660

26. Chen Z, Pan HC, Chen YP Early intravenous then oral metoprolol in 45852 patients with acute myocardial infarction: Randomised placebo-controlled trial. *The Lancet*. 2005;366:1622-1632
27. Gersh BJ, Stone GW, White HD, Holmes DR. Pharmacological facilitation of primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 2005;293:979-986
28. De Coster P, Wijns W, Cauwe F, Robert A, Beckers C, Melin J. Area-at-risk determination by technetium-99m-hexakis-2-methoxyisobutylisonitrile in experimental reperfused myocardial infarction. *Circulation*. 1990;82:2152-2162
29. Christian TF, Gibbons RJ, Clements IP, Berger PB, Selvester RH, Wagner GS. Estimates of myocardium at risk and collateral flow in acute myocardial infarction using electrocardiographic indexes with comparison to radionuclide and angiographic measures. *Journal of the American College of Cardiology*. 1995;26:388-393
30. Botas J, Stadius ML, Bourassa MG, Rosen AD, Schaff HV, Sopko G, Williams DO, McMillan A, Alderman EL, The BI. Angiographic correlates of lesion relevance and suitability for percutaneous transluminal coronary angioplasty and coronary artery bypass grafting in the bypass angioplasty revascularization investigation study (BARI). *The American Journal of Cardiology*. 1996;77:805-814
31. Graham MM, Faris PD, Ghali WA, Galbraith PD, Norris CM, Badry JT, Mitchell LB, Curtis MJ, Knudtson ML. Validation of three myocardial

- jeopardy scores in a population-based cardiac catheterization cohort. *American heart journal*. 2001;142:254-261
32. Ortiz-Perez JT, Meyers SN, Lee DC, Kansal P, Klocke FJ, Holly TA, Davidson CJ, Bonow RO, Wu E. Angiographic estimates of myocardium at risk during acute myocardial infarction: Validation study using cardiac magnetic resonance imaging. *European Heart Journal*. 2007;28:1750-1758
33. Burns RJ, Gibbons RJ, Yi Q, Roberts RS, Miller TD, Schaer GL, Anderson JL, Yusuf S. The relationships of left ventricular ejection fraction, end-systolic volume index and infarct size to six-month mortality after hospital discharge following myocardial infarction treated by thrombolysis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002;39:30-36
34. Kim RJ, Wu E, Rafael A, Chen E-L, Parker MA, Simonetti O, Klocke FJ, Bonow RO, Judd RM. The use of contrast-enhanced magnetic resonance imaging to identify reversible myocardial dysfunction. *New England Journal of Medicine*. 2000;343:1445-1453
35. Garcia-Dorado D, Oliveras J, Gili J, Sanz E, Perez-Villa F, Barrabes J, Carreras MJ, Solares J, Soler-Soler J. Analysis of myocardial oedema by magnetic resonance imaging early after coronary artery occlusion with or without reperfusion. *Cardiovascular Research*. 1993;27:1462-1469
36. Mahrholdt H, Wagner A, Holly TA, Elliott MD, Bonow RO, Kim RJ, Judd RM. Reproducibility of chronic infarct size measurement by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2002;106:2322-2327

37. The clinical role of magnetic resonance in cardiovascular disease. *European Heart Journal*. 1998;19:19-39
38. Lund GK, Stork A, Saeed M, Bansmann MP, Gerken JH, Müller V, Mester J, Higgins CB, Adam G, Meinertz T. Acute myocardial infarction: Evaluation with first-pass enhancement and delayed enhancement mr imaging compared with 201Tl spect imaging<sup>1</sup>. *Radiology*. 2004;232:49-57
39. Wagner A, Mahrholdt H, Holly TA, Elliott MD, Regenfus M, Parker M, Klocke FJ, Bonow RO, Kim RJ, Judd RM. Contrast-enhanced mri and routine single photon emission computed tomography (SPECT) perfusion imaging for detection of subendocardial myocardial infarcts: An imaging study. *The Lancet*. 2003;361:374-379
40. Ibrahim T, Nekolla SG, Hårnke M, Bölow HP, Dirschinger J, Schömig A, Schwaiger M. Quantitative measurement of infarct size by contrast-enhanced magnetic resonance imaging early after acute myocardial infarction: Comparison with single-photon emission tomography using tc99m-sestamibi. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;45:544-552
41. Wu E, Ortiz JT, Tejedor P, Lee DC, Bucciarelli-Ducci C, Kansal P, Carr JC, Holly TA, Lloyd-Jones D, Klocke FJ, Bonow RO. Infarct size by contrast enhanced cardiac magnetic resonance is a stronger predictor of outcomes than left ventricular ejection fraction or end-systolic volume index: Prospective cohort study. *Heart*. 2008;94:730-736
42. Larose E, Rodes-Cabau J, Pibarot P, Rinfret S, Proulx G, Nguyen CM, Dery J-P, Gleton O, Roy L, Noel B, Barbeau G, Rouleau J, Boudreault J-R, Amyot M, De Larochelliere R, Bertrand OF. Predicting late



- myocardial recovery and outcomes in the early hours of st-segment elevation myocardial infarction: Traditional measures compared with microvascular obstruction, salvaged myocardium, and necrosis characteristics by cardiovascular magnetic resonance. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:2459-2469
43. Ioannidis JPA, Trikalinos TA, Dianas PG. Electrocardiogram-gated single-photon emission computed tomography versus cardiac magnetic resonance imaging for the assessment of left ventricular volumes and ejection fraction: A meta-analysis. *Journal of the American College of Cardiology.* 2002;39:2059-2068
44. Thiele H, Nagel E, Paetsch I, Schnackenburg B, Bornstedt A, Kouwenhoven M, Wahl A, Schuler G, Fleck E. Functional cardiac mr imaging with steady-state free precession (SSFP) significantly improves endocardial border delineation without contrast agents. *Journal of Magnetic Resonance Imaging.* 2001;14:362-367
45. Plein S, Smith WHT, Ridgway JP, Kassner A, Beacock DJ, Bloomer TN, Sivananthan MU. Qualitative and quantitative analysis of regional left ventricular wall dynamics using real-time magnetic resonance imaging: Comparison with conventional breath-hold gradient echo acquisition in volunteers and patients. *Journal of Magnetic Resonance Imaging.* 2001;14:23-30
46. Bellenger NG, Burgess MI, Ray SG, Lahiri A, Coats AJS, Cleland JGF, Pennell DJ. Comparison of left ventricular ejection fraction and volumes in heart failure by echocardiography, radionuclide ventriculography and

- cardiovascular magnetic resonance. Are they interchangeable?  
*European Heart Journal*. 2000;21:1387-1396
47. Grothues F, Smith GC, Moon JCC, Bellenger NG, Collins P, Klein HU, Pennell DJ. Comparison of interstudy reproducibility of cardiovascular magnetic resonance with two-dimensional echocardiography in normal subjects and in patients with heart failure or left ventricular hypertrophy.  
*The American Journal of Cardiology*. 2002;90:29-34
48. Bellenger NG, Rajappan K, Rahman SL, Lahiri A, Raval U, Webster J, Murray GD, Coats AJ, Cleland JG, Pennell DJ. Effects of carvedilol on left ventricular remodelling in chronic stable heart failure: A cardiovascular magnetic resonance study. *Heart*. 2004;90:760-764
49. Rajappan K, Bellenger NG, Melina G, Di Terlizzi M, Yacoub MH, Sheridan DJ, Pennell DJ. Assessment of left ventricular mass regression after aortic valve replacement - cardiovascular magnetic resonance versus M-mode echocardiography. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2003;24:59-65
50. Simonetti OP, Kim RJ, Fieno DS, Hillenbrand HB, Wu E, Bundy JM, Finn JP, Judd RM. An improved mr imaging technique for the visualization of myocardial infarction. *Radiology*. 2001;218:215-223
51. Wesbey GE, Higgins CB, McNamara MT, Engelstad BL, Lipton MJ, Sievers R, Ehman RL, Lovin J, Brasch RC. Effect of gadolinium-DTPA on the magnetic relaxation times of normal and infarcted myocardium. *Radiology*. 1984;153:165-169
52. Kim RJ, Chen E-L, Lima JAC, Judd RM. Myocardial Gd-DTPA kinetics determine MRI contrast enhancement and reflect the extent and severity

- of myocardial injury after acute reperfused infarction. *Circulation*. 1996;94:3318-3326
53. Kim R, Choi K, Judd R. Assessment of myocardial viability by contrast enhancement. In: Higgins CB dRA, ed. *Cardiovascular MRI and MRA*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2003:209-237.
54. Wagner A, Mahrholdt H, Thomson L, Hager S, Meinhardt G, Rehwald W, Parker M, Shah D, Sechtem U, Kim RJ, Judd RM. Effects of time, dose, and inversion time for acute myocardial infarct size measurements based on magnetic resonance imaging-delayed contrast enhancement. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;47:2027-2033
55. Scheffler K, Hennig J. T(1) quantification with inversion recovery TrueFISP. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2001;45:720-723
56. Wu E, Judd RM, Vargas JD, Klocke FJ, Bonow RO, Kim RJ. Visualisation of presence, location, and transmural extent of healed Q-wave and non-Q-wave myocardial infarction. *The Lancet*. 2001;357:21-28
57. Fieno DS, Kim RJ, Chen E-L, Lomasney JW, Klocke FJ, Judd RM. Contrast-enhanced magnetic resonance imaging of myocardium at risk: Distinction between reversible and irreversible injury throughout infarct healing. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000;36:1985-1991
58. O'Donnell T DE, Setser R, White RD. . Tracking and analysis of cine-delayed enhancement MR. *Med Image Comput Comput Assist Interv*. 2005;8:692-700

59. Amado LC, Gerber BL, Gupta SN, Rettmann DW, Szarf G, Schock R, Nasir K, Kraitchman DL, Lima JoAC. Accurate and objective infarct sizing by contrast-enhanced magnetic resonance imaging in a canine myocardial infarction model. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;44:2383-2389
60. Hsu L-Y, Ingkanisorn WP, Kellman P, Aletras AH, Arai AE. Quantitative myocardial infarction on delayed enhancement MRI. Part II: Clinical application of an automated feature analysis and combined thresholding infarct sizing algorithm. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 2006;23:309-314
61. Jennings R, Schaper J, Hill M, Steenbergen C, Reimer K. Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. Changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure. *Circulation Research*. 1985;56:262-278
62. Rubboli A, Sobotka PA, Euler DE. Effect of acute edema on left ventricular function and coronary vascular resistance in the isolated rat heart. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 1994;267:H1054-H1061
63. Nilsson JC, Nielsen G, Groenning BA, Fritz-Hansen T, Sondergaard L, Jensen GB, Larsson HBW. Sustained postinfarction myocardial oedema in humans visualised by magnetic resonance imaging. *Heart*. 2001;85:639-642
64. Bouchard A, Reeves RC, Cranney G, Bishop SP, Pohost GM. Assessment of myocardial infarct size by means of T2-weighted 1h

- nuclear magnetic resonance imaging. *American Heart Journal*. 1989;117:281-289
65. Abdel-Aty H, Zagrosek A, Schulz-Menger J, Taylor AJ, Messroghli D, Kumar A, Gross M, Dietz R, Friedrich MG. Delayed enhancement and T2-weighted cardiovascular magnetic resonance imaging differentiate acute from chronic myocardial infarction. *Circulation*. 2004;109:2411-2416
66. Jennings RB SH, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol*. 1960;70:68-78
67. Braunwald E KR. Myocardial reperfusion: A double-edged sword? . *J Clin Invest*. 1985;76:1713-1719
68. Kim J-S, Jin Y, Lemasters JJ. Reactive oxygen species, but not Ca<sup>2+</sup> overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2006;290:H2024-H2034
69. Orrenius S ZB, Nicotera P. Regulation of cell death: The calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*. . 2003;4:552-565
70. Bond JM, Herman B, Lemasters JJ. Protection by acidotic pH against anoxia/reoxygenation injury to rat neonatal cardiac myocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1991;179:798-803
71. Jonassen AK, Sack MN, Mjos OD, Yellon DM. Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via

- Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling. *Circulation Research*. 2001;89:1191-1198
72. Bell RM, Yellon DM. Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: The role of PI3k, Akt and eNOs. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2003;35:185-193
73. Mocanu MM, Yellon DM. Pten, the achilles' heel of myocardial ischaemia/reperfusion injury? *British Journal of Pharmacology*. 2007;150:833-838
74. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia/reperfusion injury: Targeting the reperfusion injury salvage kinase (RISK)-pathway. *Cardiovascular Research*. 2004;61:448-460
75. Dunzendorfer S, Wiedermann CJ. Modulation of neutrophil migration and superoxide anion release by metoprolol. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2000;32:915-924
76. Beril Gok H, Solaroglu I, Okutan O, Cimen B, Kaptanoglu E, Palaoglu S. Metoprolol treatment decreases tissue myeloperoxidase activity after spinal cord injury in rats. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2007;14:138-142
77. Prabhu SD, Wang G, Luo J, Gu Y, Ping P, Chandrasekar B. Beta-adrenergic receptor blockade modulates Bcl-X(S) expression and reduces apoptosis in failing myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2003;35:483-493
78. Garcia-Dorado D, Theroux P, Elizaga J, Galiñanes M, Solares J, Riesgo M, Gomez MJ, Garcia-Dorado A, Aviles FF. Myocardial reperfusion in the

- pig heart model: Infarct size and duration of coronary occlusion. *Cardiovascular Research*. 1987;21:537-544
79. Badimon L, Badimon J, Galvez A, Chesebro J, Fuster V. Influence of arterial damage and wall shear rate on platelet deposition. Ex vivo study in a swine model. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1986;6:312-320
80. Aletras AH, Tilak GS, Natanzon A, Hsu L-Y, Gonzalez FM, Hoyt RF, Arai AE. Retrospective determination of the area at risk for reperfused acute myocardial infarction with T2-weighted cardiac magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2006;113:1865-1870
81. Ibanez B, Prat-Gonzalez S, Speidl WS, Vilahur G, Pinero A, Cimmino G, Garcia MJ, Fuster V, Sanz J, Badimon JJ. Early metoprolol administration before coronary reperfusion results in increased myocardial salvage. *Circulation*. 2007;115:2909-2916
82. Hillenbrand HB, Kim RJ, Parker MA, Fieno DS, Judd RM. Early assessment of myocardial salvage by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2000;102:1678-1683
83. Miller DD, Dragotakes D. Effect of hyperosmotic mannitol on magnetic resonance relaxation parameters in reperfused canine myocardial infarction. *Magn Reson Imaging*. 1989;7:79-88
84. Friedrich MG, Abdel-Aty H, Taylor A, Schulz-Menger J, Messroghli D, Dietz R. The salvaged area-at-risk in reperfused acute myocardial infarction as visualized by cardiovascular magnetic resonance. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;51:1581-1587

85. Wince BR, KR. Molecular imaging: T2-weighted CMR of the area at risk—a risky business? *Nature Reviews Cardiology* 2010;7:547-549
86. Verhaert D, Thavendiranathan P, Giri S, Mihai G, Rajagopalan S, Simonetti OP, Raman SV. Direct t2 quantification of myocardial edema in acute ischemic injury. *JACC: Cardiovascular Imaging*. 2011;4:269-278
87. Kellman P, Aletras AH, Mancini C, McVeigh ER, Arai AE. T2-prepared SSFP improves diagnostic confidence in edema imaging in acute myocardial infarction compared to turbo spin echo. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2007;57:891-897
88. Scheel KW, Daulat G, Williams SE. Functional anatomical site of intramural collaterals in dogs. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 1990;259:H706-H711
89. Gerber BL, Garot Jrm, Bluemke DA, Wu KrC, Lima JC. Accuracy of contrast-enhanced magnetic resonance imaging in predicting improvement of regional myocardial function in patients after acute myocardial infarction. *Circulation*. 2002;106:1083-1089
90. Choi KM, Kim RJ, Gubernikoff G, Vargas JD, Parker M, Judd RM. Transmural extent of acute myocardial infarction predicts long-term improvement in contractile function. *Circulation*. 2001;104:1101-1107
91. Beek AM, Kühl HP, Bondarenko O, Twisk JWR, Hofman MBM, van Dockum WG, Visser CA, van Rossum AC. Delayed contrast-enhanced magnetic resonance imaging for the prediction of regional functional improvement after acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;42:895-901



92. Fuster V, Sanz J, Viles-Gonzalez JF, Rajagopalan S. The utility of magnetic resonance imaging in cardiac tissue regeneration trials. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006;3(suppl 1):S2–S7.
93. Yellon DM, Baxter GF. Protecting the ischaemic and reperfused myocardium in acute myocardial infarction: Distant dream or near reality? *Heart*. 2000;83:381-387
94. Ellerbeck EF, Bhimaraj A, Hall S. Impact of organizational infrastructure on beta-blocker and aspirin therapy for acute myocardial infarction. *American heart journal*. 2006;152:579-584
95. Daly C, Clemens F, Lopez-Sendon JL, Tavazzi L, Boersma E, Danchin N, Delahaye F, Gitt A, Julian D, Mulcahy D, Ruzyllo W, Thygesen K, Verheugt F, Fox KM. The impact of guideline compliant medical therapy on clinical outcome in patients with stable angina: Findings from the euro heart survey of stable angina. *European Heart Journal*. 2006;27:1298-1304
96. Bates ER. Role of intravenous beta-blockers in the treatment of ST-elevation myocardial infarction. *Circulation*. 2007;115:2904-2906
97. Sharma SK, Kini A, Marmur JD, Fuster V. Cardioprotective effect of prior beta-blocker therapy in reducing creatine kinase-MB elevation after coronary intervention : Benefit is extended to improvement in intermediate-term survival. *Circulation*. 2000;102:166-172
98. Chorro FJ S-BL, Lopez-Merino V. Animal models of cardiovascular disease. 62:69–84. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62:69-84

- 
99. Daemen MA, Van't Veer C, Denecker G. Inhibition of apoptosis induced by ischemia–reperfusion prevents inflammation. *J Clin Invest.* 1999;104:541-549
  100. Zhao Z-Q, Nakamura M, Wang N-P, Wilcox JN, Shearer S, Ronson RS, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovascular Research.* 2000;45:651-660
  101. Vedder NB, Winn RK, Rice CL, Chi EY, Arfors KE, Harlan JM. Inhibition of leukocyte adherence by anti-CD18 monoclonal antibody attenuates reperfusion injury in the rabbit ear. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1990;87:2643-2646
  102. Basso C, Thiene G. The pathophysiology of myocardial reperfusion: A pathologists perspective. *Heart.* 2006;92:1559-1562
  103. Zhao Z-Q, Velez D, Wang N-P, Hewan-Lowe K, Nakamura M, Guyton R, Vinten-Johansen J. Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion. *Apoptosis.* 2001;6:279-290
  104. Heusch G, Boengler K, Schulz R. Cardioprotection. *Circulation.* 2008;118:1915-1919
  105. Zhao Z-QZ-Q, Morris CD, Budde JM, Wang N-PN-P, Muraki S, Sun H-YH-Y, Guyton RA. Inhibition of myocardial apoptosis reduces infarct size and improves regional contractile dysfunction during reperfusion. *Cardiovascular Research.* 2003;59:132-142



## APÉNDICE

# Circulation

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION



## **Early Metoprolol Administration Before Coronary Reperfusion Results in Increased Myocardial Salvage : Analysis of Ischemic Myocardium at Risk Using Cardiac Magnetic Resonance**

Borja Ibanez, Susanna Prat-González, Walter S. Speidl, Gemma Vilahur, Antonio Pinero, Giovanni Cimmino, Mario J. García, Valentin Fuster, Javier Sanz and Juan J. Badimon

*Circulation* 2007, 115:2909-2916: originally published online May 21, 2007  
doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.679639

Circulation is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75214

Copyright © 2007 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 0009-7322. Online ISSN: 1524-4539

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://circ.ahajournals.org/content/115/23/2909>

Subscriptions: Information about subscribing to *Circulation* is online at  
<http://circ.ahajournals.org/subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax: 410-528-8550. E-mail:  
[journalpermissions@lww.com](mailto:journalpermissions@lww.com)

Reprints: Information about reprints can be found online at  
<http://www.lww.com/reprints>

## Early Metoprolol Administration Before Coronary Reperfusion Results in Increased Myocardial Salvage Analysis of Ischemic Myocardium at Risk Using Cardiac Magnetic Resonance

Borja Ibanez, MD; Susanna Prat-González, MD; Walter S. Speidl, MD; Gemma Vilahur, DVM, PhD; Antonio Pinero, MD; Giovanni Cimmino, MD; Mario J. García, MD; Valentin Fuster, MD, PhD; Javier Sanz, MD; Juan J. Badimon, PhD

**Background**— $\beta$ -Blockers improve clinical outcome when administered early after acute myocardial infarction. However, whether  $\beta$ -blockers actually reduce the myocardial infarction size is still in dispute. Cardiac magnetic resonance imaging can accurately depict the left ventricular (LV) ischemic myocardium at risk (T2-weighted hyperintense region) early after myocardial infarction, as well as the extent of necrosis (delayed gadolinium enhancement). The aim of this study was to determine whether early administration of metoprolol could increase myocardial salvage, measured as the difference between the extent of myocardium at risk and myocardial necrosis.

**Methods and Results**—Twelve Yorkshire pigs underwent a 90-minute left anterior descending coronary occlusion, followed by reperfusion. They were randomized to metoprolol (7.5 mg during myocardial infarction) or placebo. Global and regional LV function, extent of myocardium at risk, and myocardial necrosis were quantified by cardiac magnetic resonance imaging studies performed 4 and 22 days after reperfusion in 10 survivors. Despite similar extent of myocardium at risk in metoprolol- and placebo-treated pigs (30.9% of LV versus 30.6%;  $P=NS$ ), metoprolol resulted in 5-fold-larger salvaged myocardium (32.4% versus 6.2% of myocardium at risk;  $P=0.015$ ). The LV ejection fraction significantly improved in metoprolol-treated pigs between days 4 and 22 (37.2% versus 43.0%;  $P=0.037$ ), whereas it remained unchanged in pigs treated with placebo (35.1% versus 35.0%;  $P=NS$ ). The extent of myocardial salvage was related directly to LV ejection fraction improvement ( $P=0.031$ ) and regional LV wall motion recovery ( $P=0.039$ ) at day 22.

**Conclusions**—Early metoprolol administration during acute coronary occlusion increases myocardial salvage. The extent of myocardial salvage, measured as the difference between myocardium at risk and myocardial necrosis, was associated with regional and global LV motion improvement. (*Circulation*. 2007;115:2909-2916.)

**Key Words:** imaging ■ magnetic resonance imaging ■ metoprolol ■ myocardial infarction

The major determinant of myocardial salvage during an acute myocardial infarction (MI) is the time to reperfusion.<sup>1,2</sup> Beyond thrombolysis or immediate percutaneous coronary intervention, other therapies that may prevent myocyte death during MI have been sought.  $\beta$ -Blockers have indisputably been demonstrated to be clinically useful in the setting of acute MI,<sup>3</sup> with a large body of evidence showing mortality reductions when administered early.<sup>4-7</sup>  $\beta$ -Blockers also decrease the incidence of reinfarction, recurrent ischemia, or life-threatening arrhythmias and prevent left ventricular (LV) remodeling.<sup>8-10</sup> Therefore, the use of oral  $\beta$ -blockade constitutes a class I indication in clinical practice guidelines.<sup>11</sup> However, early intravenous administration of  $\beta$ -blockers during the acute phase of MI has not been

### Editorial p 2904 Clinical Perspective p 2916

universally adopted.<sup>12-14</sup> Whether  $\beta$ -blockers actually reduce MI size is still an unanswered question. Some preclinical studies suggest that  $\beta$ -blockers decrease the extent of necrosis,<sup>15-17</sup> whereas others have shown no effect.<sup>18-20</sup> The results of human clinical studies, mostly performed in or before the thrombolytic era, also are controversial.<sup>5,21-24</sup> In these investigations, MI size was usually quantified either by postmortem analysis<sup>15-20</sup> or in vivo by indirect surrogates such as creatine kinase-MB fraction levels or ECG changes.<sup>5,21-23</sup> With the advent of delayed-enhancement (DE) cardiac magnetic resonance imaging (CMR), it is now possible to accu-

Received November 27, 2006; accepted April 9, 2007.

From the Zena and Michael A. Wiener Cardiovascular Institute, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY. Dr Vilahur currently is at the Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, UAB, Barcelona, Spain.

Correspondence to Juan J. Badimon, Mount Sinai School of Medicine, 1 Gustave L. Levy Pl, Box 1030, New York, NY 10029. E-mail juan.badimon@mssm.edu

© 2007 American Heart Association, Inc.

*Circulation* is available at <http://www.circulationaha.org>

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.679639

rately quantify the extent of myocardial necrosis *in vivo*.<sup>25</sup> It also has been shown that CMR can depict the area of myocardium at risk, which displays high signal intensity on T2-weighted images early after MI as a result of the presence of edema.<sup>26</sup> Therefore, it is feasible to noninvasively evaluate with CMR the extent of myocardial salvage as the difference between myocardium at risk and myocardial necrosis. The aim of this study was to analyze the therapeutic benefit of early intravenous  $\beta$ -blocker administration on the ischemic myocardium at risk in a swine model of acute coronary occlusion.

## Methods

### Study Design

Acute MI was experimentally induced in Yorkshire Albino pigs ( $n=12$ ; weight,  $33\pm 3$  kg) by closed-chest, 90-minute left anterior descending coronary artery occlusion. Animals were randomized 1:1 to intravenous metoprolol or placebo (sodium chloride). CMR studies were performed 4 and 22 days after MI to quantify LV global and regional functional parameters, area of edema, and MI size. Animals were euthanized within 1 hour after the last CMR study for histopathological validation. The study protocol was approved by an institutional animal research committee.

### Experimental Procedures

Twelve hours before the experimental MI, a loading dose of clopidogrel (150 mg) was administered. Subsequently, clopidogrel (75 mg/d) was maintained for 5 days. Anesthesia for the intervention was induced by intramuscular injection of ketamine (30 mg/kg), xylazine (2.2 mg/kg), and atropine (0.05 mg/kg). Animals underwent endotracheal intubation, and anesthesia was maintained by isoflurane inhalation. Continuous infusions of amiodarone (300 mg, 75 mg/h) and lidocaine (150 mg, 37.5 mg/h) were initiated before the procedure in all pigs as prophylaxis for malignant ventricular arrhythmias. Cardiac rhythm and arterial oximetry were monitored continuously during the procedure. MI was induced by catheter-based 90-minute balloon occlusion of the left anterior descending coronary artery immediately after the origin of the first diagonal branch. Approximately 15 minutes after balloon inflation, intravenous metoprolol (three 2.5-mg injections every 3 to 5 minutes for a total of 7.5 mg) was infused into the pigs assigned to the  $\beta$ -blocker arm. After balloon deflation, patency of the left anterior descending was angiographically confirmed by contrast injection. Buprenorphine (0.03 mg/kg) and cefazolin (25 mg/kg) were administered every 12 hours for 5 days in all animals.

For the CMR studies, pigs were anesthetized by intramuscular injection of ketamine, xylazine, and atropine. Anesthesia was maintained by continuous intravenous propofol infusion. Animals were kept under mechanical ventilation. After the last CMR, animals were heparinized (100 IU/kg) and euthanized with pentobarbital (Sleep-away 75 mg/kg, Fort Dodge, Wyeth, Overland Park, Kan), and the heart was excised for histopathological analysis.

All animals received humane care in compliance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.

### Noninvasive CMR Protocol

CMR studies were performed with a 1.5-T magnet (Magnetom Sonata, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany) using a phased-array cardiac coil by investigators blinded to the treatment arm. All images were acquired with ECG gating and during suspended respiration. First, contiguous short-axis cine images covering the LV from base to apex were acquired using a standard steady-state free-precession sequence (repetition time, 3.5 ms; echo time, 1.5 ms, flip angle,  $60^\circ$  to  $90^\circ$ ; field of view,  $200\times 150$  mm; phase oversampling, 80%; generalized autocalibrating partially parallel acquisitions (GRAPPA) factor, 2; matrix,  $192\times 115$ ; slice thickness, 6 mm; no gap; bandwidth, 930 Hz per pixel; lines per

segment, 11). Subsequently, edema imaging was performed with a T2-weighted, triple inversion-recovery fast spin-echo sequence<sup>27</sup> (repetition time, 2 to 3 heartbeats; echo time, 65 ms; time interval, 100 ms; field of view,  $300\times 225$  mm; matrix,  $256\times 125$ ; slice thickness, 6 mm; bandwidth, 349 Hz per pixel; echo-train length, 17). Finally, DE imaging was performed 15 minutes after the administration of 0.2 mmol/kg gadopentate dimeglumine using an inversion-recovery fast gradient-echo sequence<sup>28</sup> (repetition time, 8 ms; echo time, 4 ms; time interval optimized to null normal myocardium; gating factor, 2 to 3; field of view,  $300\times 225$  mm; matrix,  $256\times 144$ ; slice thickness, 6 mm; bandwidth, 160 Hz per pixel; lines per segment, 23). The slice positions for both T2-weighted and DE acquisitions matched those of the cine images.

### CMR Data Analysis

All CMR images were analyzed by researchers blinded to the study arm or histopathology data. LV function analysis was performed with dedicated software (Argus, Siemens Medical Solutions, Malvern, Pa). Epicardial and endocardial borders were traced in each cine image to obtain LV end-diastolic volume, LV end-systolic volume, and LV ejection fraction (LVEF). Each short-axis slice was divided into 6 equiangular segments using the anterior insertion point of the right ventricle in the septum as a reference. For each segment, the percentage systolic thickening was measured.

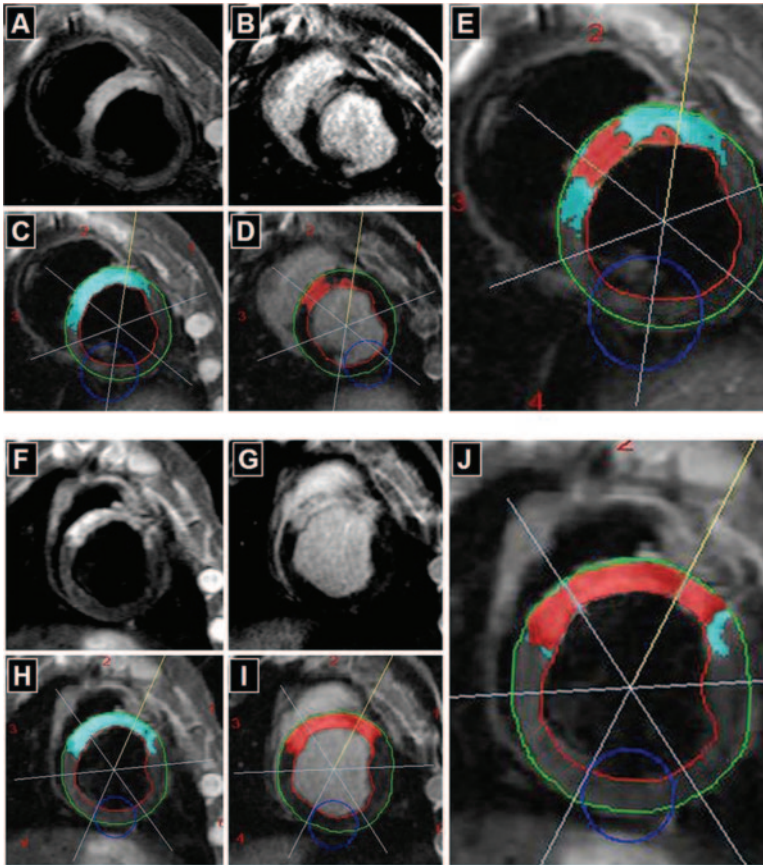
The extent of edematous myocardium and DE in each image was quantified with prototype analysis software (VPT, Siemens Corporate Research, Princeton, NJ).<sup>29</sup> After manual tracing of epicardial and endocardial contours, a large region of interest was drawn within a remote normal myocardial segment. Abnormal areas for each sequence, defined as those with a signal intensity 3 SD above the mean signal intensity of normal myocardium,<sup>30</sup> were automatically highlighted and quantified (Figure 1). Myocardial necrosis was defined by the extent of abnormal DE; myocardium at risk was defined by the extent of edema (high signal intensity on T2-weighted images) in the day 4 CMR study<sup>26</sup>; and salvaged myocardium was defined as the difference between myocardium at risk and myocardial necrosis. All measurements were expressed as percentage of the total LV myocardial volume; the absolute MI size also was quantified in grams (calculated as volume multiplied by myocardial density [ $1.05$  g/cm<sup>3</sup>]). The transmural extent index of MI within each segment was calculated as a percentage of the total segment area as previously described.<sup>31</sup> Global transmural extent index of MI was calculated as the mean of all segmental transmural extent indexes of MI in the DE-positive segments. In addition, 3 consecutive short-axis slices containing both edema and DE were selected in each animal for the segmental (regional) analyses of edema and DE distribution.

In the T2-weighted and DE images, the signal-to-noise ratios of both normal and abnormal myocardium were quantified as the average of the mean signal intensity within a region of interest divided by the mean value of noise (obtained from a region of interest in the air). Contrast-to-noise ratios of abnormal versus normal myocardium were defined as the difference of their signal-to-noise ratios.<sup>26</sup>

### Histological Infarct Size Analysis

After the animals were sacrificed, the hearts were perfused with cold PBS and stiffened by overnight immersion in isotonic agar solution at  $4^\circ\text{C}$ . After stiffening, hearts were washed with cold PBS, and the LV was sliced (short-axis, 6-mm-thick slices without gap) with a commercial meat slicer. Slices were incubated for 5 to 7 minutes in warm 1% trimethyl tetrazolium chloride (TTC) solution at  $37^\circ\text{C}$ .<sup>32</sup> After TTC incubation, the slices were immersed in 4% paraformaldehyde for 12 hours. After paraformaldehyde fixation, high-resolution digital images from all slices were acquired, and areas of infarction (negative for TTC staining) and normal myocardium (positive TTC staining) were quantified with ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, Md) (Figure 2, top). The MI volume was expressed as a percentage of the total LV myocardium.





**Figure 1.** CMR short-axis images obtained at the same LV level 4 days after MI induction in a metoprolol-treated animal (A through E) and in a placebo animal (F through J). A and F, T2-weighted, fast spin-echo images in which hyperintense areas indicate the presence of edema. B and G, DE images depicting the infarcted areas (bright). C, D, H, and I correspond to A, B, F, and G after automatic quantification of edematous (blue) and infarcted (red) areas. In addition, the region of interest for the quantification of normal myocardial signal intensity and the segments for regional analysis (see text) are displayed. E and J show simultaneously the extent of edema and DE. Regions in blue correspond to areas of edema without DE, representing salvaged myocardium. Note that despite similar extent of total myocardium at risk (blue in C and H), the percentage of DE is much smaller in the metoprolol-treated animal.

### Statistical Analysis

Continuous variables are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical comparisons of means were made by Student's paired and unpaired *t* tests. To calculate the correlation of variables, Pearson's coefficients were used. The limits of agreement between infarct size in DE CMR and histology were analyzed by the Bland-Altman plot. Two multivariate linear regression models were performed to predict the change of global LVEF and segmental systolic thickening, respectively. Baseline (day 4 CMR) variables that either had a clinically plausible relation to improvement of function or appeared to be associated with an increase in LVEF or regional systolic thickening, indicated by a value of  $P < 0.20$  in univariate analysis, were used as independent variables. For the global and regional functional improvement, the independent variables were LVEF, volume of non-infarcted myocardium, global transmural extent index of MI, and extent of salvaged myocardium (global) and percentage of systolic thickening within each segment, segmental volume of noninfarcted myocardium, transmural extent index of MI, and the extent of segmental salvaged myocardium (regional). A value of  $P < 0.05$  (2 tailed) was considered statistically significant. All statistical analyses were performed with the statistical software package SPSS 11.0 (SPSS Inc, Chicago, Ill).

The authors had full access to and take responsibility for the integrity of the data. All authors have read and agree to the manuscript as written.

### Results

Successful left anterior descending coronary artery occlusion was achieved in all 12 cases. Two animals died of refractory ventricular fibrillation during the procedure. Therefore, a total of 10 pigs (6 in the metoprolol arm, 4 in the placebo group) made up the final study. Both groups showed a similar mean heart rate during the procedure ( $66 \pm 2$  and  $65 \pm 3$  bpm

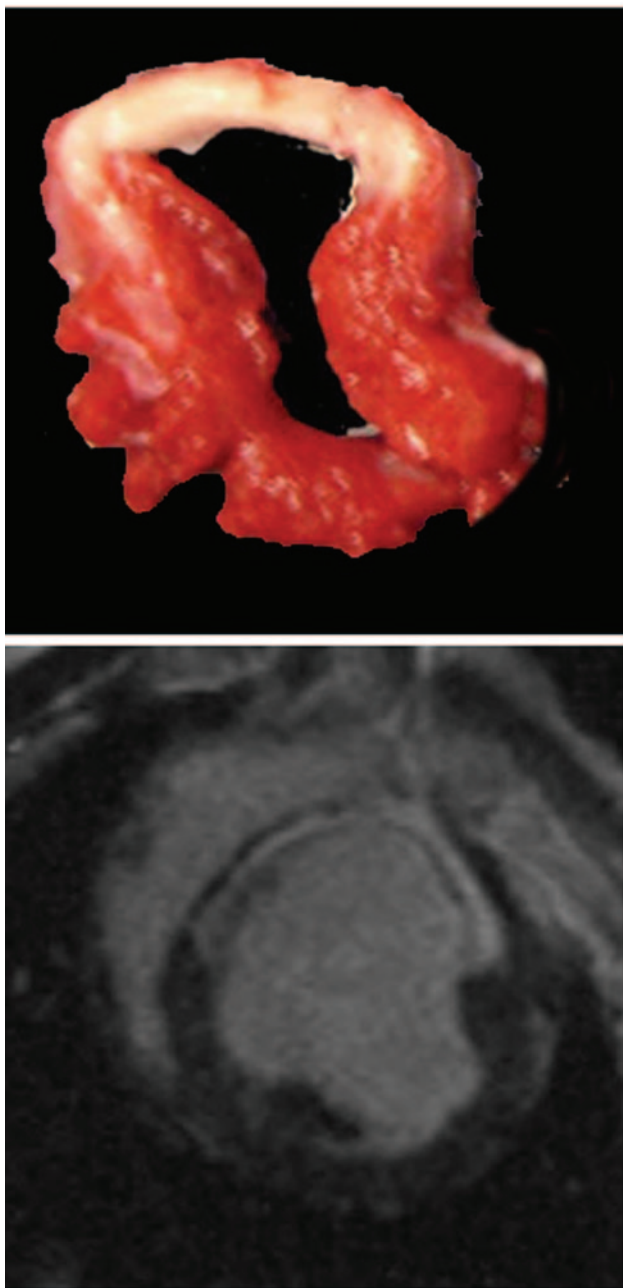
for the metoprolol and placebo groups, respectively;  $P = \text{NS}$ ). The metoprolol group showed a significantly lower incidence of ventricular fibrillation than the placebo group (33% versus 66%, respectively;  $P = 0.047$ ) and a similar rate of ventricular tachycardia (33% versus 33%;  $P = \text{NS}$ ) during the procedure.

### CMR Analysis

The average signal-to-noise ratio for the T2-weighted images was  $9.94 \pm 0.5$  in the edematous myocardium and  $3.77 \pm 1.7$  in the remote normal myocardium ( $P < 0.001$ ). The corresponding values on the DE images were  $6.68 \pm 0.3$  for infarcted myocardium and  $1.57 \pm 0.1$  for normal myocardium, respectively ( $P < 0.001$ ). The contrast-to-noise ratio between abnormal and normal myocardium was similar for both sequences ( $6.17 \pm 0.5$  for T2-weighted images,  $5.11 \pm 0.3$  for DE images:  $P = \text{NS}$ ).

The results of CMR-derived parameters at days 4 and 22 after MI are presented in the Table. At day 4, no significant differences were observed in LVEF between study groups. From day 4 to 22, the LVEF significantly improved in the metoprolol arm ( $P = 0.037$ ), whereas it remained unchanged in the placebo arm. Change in the LVEF from day 4 to 22 was higher in metoprolol animals (5.8 versus  $-0.1$ ;  $P = 0.079$ ). Metoprolol treatment resulted in a significantly smaller extent of MI in terms of both absolute infarct mass and percentage of the LV myocardium, noticeable at day 4. The extent of myocardium at risk (volume of edema at day 4 CMR) did not differ between the 2 groups. As a result, the percentage of salvaged myocardium (the primary comparison of the study)





**Figure 2.** Histological (top) and CMR images at the same level of the LV demonstrating the correspondence between the infarcted area in histology (negative TTC staining; white) and the extent of DE in the CMR.

was significantly larger in metoprolol animals ( $32.4 \pm 6.0\%$ ) than in the placebo group ( $6.2 \pm 6.8\%$ ;  $P=0.015$ ; the Table and Figure 3).

In all cases, the transmural extent index of MI was 100% in  $\geq 4$  segments. Regional analysis of DE-positive segments showed a nonsignificant difference in the transmural extent index of MI ( $73 \pm 3\%$  in metoprolol versus  $68 \pm 3\%$  in the placebo group;  $P=NS$ ; Figure 4).

Overall, at day 4, edema-positive segments showed a statistically significant lower percentage of systolic thickening than nonedematous segments ( $20 \pm 2\%$  versus  $38 \pm 3\%$ ;  $P < 0.001$ ). In addition, we found a statistically significant

inverse correlation ( $R = -0.42$ ,  $P < 0.001$ ) between the presence of edema and percentage systolic thickening at day 4.

To examine which CMR parameters at day 4 predict global or segmental functional improvement over time, multivariate regression models were used. The basal LVEF ( $\beta = 0.979$ ,  $P = 0.004$ ) and the extent of salvaged myocardium at day 4 ( $\beta = 0.897$ ,  $P = 0.039$ ) were strongly associated with improvement of LVEF over time. The global transmural extent index also showed a nonstatistically significant ( $\beta = 0.854$ ,  $P = 0.065$ ) association with LVEF improvement.

At a segmental level, the regional size of salvaged myocardium at day 4 was the only variable associated with the improvement in percentage of wall thickening between days 4 and 22 ( $\beta = 0.333$ ,  $P = 0.036$ ).

### Histopathology–CMR Correlation

Excellent correlation ( $R = 0.844$ ,  $P = 0.008$ ) and agreement (mean bias,  $-2\%$ ; limits of agreement,  $4.1\%$  and  $-8\%$ ) were observed between infarct volume in histology (TTC staining) and the volume of DE in the last CMR (Figure 2). No correlation was observed between infarct volume on histology and volume of edema in the last CMR study.

### Discussion

In this study, we describe the benefits associated with early administration of metoprolol on LV function and myocardial salvage in an experimental model of acute coronary occlusion. The porcine model of acute MI was selected because of the anatomophysiological similarities with humans. The functional and structural LV performance was evaluated in a reproducible swine model of anterior wall MI over a 3-week period. The reproducibility of the experimental model is highlighted by the small dispersion values of the volume of myocardium at risk ( $30.7 \pm 1.6\%$  of LV). We exploited the versatility and the noninvasive characteristics of high-resolution CMR, validating the results with the most conventional histopathological analysis. The main findings of the present study are that (1) intravenous metoprolol during coronary occlusion and before mechanical reperfusion is a highly effective cardioprotective agent, resulting in a 27% smaller MI than placebo, despite an initially equivalent amount of myocardium at risk, a cardioprotective effect that was independent of its negative chronotropic effects, and (2) the extent of myocardial salvage was an independent predictor of LV functional recovery, both global and regional wall motion.

To the best of our knowledge, this is the first in vivo, noninvasive evaluation of the effect of  $\beta$ -blockade on MI size with high-resolution CMR. In addition, we could perform detailed in vivo characterization of the entire ischemic region, not only of the MI size but also of the salvaged myocardium (noninfarcted myocardium at risk). A controlled model of experimental MI enabled us to evaluate the independent effects of intravenous metoprolol administration on MI size. This may be more difficult to achieve in a clinical environment, where many other factors such as duration and degree of coronary occlusion, completeness of reperfusion, and prior medication use play a role in final MI size.

CMR-Derived Parameters

	Metoprolol	Placebo	P
Day 4 CMR			
LVEDV, mL	96±6	123±12	0.06
LVESV, mL	59±3	82±15	0.1
LVEF, %	37.2±3.3	35.1±5.7	0.7
Myocardium at risk,* % of LV with edema	30.9±1.9	30.6±1.0	0.6
Infarct volume, % of LV	20.9±1.6	28.7±2.3	0.02
Infarct mass, g	12.7±0.7	21.9±2.3	0.002
Salvaged myocardium,† % of LV	10.0±2.3	1.9±1.2	0.028
Percent salvaged myocardium‡	32.4±6.0	6.2±6.8	0.015
Day 22 CMR			
LVEDV, mL	109±8	132±9	0.1
LVESV, mL	62±5	86±10	0.09
LVEF, %	43.0±2.8§	35.0±3.0	0.1
LV with edema, %	15.2±2.5§	20.0±2.5§	0.2
Infarct volume, % of LV	16.6±1.3	20.6±1.7§	0.1
Infarct mass, g	11.5±1.2	16.4±1.4§	0.04

Values are mean±SEM where appropriate. LVEDV indicates LV end-diastolic volume; LVESV, LV end-systolic volume.

\*Edematous myocardium.

†The volume of LV showing edema but not DE in the day 4 CMR.

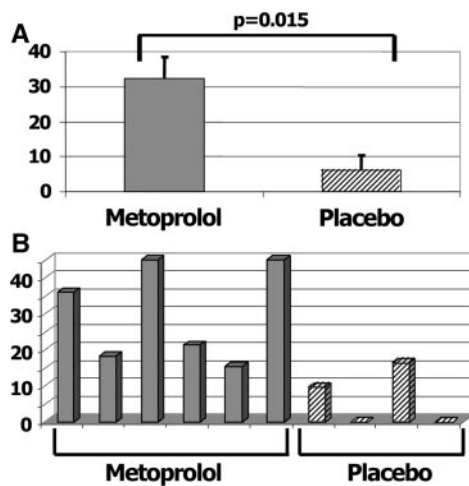
‡Obtained as follows: 100×extent of salvaged myocardium/extent of edematous myocardium in the day 4 CMR.

§Significant differences between day 4 and 22 CMR.

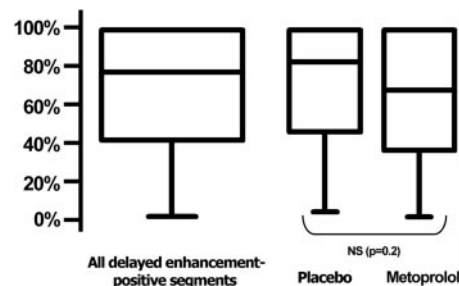
The efficacy of  $\beta$ -blockers as cardioprotective agents has been widely studied. Preclinical animal studies have shown contradictory results: Experimental models of reperfused<sup>15,19</sup> and nonreperfused<sup>16,18,20</sup> MI showed either a reduction in<sup>15,16</sup> or no effect on the final MI size.<sup>18–20</sup> Most of the animal studies analyzed the MI size ex vivo (postmortem) early after the MI induction without follow-up.

In clinical practice,  $\beta$ -blockers have unquestionably demonstrated to be beneficial in the setting of acute MI, resulting

in reduced mortality when administered early.<sup>4–6</sup> As a result, current practice guidelines recommend early  $\beta$ -blockade in subjects after an acute MI,<sup>11</sup> although no general consensus exists on the optimal timing of administration. In this clinical scenario, the effect of  $\beta$ -blockade on MI size is controversial. In the prethrombolytic era, several clinical trials investigated the impact of  $\beta$ -blockade on MI size. In the Multicenter Investigation of the Limitation of Infarct Size trial, intravenous propranolol followed by oral treatment failed to reduce MI size.<sup>24</sup> Comparable results were found with similar regimens of propranolol administration by other investigators.<sup>33</sup> Contrarily, other studies have demonstrated a significant reduction in MI size in patients receiving  $\beta$ -blockers compared with control subjects.<sup>4,21,23</sup> In the thrombolytic era for MI reperfusion, the results were also inconclusive. Van de Werf et al<sup>34</sup> showed that the intravenous administration of atenolol followed by oral therapy to MI patients receiving



**Figure 3.** Percent salvaged myocardium (salvaged myocardium normalized to myocardium at risk). The y axis corresponds to “100×extent of salvaged myocardium/extent of myocardium at risk.” A, Mean and SE of the mean of both treatment arms; B, the individual data.



**Figure 4.** Distribution of the transmural extent index of MI in DE-positive segments. Center line represents the 50th percentile; box plots illustrate the 25th and 75th percentiles.

alteplase did not reduce MI size. In the Thrombolysis Early in Heart Attack Trial,<sup>35</sup> patients from the recombinant tissue plasminogen activator plus metoprolol arm had smaller MIs than those in the recombinant tissue plasminogen activator alone arm. In the age of percutaneous interventions for coronary revascularization, the effect of  $\beta$ -blockade has been analyzed in a limited and nonrandomized fashion. Although several observations have confirmed the beneficial clinical effect of early  $\beta$ -blockade after MI with this invasive reperfusion modality,<sup>36–38</sup> the effect of  $\beta$ -blocker administration in MI size remains unclear. The administration of  $\beta$ -blockers before elective percutaneous coronary interventions also has been associated with significant discrepancies; although intracoronary propranolol resulted in less myocardial damage,<sup>39</sup> the oral administration of metoprolol failed to demonstrate any evidence of less myocardial injury.<sup>40</sup> Finally, prior chronic treatment with  $\beta$ -blockers was associated with smaller MIs after primary percutaneous intervention.<sup>41</sup> One limitation in the interpretation of the clinical results is that the MI size measurement was done mostly by indirect methods such as ECG changes or creatine kinase-MB fraction release.

Our study represents a model of mechanical MI reperfusion closely mimicking the human scenario. The findings reported here suggest that initiation of this therapy while the artery is still occluded results in significant cardioprotection, a finding that might have significant clinical implications. We started the metoprolol infusions 75 minutes before reperfusion to mimic a hypothetical human scenario in which the intravenous  $\beta$ -blocker agent could be initiated at MI diagnosis (in patients without contraindications). In addition, metoprolol injection was associated not only with smaller MI size at day 4 but also with significant LVEF recovery at day 22. These observations are in agreement with the results from the Controlled Abciximab and Device Investigation to Lower Late Angioplasty Complications trial in which early intravenous  $\beta$ -blockade was associated with greater improvements in LVEF over time.<sup>37</sup>

The exact mechanism(s) of action by which  $\beta$ -blockers could result in reductions in MI size remain to be fully elucidated. It has been widely suggested that  $\beta$ -blockers lessen the magnitude of the MI by decreasing oxygen consumption secondary to slow heart rate during or early after MI.<sup>11</sup> However, in our study, the reduction in MI size was independent of the heart rate achieved during the MI induction.

Early after a coronary occlusion, the ischemic area at risk of necrosis is characterized by substantial interstitial and intracellular edema, which may be further increased by reperfusion.<sup>42,43</sup> In addition, reperfusion may further increase the production of edema.<sup>44</sup> Postischemic edematous area can be visualized with the use of T2-weighted “black-blood” CMR, and the use of this approach to depict the ischemic myocardium at risk has been validated by different groups using different experimental models.<sup>26,42</sup> In addition, the extent of myocardial necrosis can be depicted accurately with the use of DE CMR as validated with histopathology in our and other studies,<sup>25</sup> enabling noninvasive visualization of both the infarcted tissue and the myocardium at risk.

An important finding of our study is that the extent of salvaged myocardium at day 4 was identified as an independent predictor of LV functional recovery. This is in agreement with the study by Aletras et al,<sup>26</sup> who showed improvement in contractility in edematous areas early after experimental MI in a canine model. Coronary occlusion in dogs usually leads to subendocardial MI as a result of a well-developed net of collaterals.<sup>45</sup> In such cases, it is difficult to ascertain whether the presence of edema provides incremental information over the transmural extent of MI for the prediction of contractile function recovery. In our study, we found that the extent of salvaged myocardium was a strong predictor of regional and global functional improvement independently of total volume of noninfarcted myocardium,<sup>46</sup> transmural extent of MI,<sup>47,48</sup> or global size of edematous area,<sup>26</sup> providing valuable further comprehensive information.

This novel predictor of LVEF improvement highlights the value of visualizing both the final size of necrosis and the extent of salvaged myocardium. This may be important in evaluations of the efficacy of cardioprotective and regenerative therapies.<sup>49</sup>

### Study Limitations

Given the small sample size, a relatively large number of statistical tests were performed. Despite this potential source of statistical bias, all the results in this work point the same direction; therefore, we believe that the totality of the evidence is strong enough to support the results reported here.

We administered metoprolol in a single time point. Thus, our investigation does not allow conclusions regarding the potential additive gains associated with maintained  $\beta$ -blockade in the post-MI period. Similarly, whether chronic use of  $\beta$ -blockers before the MI lessens the beneficial effect of intravenous therapy, as suggested by some studies,<sup>37,41</sup> requires further investigation. In our protocol, we used continuous infusion of amiodarone during the entire procedure as prophylaxis for malignant arrhythmias. Amiodarone also exerts a small  $\beta$ -blocker activity, which probably explains the similar heart rate in both groups, and thus could have mitigated the differences between the metoprolol and placebo groups. Although the use of a different antiarrhythmic drug without  $\beta$ -blocker properties would have been desirable, in our experience, the mortality of MI induction without amiodarone infusion is very high in this animal model. Nevertheless, because both study arms received the same dose of medication, the potential benefits associated with the use of amiodarone should be identical in both groups. Thus, the significant differences seen in our study should be associated exclusively with the administration of metoprolol.

### Conclusions

In a swine MI model closely mimicking human cardiac anatomophysiology, a single dose of metoprolol during ongoing MI results in 5-fold-larger salvaged myocardium (27% reduction in MI size). This increase is independent of decreases in heart rate with the administration of the drug. Our results suggest that, in the setting of acute MI,  $\beta$ -blockers should be administered as early as possible, while the



coronary artery is still occluded. The cardioprotective effect was demonstrated by the smaller infarct size and larger area of salvaged myocardium. In addition, this study shows the predictive value of the quantification of salvaged myocardium on regional and global LV function recovery at 3 weeks.

### Acknowledgments

We acknowledge the great help with the animal care by the veterinarians and their group at the Center of Comparative Medicine and Surgery. We want to thank Thomas O'Donnell (Siemens Corporate Research) for providing us with the postprocessing imaging tools. We are indebted to Noemi Escalera, M. Urooj Zafar, Jose Rodriguez, Boris Cortes, and Frank Macaluso for their great work.

### Sources of Funding

This work has been partially funded by Fundación Conchita Rábago de Jiménez-Díaz (Spain), Fundación La Caixa (Dr Ibanez, 2005 and 2006), Sociedad Española de Cardiología (Dr Prat-González, 2005 to 2006), Fundación CajaMadrid (Dr Prat-González, 2006 to 2007), and Science and Education Spanish Ministry (Dr Vilahur, 2006 to 2009).

### Disclosures

None.

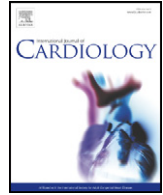
### References

- Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. I: myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*. 1977;56:786-794.
- Reimer KA, Jennings RB. The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death, II: transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest*. 1979;40:633-644.
- Hjalmarson A, Olsson G. Myocardial infarction: effects of beta-blockade. *Circulation*. 1991;84(suppl):VI-101-VI-107.
- Hjalmarson A, Elmfeldt D, Herlitz J, Holmberg S, Malek I, Nyberg G, Ryden L, Swedberg K, Vedin A, Waagstein F, Waldenström A, Waldenström J, Wedel H, Wilhelmsson L, Wilhelmsson C. Effect on mortality of metoprolol in acute myocardial infarction: a double-blind randomised trial. *Lancet*. 1981;2:823-827.
- Metoprolol in Acute Myocardial Infarction (MIAMI). A randomised placebo-controlled international trial: the MIAMI Trial Research Group. *Eur Heart J*. 1985;6:199-226.
- Randomised trial of intravenous atenolol among 16 027 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-1: First International Study of Infarct Survival Collaborative Group. *Lancet*. 1986;2:57-66.
- Kloner RA, Rezkalla SH. Cardiac protection during acute myocardial infarction: where do we stand in 2004? *J Am Coll Cardiol*. 2004;44:276-286.
- Bristow MR. Beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation*. 2000;101:558-569.
- Domanski MJ, Zipes DP, Schron E. Treatment of sudden cardiac death: current understandings from randomized trials and future research directions. *Circulation*. 1997;95:2694-2699.
- Lopez-Sendon J, Swedberg K, McMurray J, Tamargo J, Maggioni AP, Dargie H, Tendera M, Waagstein F, Kjeksus J, Lechat P, Torp-Pedersen C. Expert consensus document on beta-adrenergic receptor blockers. *Eur Heart J*. 2004;25:1341-1362.
- Antman EM, Anbe DT, Armstrong PW, Bates ER, Green LA, Hand M, Hochman JS, Krumholz HM, Kushner FG, Lamas GA, Mullany CJ, Ornato JP, Pearle DL, Sloan MA, Smith SC Jr, Alpert JS, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Gibbons RJ, Gregoratos G, Halperin JL, Hiratzka LF, Hunt SA, Jacobs AK. 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). *Circulation*. 2004;110:e82-e292.
- Ellerbeck EF, Bhimaraj A, Hall S. Impact of organizational infrastructure on beta-blocker and aspirin therapy for acute myocardial infarction. *Am Heart J*. 2006;152:579-584.
- Daly C, Clemens F, Lopez-Sendon JL, Tavazzi L, Boersma E, Danchin N, Delahaye F, Gitt A, Julian D, Mulcahy D, Ruzyllo W, Thygesen K, Verheugt F, Fox KM. The impact of guideline compliant medical therapy on clinical outcome in patients with stable angina: findings from the Euro Heart Survey of stable angina. *Eur Heart J*. 2006;27:1298-1304.
- Kramer JM, Newby LK, Chang WC, Simes RJ, Van de WF, Granger CB, Lee KL, White HD, Piegas LS, Topol EJ, Califf RM, Armstrong PW. International variation in the use of evidence-based medicines for acute coronary syndromes. *Eur Heart J*. 2003;24:2133-2141.
- Hammerman H, Kloner RA, Briggs LL, Braunwald E. Enhancement of salvage of reperfused myocardium by early beta-adrenergic blockade (timolol). *J Am Coll Cardiol*. 1984;3:1438-1443.
- Rasmussen MM, Reimer KA, Kloner RA, Jennings RB. Infarct size reduction by propranolol before and after coronary ligation in dogs. *Circulation*. 1977;56:794-798.
- Feuerstein GZ, Yue TL, Cheng HY, Ruffolo RR Jr. Myocardial protection by the novel vasodilating beta-blocker, carvedilol: potential relevance of anti-oxidant activity. *J Hypertens Suppl*. 1993;11:S41-S48.
- Lange R, Nieminen MS, Kloner RA. Failure of pindolol and metoprolol to reduce the size of non-reperfused infarcts in dogs using area at risk techniques. *Cardiovasc Res*. 1984;18:37-43.
- Van de Werf F, Vanhaecke J, Jang IK, Flameng W, Collen D, De Geest H. Reduction in infarct size and enhanced recovery of systolic function after coronary thrombolysis with tissue-type plasminogen activator combined with beta-adrenergic blockade with metoprolol. *Circulation*. 1987;75:830-836.
- Kern KB, Hilwig RW, Warner A, Basnight M, Ewy GA. Failure of intravenous metoprolol to limit acute myocardial infarct size in a non-reperfused porcine model. *Am Heart J*. 1995;129:650-655.
- Yusuf S, Sleight P, Rossi P, Ramsdale D, Peto R, Furze L, Sterry H, Pearson M, Motwani R, Parish S, Gray R, Bennett D, Bray C. Reduction in infarct size, arrhythmias and chest pain by early intravenous beta blockade in suspected acute myocardial infarction. *Circulation*. 1983;67(suppl):I-32-I-41.
- Peter T, Heng MK, Singh BN, Ambler P, Nisbet H, Elliott R, Norris RM. Failure of high doses of propranolol to reduce experimental myocardial ischemic damage. *Circulation*. 1978;57:534-540.
- Reduction of infarct size with the early use of timolol in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1984;310:9-15.
- Rude RE, Buja LM, Willerson JT. Propranolol in acute myocardial infarction: the MILIS experience. *Am J Cardiol*. 1986;57:38F-42F.
- Kim RJ, Wu E, Rafael A, Chen EL, Parker MA, Simonetti O, Klocke FJ, Bonow RO, Judd RM. The use of contrast-enhanced magnetic resonance imaging to identify reversible myocardial dysfunction. *N Engl J Med*. 2000;343:1445-1453.
- Aletras AH, Tilak GS, Natanzon A, Hsu LY, Gonzalez FM, Hoyt RF Jr, Arai AE. Retrospective determination of the area at risk for reperfused acute myocardial infarction with T2-weighted cardiac magnetic resonance imaging: histopathological and displacement encoding with stimulated echoes (DENSE) functional validations. *Circulation*. 2006;113:1865-1870.
- Abdel-Aty H, Zagrosek A, Schulz-Menger J, Taylor AJ, Messroghli D, Kumar A, Gross M, Dietz R, Friedrich MG. Delayed enhancement and T2-weighted cardiovascular magnetic resonance imaging differentiate acute from chronic myocardial infarction. *Circulation*. 2004;109:2411-2416.
- Simonetti OP, Kim RJ, Fieno DS, Hillenbrand HB, Wu E, Bundy JM, Finn JP, Judd RM. An improved MR imaging technique for the visualization of myocardial infarction. *Radiology*. 2001;218:215-223.
- O'Donnell T, Dikici E, Setser R, White RD. Tracking and analysis of cine-delayed enhancement MR. *Med Image Comput Assist Interv Int Conf Med Image Comput Assist Interv*. 2005;8(pt 2):692-700.
- Fieno DS, Kim RJ, Chen EL, Lomasney JW, Klocke FJ, Judd RM. Contrast-enhanced magnetic resonance imaging of myocardium at risk: distinction between reversible and irreversible injury throughout infarct healing. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:1985-1991.
- Hillenbrand HB, Kim RJ, Parker MA, Fieno DS, Judd RM. Early assessment of myocardial salvage by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2000;102:1678-1683.
- Fishbein MC, Meerbaum S, Rit J, Lando U, Kanmatsuse K, Mercier JC, Corday E, Ganz W. Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *Am Heart J*. 1981;101:593-600.
- Roberts R, Croft C, Gold HK, Hartwell TD, Jaffe AS, Muller JE, Mullin SM, Parker C, Passamani ER, Poole WK. Effect of propranolol on

- myocardial-infarct size in a randomized blinded multicenter trial. *N Engl J Med*. 1984;311:218–225.
34. Van de Werf F, Janssens L, Brzostek T, Mortelmans L, Wackers FJ, Willems GM, Heidbuchel H, Lesaffre E, Scheys I, Collen D. Short-term effects of early intravenous treatment with a beta-adrenergic blocking agent or a specific bradycardiac agent in patients with acute myocardial infarction receiving thrombolytic therapy. *J Am Coll Cardiol*. 1993;22:407–416.
  35. Risenfors M, Herlitz J, Berg CH, Dellborg M, Gustavsson G, Gottfridsson C, Lomsky M, Swedberg K, Hjalmarsson A. Early treatment with thrombolysis and beta-blockade in suspected acute myocardial infarction: results from the TEAHAT Study. *J Intern Med Suppl*. 1991;734:35–42.
  36. Kernis SJ, Harjai KJ, Stone GW, Grines LL, Boura JA, O'Neill WW, Grines CL. Does beta-blocker therapy improve clinical outcomes of acute myocardial infarction after successful primary angioplasty? *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:1773–1779.
  37. Halkin A, Grines CL, Cox DA, Garcia E, Mehran R, Tchong JE, Griffin JJ, Guagliumi G, Brodie B, Turco M, Rutherford BD, Aymong E, Lansky AJ, Stone GW. Impact of intravenous beta-blockade before primary angioplasty on survival in patients undergoing mechanical reperfusion therapy for acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:1780–1787.
  38. Chan AW, Quinn MJ, Bhatt DL, Chew DP, Moliterno DJ, Topol EJ, Ellis SG. Mortality benefit of beta-blockade after successful elective percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:669–675.
  39. Wang FW, Osman A, Otero J, Stouffer GA, Waxman S, Afzal A, Anzuini A, Uretsky BF. Distal myocardial protection during percutaneous coronary intervention with an intracoronary beta-blocker. *Circulation*. 2003;107:2914–2919.
  40. Atar I, Korkmaz ME, Atar IA, Gulmez O, Ozin B, Bozbas H, Erol T, Aydinalp A, Yildirim A, Yucel M, Muderrisoglu H. Effects of metoprolol therapy on cardiac troponin-I levels after elective percutaneous coronary interventions. *Eur Heart J*. 2006;27:547–552.
  41. Sharma SK, Kini A, Marmur JD, Fuster V. Cardioprotective effect of prior beta-blocker therapy in reducing creatine kinase-MB elevation after coronary intervention: benefit is extended to improvement in intermediate-term survival. *Circulation*. 2000;102:166–172.
  42. Garcia-Dorado D, Oliveras J, Gili J, Sanz E, Perez-Villa F, Barrabes J, Carreras MJ, Solares J, Soler-Soler J. Analysis of myocardial oedema by magnetic resonance imaging early after coronary artery occlusion with or without reperfusion. *Cardiovasc Res*. 1993;27:1462–1469.
  43. Miller DD, Johnston DL, Dragotakes D, Newell JB, Aretz T, Kantor HL, Brady TJ, Okada RD. Effect of hyperosmotic mannitol on magnetic resonance relaxation parameters in reperfused canine myocardial infarction. *Magn Reson Imaging*. 1989;7:79–88.
  44. Turschner O, D'hooge J, Dommke C, Claus P, Verbeke E, De Scheerder I, Bijnens B, Sutherland GR. The sequential changes in myocardial thickness and thickening which occur during acute transmural infarction, infarct reperfusion and the resultant expression of reperfusion injury. *Eur Heart J*. 2004;25:794–803.
  45. Scheel KW, Daulat G, Williams SE. Functional anatomical site of intramural collaterals in dogs. *Am J Physiol*. 1990;259:H706–H711.
  46. Gerber BL, Garot J, Bluemke DA, Wu KC, Lima JA. Accuracy of contrast-enhanced magnetic resonance imaging in predicting improvement of regional myocardial function in patients after acute myocardial infarction. *Circulation*. 2002;106:1083–1089.
  47. Choi KM, Kim RJ, Gubernikoff G, Vargas JD, Parker M, Judd RM. Transmural extent of acute myocardial infarction predicts long-term improvement in contractile function. *Circulation*. 2001;104:1101–1107.
  48. Beek AM, Kuhl HP, Bondarenko O, Twisk JW, Hofman MB, van Dockum WG, Visser CA, van Rossum AC. Delayed contrast-enhanced magnetic resonance imaging for the prediction of regional functional improvement after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:895–901.
  49. Fuster V, Sanz J, Viles-Gonzalez JF, Rajagopalan S. The utility of magnetic resonance imaging in cardiac tissue regeneration trials. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006;3(suppl 1):S2–S7.

### CLINICAL PERSPECTIVE

Beyond time to reperfusion (the major determinant for myocardial salvage in acute myocardial infarction), interventions to reduce myocardial death (cardioprotection) are strongly needed to move ahead in this field.  $\beta$ -Blockers have been shown to reduce mortality in the acute myocardial infarction setting, but early intravenous administration before mechanical reperfusion is not widely adopted. In fact, ST-segment–elevation myocardial infarction practice guidelines catalogue oral  $\beta$ -blocker administration as a class I indication; the intravenous route is a class IIA indication. In the era of mechanical reperfusion for ST-segment elevation myocardial infarction, the reperfusion injury is a frequently observed phenomenon. It has been suggested that some cardioprotective therapies may act by reducing this reperfusion-related incident. If this were the case, effective circulating levels of the eventually cardioprotective drug at reperfusion would be crucial. Whether the cardioprotection observed in this study is related to a reduction in reperfusion-related myocyte loss is not addressed, but it is plausible and therefore deserves to be fully elucidated. Cardiac magnetic resonance imaging allows direct visualization of cardioprotection early after acute myocardial infarction, as shown here. This provides an accurate tool to explore the effect of certain interventions in humans. In this work, the extent of salvaged myocardium, as directly assessed by cardiac magnetic resonance imaging 4 days after acute myocardial infarction, correlated with the local and global left ventricular motion recovery. This novel predictor of left ventricular recovery may be used in the clinical area as a surrogate end point for early assessment of cardioprotective-regenerative therapies.



## The cardioprotection granted by metoprolol is restricted to its administration prior to coronary reperfusion

Borja Ibanez<sup>a,b</sup>, Giovanni Cimmino<sup>a</sup>, Susanna Prat-González<sup>a</sup>, Gemma Vilahur<sup>c</sup>, Randolph Hutter<sup>a</sup>, Mario J. García<sup>a</sup>, Valentin Fuster<sup>a,b</sup>, Javier Sanz<sup>a</sup>, Lina Badimon<sup>c</sup>, Juan J. Badimon<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Atherothrombosis Research Unit, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, USA

<sup>b</sup> Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (C.N.I.C.), Madrid, Spain

<sup>c</sup> Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, UAB, Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 June 2009

Received in revised form 17 August 2009

Accepted 1 September 2009

Available online 12 November 2009

#### Keywords:

Myocardial infarction

Reperfusion injury

Beta-blockers

MRI

Cardioprotection

Myocardial salvage

### ABSTRACT

**Background:** Myocardial infarct size is a strong predictor of cardiovascular events. Intravenous metoprolol before coronary reperfusion has been shown to reduce infarct size; however, it is unknown whether oral metoprolol initiated early after reperfusion, as clinical guidelines recommend, is similarly cardioprotective. We compared the extent of myocardial salvage associated with intravenous *pre-reperfusion-metoprolol* administration in comparison with oral *post-reperfusion-metoprolol* or *placebo*. We also studied the effect on suspected markers of reperfusion injury.

**Methods:** Thirty Yorkshire-pigs underwent a reperfused myocardial infarction, being randomized to pre-reperfusion-metoprolol, post-reperfusion-metoprolol or placebo. Cardiac magnetic resonance imaging was performed in eighteen pigs at day 3 for the quantification of salvaged myocardium. The amounts of at-risk and infarcted myocardium were quantified using T2-weighted and post-contrast delayed enhancement imaging, respectively. Twelve animals were sacrificed after 24 h for reperfusion injury analysis.

**Results:** The pre-reperfusion-metoprolol group had significantly larger salvaged myocardium than the post-reperfusion-metoprolol or the placebo groups ( $31 \pm 4\%$ ,  $13 \pm 6\%$ , and  $7 \pm 3\%$  of myocardium at-risk respectively). Post-mortem analyses suggest lesser myocardial reperfusion injury in the pre-reperfusion-metoprolol in comparison with the other 2 groups (lower neutrophil infiltration, decreased myocardial apoptosis, and higher activation of the salvage-kinase phospho-Akt). Salvaged myocardium and reperfusion injury pair wise comparisons proved there were significant differences between the pre-reperfusion-metoprolol and the other 2 groups, but not among the latter two.

**Conclusions:** The intravenous administration of metoprolol before coronary reperfusion results in larger myocardial salvage than its oral administration initiated early after reperfusion. If confirmed in the clinical setting, the timing and route of  $\beta$ -blocker initiation could be revisited.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The intravenous (i.v.) administration of the  $\beta$ -blocker metoprolol during ongoing ischemia has been shown to increase myocardial salvage [1]. However, the mechanisms responsible for the observed cardioprotection remain elusive. Clinical guidelines recommend the oral administration of  $\beta$ -blockers in patients with acute myocardial infarction (MI) [2]; though, whether the oral administration of metoprolol, initiated early after coronary reperfusion, as current clinical practice guidelines recommend [2], exerts similar effect on myocardial salvage is also unknown.

Indirect evidence suggest that the early i.v. initiation of  $\beta$ -blockers before mechanical reperfusion result in less cardiovascular events and

improved myocardial recovery [3], however a study systematically comparing the pre-reperfusion  $\beta$ -blocker administration vs. the oral post-reperfusion route of administration is lacking. The understanding of the impact of the time of  $\beta$ -blocker initiation may have clinical implications, since the early i.v. route of  $\beta$ -blocker initiation is not encouraged [2,4].

Recent literature supports the notion that metoprolol can block the migration of neutrophils both in vitro [5] and in vivo [6], and also display antiapoptotic properties in different conditions like heart failure [7]. Both mechanisms (neutrophil infiltration and apoptosis) have been proposed as major contributors to reperfusion injury [8,9]. Therefore, we hypothesized that the cardioprotective effect of metoprolol could be mediated via reduction in reperfusion injury, and therefore restricted to its administration before the restoration of coronary flow.

The aims of the present work were to compare the extent of myocardial salvage associated with the pre-reperfusion i.v. administration

\* Corresponding author. ATRU, Mount Sinai School of Medicine. One Gustave L. Levy Place, Box 1030. New York NY 10029, USA. Tel.: +1 212 241 8484; fax: +1 212 426 6962.  
E-mail address: [juan.badimon@mssm.edu](mailto:juan.badimon@mssm.edu) (J.J. Badimon).

of metoprolol in comparison with its oral post-reperfusion initiation. We additionally studied the effect of metoprolol administration on suspected markers of myocardial reperfusion injury.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study design

A reperfused anterior MI was induced in thirty male Yorkshire Albino pigs (weight  $28 \pm 0.5$  kg). Animals were randomized 1:1:1 to 1) i.v. metoprolol before reperfusion followed by oral metoprolol after reperfusion (*pre-reperfusion-metoprolol group*), 2) i.v. placebo before reperfusion followed by oral metoprolol after reperfusion (*post-reperfusion-metoprolol group*) or 3) i.v. placebo before reperfusion alone (*placebo group*). Eighteen animals underwent cardiac magnetic resonance imaging (MRI) 72 h post-MI for the quantification of left ventricular (LV) functional parameters, area of myocardium at-risk, and MI size, as previously validated [1]. Twelve pigs (4 in each group) were sacrificed 24 h after reperfusion for further evaluation of reperfusion injury. The study protocol was approved by the Mount Sinai School of Medicine animal research committee. All animals received humane care in compliance with the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals."

### 2.2. Experimental procedures

Acute MIs were experimentally created as previously described [1]. In summary, anaesthesia was induced by intramuscular injection of ketamine (30 mg/kg), xylazine (2.2 mg/kg), and atropine (0.05 mg/kg). Animals underwent endotracheal intubation, and anaesthesia was maintained by isoflurane inhalation. A continuous infusion of amiodarone (300 mg, 75 mg/h) was initiated at the beginning of the procedure in all pigs as prophylaxis for malignant ventricular arrhythmias [1]. The left anterior descending (LAD) coronary artery was occluded for 90 min with an angioplasty balloon via percutaneous femoral approach. The site of occlusion was immediately distal to the origin of the first diagonal branch. Thirty minutes after coronary occlusion, 7.5 mg of i.v. metoprolol were infused in the pre-reperfusion-metoprolol group: three 2.5 mg boluses of metoprolol tartrate (1 mg/ml ampuls, Hospira Inc., Lake Forest, IL, USA) every 3–5 min. Animals in the post-reperfusion-metoprolol and the placebo groups received equal amounts of placebo (saline) infusion following the same timing and intervals. The medication (injectable metoprolol or placebo) was prepared in non-labelled syringes before the MI induction, and administered by operators blinded to the randomization.

Animals allocated to the pre- and the post-reperfusion-metoprolol groups received 50 mg of oral metoprolol (metoprolol tartrate, UDL Laboratories, Inc., Rockford, IL, USA) every 12 h for the entire duration of each protocol, starting after reperfusion. Buprenorphine (0.03 mg/kg) and cefazoline (25 mg/kg) were additionally administered every 12 h in all animals.

### 2.3. Non-invasive MRI protocol

For the MRI studies, pigs were anesthetized by intramuscular injection of ketamine, xylazine, and atropine. Anaesthesia was maintained by continuous propofol i.v. infusion, and animals were kept under mechanical ventilation. MRI studies were performed with a 1.5T magnet (Magnetom Sonata<sup>®</sup>, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany) by operators blinded to the study arm, following a protocol previously reported [1]. In summary, images were acquired with electrocardiographic gating and during suspended respiration. First, contiguous short-axis cine images covering the LV from base to apex (slice thickness 6 mm, no gap) were acquired for the quantification of functional LV parameters. Oedema imaging (for the quantification of area of myocardium at-risk) [10] was performed with a T2-weighted, triple inversion-recovery fast spin-echo sequence. Delayed enhancement (DE) imaging was performed 15 min after the administration of 0.2 mmol/kg of gadopentate dimeglumine using an inversion-recovery fast gradient echo sequence. The slice positions for both T2-

weighted and DE acquisitions matched those of the cine images. Detailed imaging parameters have been previously reported [1].

### 2.4. MRI data analysis

All MRI images were analyzed blinded to the study allocation. LV function analysis was performed using dedicated software (Argus<sup>®</sup>, Siemens Medical Solutions). Epicardial and endocardial borders were traced in each cine image to obtain LV end-diastolic volume (LVEDV), end-systolic volume (LVESV) and LVEF. The area of myocardium at-risk was defined as the extent of the LV demonstrating high signal intensity on T2-weighted images [11]. MI size was quantified from the extent of abnormal DE [12]. Oedema and DE were defined as those myocardial regions demonstrating signal intensity 3 standard deviations above the average signal of normal, remote myocardium, and quantified as previously validated by using prototype analysis software (VPT<sup>®</sup>, Siemens Corporate Research, New Jersey) [1]. MI size and salvaged myocardium are expressed as percentage of the area of myocardium at-risk and/or the LV. See Fig. 1.

### 2.5. Reperfusion injury analysis

Reperfusion injury was examined by studying 3 different processes: 1) myocardial inflammation (neutrophil infiltration in the ischemic area) [13], 2) myocardial apoptosis [9], and 3) activation of kinase Akt, a protein representative of the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK) pathway [14]. Twenty-four hours after reperfusion, twelve animals (4 in each group) were heparinized (100 IU/kg) and euthanized with pentobarbital (Sleepaway<sup>®</sup>, Fort Dodge, 75 mg/kg). The LAD was re-occluded (immediately distal to the first diagonal branch), and hearts retro-perfused with Evans Blue. Small pieces from the ischemic myocardium (negative for Evans Blue) were cut, washed carefully in sterile PBS and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until processed for myeloperoxidase (MPO) activity and protein expression.

Neutrophil infiltration of the ischemic area was determined by semi-quantitative colorimetric determination of MPO activity by using a commercially available kit (Myeloperoxidase Assay Kit, CytoStore, Calgary, Alberta, Canada). Frozen myocardial tissue was pulverized and 50  $\mu\text{g}$  of tissue were weighed and homogenized in the sample buffer enclosed in the kit. After adding the development reagent, the absorbance (at 450 nm) was measured at 1 min intervals. Results are expressed as MPO units per mg of tissue. Apoptosis was measured by assessing the protein expression of cleaved caspase-3. Finally, Phospho-Akt (P-Akt) protein levels were assessed in order to explore the degree of activation of the RISK pathway.

Protein expression was performed by Western blot analyses as previously reported [15]. Antibodies were purchased from StressGen (caspase-3) and cell signaling (P-Akt).

### 2.6. Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. Statistical comparisons of means were made by ANOVA. When differences were found, Turkey's multiple pair wise comparisons tests were performed. A value of  $p < 0.05$  (two-tailed) was considered statistically significant. All statistical analyses were performed with the statistical software package SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The authors had full access to the data and take responsibility for its integrity. All authors have read and agree to the manuscript as written.

## 3. Results

All three groups showed a similar mean heart rate during the procedure ( $66 \pm 2$ ,  $69 \pm 3$  and  $66 \pm 3$  bpm for the pre-reperfusion-, post-reperfusion-metoprolol and placebo groups, respectively;  $P = \text{NS}$ ).



**Fig. 1.** Visualization of cardioprotection by magnetic resonance imaging (MRI). MRI short axis images obtained at the same left ventricular level 3 days after MI induction in a pre-reperfusion-metoprolol-treated animal. Panel A shows a T2-weighted, fast spin-echo image, where the hyperintense area indicates the presence of edema. Panel B shows a delayed enhancement image after contrast administration, depicting the infarcted area (bright). In panel C, the area at risk (edema, blue) and infarcted area (red inside the blue region) shown in panels A and B are merged. Non-ischemic myocardium is shown in yellow. Note the large salvaged myocardium (blue area surrounding the infarcted red zone).



**Table 1**  
Magnetic resonance imaging-derived parameters.

	Pre-reperfusion-metoprolol	Post-reperfusion-metoprolol	Placebo
LVEDV (ml)	92 ± 5	97 ± 7	116 ± 12
LVESV (ml)	58 ± 2	63 ± 6	75 ± 13
LVEF (%)	36.2 ± 2.9	35.3 ± 3.6	34.3 ± 5.3
Myocardium at-risk (% of LV)	37.6 ± 2.1	40.1 ± 4.3	32.1 ± 1.9
Salvaged myocardium (% of myocardium at-risk)	30.8 ± 4.0*†	13.1 ± 6.2	7.4 ± 3.2

LV: left ventricle; LVEDV: left ventricular end-diastolic volume; LVEF: left ventricular ejection fraction; LVESV: left ventricular end-systolic volume.

\* $p = 0.04$  vs. post-reperfusion-metoprolol group. † $p = 0.005$  vs. placebo group.

All other  $p$  values were not significant.

Data is expressed as mean ± standard error of the mean.  $N = 18$  (6 per group).

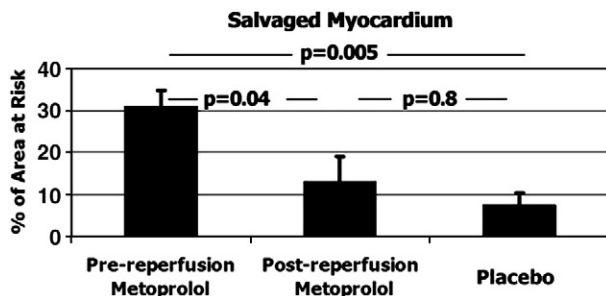
### 3.1. Effect of different regimes of metoprolol administration on LV function and myocardial salvage

The results of MRI-derived parameters are presented in Table 1. In summary, there were no significant differences in LV volumes or LV ejection fraction (LVEF) 72h post-MI amongst the 3 study groups. Similarly, the extent of myocardium at-risk did not significantly differ. Myocardial salvage was significantly larger only in the pre-reperfusion-metoprolol group. The extent of salvaged myocardium was  $31 \pm 4\%$  of the area at risk in the pre-reperfusion-metoprolol group, compared to  $13 \pm 6\%$  in the post-reperfusion-metoprolol group ( $p = 0.04$  vs. pre-reperfusion-metoprolol) and  $7 \pm 3\%$  in placebo group ( $p = 0.005$  vs. pre-reperfusion-metoprolol). There were no statistically significant differences in myocardial salvage between the post-reperfusion-metoprolol and placebo groups. See Fig. 2.

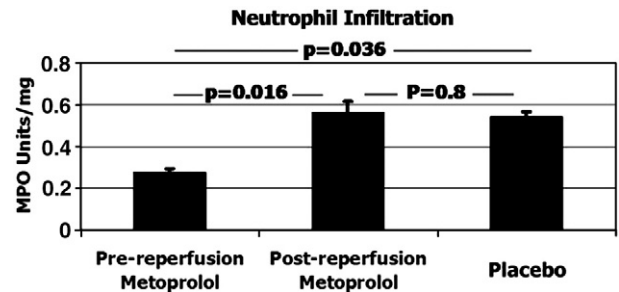
### 3.2. Effect of different regimes of metoprolol administration on reperfusion injury

Neutrophil-related inflammation was significantly lower in the pre-reperfusion-metoprolol group compared with the other two groups:  $0.27 \pm 0.02$  MPO units in pre-reperfusion-metoprolol,  $0.56 \pm 0.05$  in post-reperfusion-metoprolol ( $p = 0.016$  vs. pre-reperfusion-metoprolol), and  $0.54 \pm 0.02$  in placebo ( $p = 0.036$  vs. pre-reperfusion-metoprolol). There were no significant differences between the post-reperfusion-metoprolol and placebo groups. See Fig. 3.

A similar effect was observed for rates of apoptosis in the ischemic myocardium. Animals allocated to the pre-reperfusion-metoprolol group showed significantly lower levels of cleaved caspase-3 in the ischemic area compared to the other two groups:  $115 \pm 9$  arbitrary units in pre-reperfusion-metoprolol,  $153 \pm 15$  in post-reperfusion-metoprolol ( $p < 0.001$  vs. pre-reperfusion-metoprolol), and  $149 \pm 4$  in placebo ( $p < 0.01$  vs. pre-reperfusion-metoprolol). Again, there were no significant differences between the post-reperfusion-metoprolol and placebo groups, See Fig. 4.

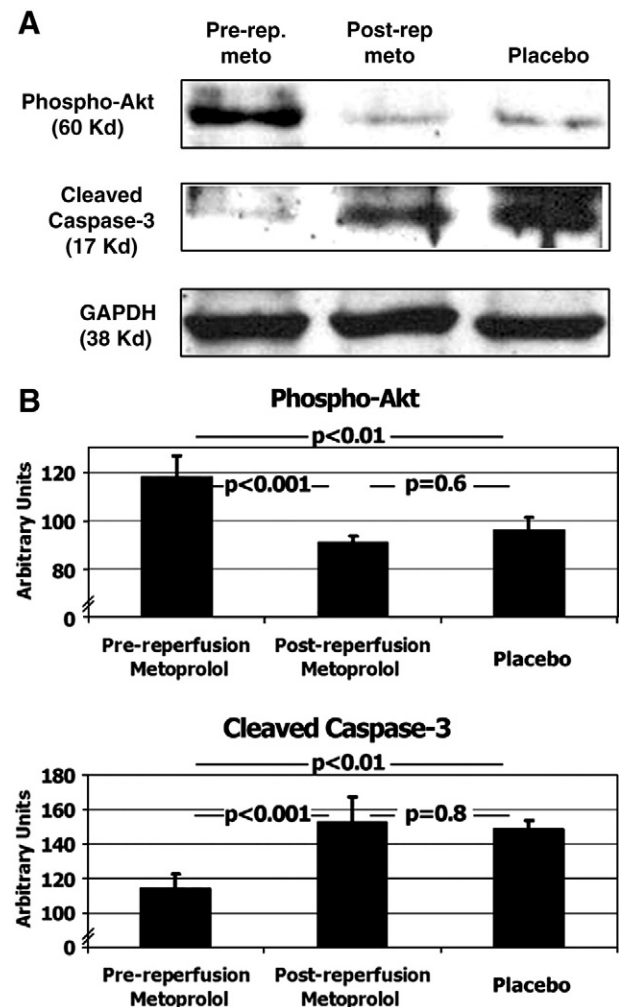


**Fig. 2.** MRI-based quantification of salvaged myocardium. Data is expressed as mean ± standard error of the mean.  $N = 18$  (6 per group).



**Fig. 3.** Neutrophil infiltration in the ischemic area. Myeloperoxidase (MPO) activity was determined by semi-quantitative colorimetric determination. Data is expressed as mean ± standard error of the mean of MPO activity units.  $N = 12$  (4 per group).

Conversely, the pre-reperfusion administration of metoprolol resulted in a significantly higher degree of RISK pathway activation, as evaluated by P-Akt protein expression. Levels of P-Akt in the pre-reperfusion-metoprolol group were significantly higher compared to the other 2 groups:  $118 \pm 9$ ,  $91 \pm 3$ , and  $96 \pm 5$  arbitrary units respectively. Differences were significant between the pre-reperfusion-metoprolol group and the other 2 groups ( $p < 0.001$  and  $p < 0.01$  respectively), but not between the post-reperfusion-metoprolol and placebo groups. See Fig. 4.



**Fig. 4.** Protein expression of markers of reperfusion injury. Western blotting (Panel A), and its quantification by densitometric units (Panel B, expressed as mean ± standard error of the mean) of phospho-Akt and cleaved caspase-3 in animals allocated to the pre-reperfusion-metoprolol, post-reperfusion-metoprolol and placebo. See also text. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).  $N = 12$  (4 per group).



#### 4. Discussion

Myocardial infarct size has been shown to be a strong predictor of cardiovascular events [16]. Beyond early reperfusion (the major determinant of cardioprotection [17]), therapies that can reduce the size of MI are strongly needed [18].

$\beta$ -blockers are of clinical value in the setting of acute MI, with a large body of evidence showing mortality reductions when administered early [19]. The use of oral  $\beta$ -blockade constitutes a class I indication in clinical practice guidelines [20]; however, its i.v. administration during the acute phase of MI has not been universally adopted [21,22]. Furthermore, due to the current lack of substantiation of benefits, the early i.v. route of administration has been recently discouraged [2,4]. The cardioprotective effect of many interventions has been shown to be restricted to its administration either before or at early stages of reperfusion. Following our previous observation the administration of metoprolol increases myocardial salvage [1], we wanted to investigate whether its cardioprotective effect was restricted to its administration before reperfusion. Using *state-of-the-art* MRI, we have found that the pre-reperfusion administration of i.v. metoprolol results in a significant  $\approx 2.5$ -fold increase in myocardial salvage in comparison with its oral administration only after reperfusion. To the best of our knowledge, this is the first study systematically comparing the pre-reperfusion  $\beta$ -blocker administration vs. the oral post-reperfusion route of administration.

In the human setting, the impact of prior  $\beta$ -blockade on MI size was analyzed by Sharma et al. [23]. They showed that patients that were already on  $\beta$ -blockers before an AMI had consistently smaller MIs than those who were not on  $\beta$ -blockers before the ischemic event. Even though these results, added to the pre-clinical data of the current study, might represent an argument to prescribe  $\beta$ -blockers in high risk patients, its practical value is unknown. Conversely, the impact of i.v.  $\beta$ -blockade before reperfusion (and after AMI initiation) was studied in a post-hoc retrospective analysis of the CADILLAC (Controlled Abciximab and Device Investigation to Lower Late Angioplasty Complications) trial [3]. Despite there was no assessment of MI size, the 30-mortality was significantly lower in the group of patients receiving i.v.  $\beta$ -blockers before reperfusion [3]. In addition, the myocardial recovery at 7 months was significantly improved in the pre-reperfusion i.v.  $\beta$ -blocker patients [3]. Our results are in agreement with these, showing that the timing of  $\beta$ -blocker initiation has a significant impact on the final size of MI, being the latter a strong predictor of cardiovascular events [16]. If our results are replicated in the clinical area, the timing and route of administration of  $\beta$ -blockers might be revisited for patients with no contraindications.

The mechanism by which metoprolol is cardioprotective remains unknown. Potential mechanisms include the reduction of oxygen demand, secondary to heart rate reduction during ongoing ischemia, the increase of collateral flow or the reduction of reperfusion injury. In a previous study we observed that the MI reduction granted by metoprolol was independent to its negative chronotropic effect [1] in an animal model lacking collateral coronary blood flow [24]. Here, we have confirmed that the effect on myocardial salvage is independent to the heart rate achieved during ischemia, which was similar in all 3 groups. The similar heart rate in all 3 groups, regardless metoprolol infusion, was due to the administration of amiodarone as prophylaxis for malignant ventricular arrhythmias. Therefore, we speculated that metoprolol could reduce the extent of necrosis via reduction of reperfusion injury. Early neutrophil infiltration and myocardial apoptosis are among the specific pathological events associated with reperfusion injury in various organs, including heart, brain and kidney [8,9,13,25,26]. Conversely, the activation of a “programmed defense mechanism” called the RISK pathway protects the myocardium from reperfusion injury. The degree of activation of this pathway modulates the extent of myocardial salvage and thus the resulting MI size [14,27].

We observed that myocardial neutrophil infiltration was significantly reduced only in the pre-reperfusion-metoprolol group. These results suggest anti-inflammatory effects of metoprolol in ischemia-

reperfusion injury, in agreement with similar observations reported after spinal cord trauma [6]. Furthermore, previous *in vitro* studies have evidenced the inhibition of neutrophils chemotaxis by metoprolol [5], suggesting a direct effect of the latter on neutrophils. Even though early neutrophil infiltration is considered a specific feature of ischemia/reperfusion injury, it cannot be completely ruled out that the lower inflammation was the result of a reduced ischemic insult.

In addition, we have found a significant reduction in the protein expression of cleaved caspase-3, suggesting a reduction in myocardial apoptotic death when metoprolol is initiated before reperfusion. Apoptotic cell death after an acute MI is a recognized phenomenon linked to reperfusion [26]. In fact, the administration of inhibitors of apoptosis after the onset of ischemia but before reperfusion has been shown to limit MI size [28]. This effect is not restricted to the heart. Daemen and colleagues proved that the pre-reperfusion administration of a caspase-inhibitor diminished the reperfusion injury in a model of renal ischemia. Interestingly, when the caspase-inhibitor was administered few hours after reperfusion, these reno-protective effects were completely abrogated [8]. In our work, when metoprolol was administered after reperfusion, its salutary effects on apoptosis limitation were also abrogated. The antiapoptotic activity of metoprolol has been also shown in experimental models of heart failure [7]. Our results confirm the antiapoptotic properties of metoprolol in different cardiac conditions. In this regard, another  $\beta$ -blocker, carvedilol, has been shown to prevent the myocardial ischemia/reperfusion-induced apoptosis in a rabbit model of MI when administered before coronary reperfusion [29]. Our results confirm the latter by showing the anti reperfusion-induced apoptotic myocardial death by a different  $\beta$ -blocker agent. Altogether, our results suggest that the administration of metoprolol during ongoing ischemia may reduce the ischemia-reperfusion injury, contributing to the infarct size reduction achieved by metoprolol.

#### 5. Conclusions

In an animal model of acute myocardial infarction, we have studied the effect of metoprolol on myocardial infarct size and on suspected markers of reperfusion injury. Here we show that the cardioprotective effect of metoprolol, as evaluated 3 days post-AMI, is restricted to its administration prior to reperfusion (during ongoing ischemia). The cardioprotection granted by the intravenous pre-reperfusion-metoprolol administration was associated with a significant reduction in myocardial apoptosis and neutrophil infiltration, suggesting that metoprolol's cardioprotective effects could be mediated, at least in part, via reduction in reperfusion injury. If confirmed in human studies, the timing and route of  $\beta$ -blockade in acute myocardial infarction might be revisited.

#### Acknowledgements

BI was granted by the Working Group on Ischemic Heart Disease of the Spanish Society of Cardiology, SP by a Fellowship of Fundación CajaMadrid, and GV is a Juan de la Cierva investigator of MEC. GV and LB are members of CIBEROBN-Institute Carlos III and are funded by PNS 2006-10091 from MEC, Spain.

The authors of this manuscript have certified that they comply with the Principles of Ethical Publishing in the International Journal of Cardiology [30].

#### References

- [1] Ibanez B, Prat-Gonzalez S, Speidl WS, et al. Early metoprolol administration before coronary reperfusion results in increased myocardial salvage: analysis of ischemic myocardium at risk using cardiac magnetic resonance. *Circulation* 2007;115:2909–16.
- [2] Antman EM, Hand M, Armstrong PW, et al. 2007 Focused Update of the ACC/AHA 2004 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: developed in collaboration With the Canadian Cardiovascular Society endorsed by the American Academy of Family

- Physicians: 2007 Writing Group to Review New Evidence and Update the ACC/AHA 2004 Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction, Writing on Behalf of the 2004 Writing Committee. *Circulation* 2008;117:296–329.
- [3] Halkin A, Grines CL, Cox DA, et al. Impact of intravenous beta-blockade before primary angioplasty on survival in patients undergoing mechanical reperfusion therapy for acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:1780–7.
  - [4] Bates ER. Role of intravenous beta-blockers in the treatment of ST-elevation myocardial infarction: of mice (dogs, pigs) and men. *Circulation* 2007;115:2904–6.
  - [5] Dunzendorfer S, Wiedermann CJ. Modulation of neutrophil migration and superoxide anion release by metoprolol. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:915–24.
  - [6] Beril Gok H, Solaroglu I, Okutan O, Cimen B, Kaptanoglu E, Palaoglu S. Metoprolol treatment decreases tissue myeloperoxidase activity after spinal cord injury in rats. *J Clin Neurosci* 2007;14:138–42.
  - [7] Prabhu SD, Wang G, Luo J, Gu Y, Ping P, Chandrasekar B. Beta-adrenergic receptor blockade modulates Bcl-X(S) expression and reduces apoptosis in failing myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:483–93.
  - [8] Daemen MA, van 't Veer C, Denecker G. Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation. *J Clin Invest* 1999;104:541–9.
  - [9] Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, et al. Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovasc Res* 2000;45:651–60.
  - [10] Garcia-Dorado D, Oliveras J, Gili J, et al. Analysis of myocardial oedema by magnetic resonance imaging early after coronary artery occlusion with or without reperfusion. *Cardiovasc Res* 1993;27:1462–9.
  - [11] Aletras AH, Tilak GS, Natanzon A, et al. Retrospective determination of the area at risk for reperfused acute myocardial infarction with T2-weighted cardiac magnetic resonance imaging: histopathological and displacement encoding with stimulated echoes (DENSE) functional validations. *Circulation* 2006;113:1865–70.
  - [12] Kim RJ, Judd RM, Chen EL, Fieno DS, Parrish TB, Lima JA. Relationship of elevated <sup>23</sup>Na magnetic resonance image intensity to infarct size after acute reperfused myocardial infarction. *Circulation* 1999;100:185–92.
  - [13] Vedder NB, Winn RK, Rice CL, Chi EY, Arfors KE, Harlan JM. Inhibition of leukocyte adherence by anti-CD18 monoclonal antibody attenuates reperfusion injury in the rabbit ear. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:2643–6.
  - [14] Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* 2004;61:448–60.
  - [15] Ibanez B, Vilahur G, Cimmino G, et al. Rapid change in plaque size, composition and molecular footprint following recombinant ApoA-I<sub>Milano</sub> (ETC-216) administration. Magnetic resonance imaging study in an experimental model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:1104–9.
  - [16] Wu E, Ortiz JT, Tejedor P, et al. Infarct size by contrast enhanced cardiac magnetic resonance is a stronger predictor of outcomes than left ventricular ejection fraction or end-systolic volume index: prospective cohort study. *Heart* 2008;94:730–6.
  - [17] 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;56:786–94.
  - [18] Yellon DM, Baxter GF. Protecting the ischaemic and reperfused myocardium in acute myocardial infarction: distant dream or near reality? *Heart* 2000;83:381–7.
  - [19] Kloner RA, Rezkalla SH. Cardiac protection during acute myocardial infarction: where do we stand in 2004? *J Am Coll Cardiol* 2004;44:276–86.
  - [20] Antman EM, Anbe DT, Armstrong PW, 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). *Circulation* 2004;110:e82–e292.
  - [21] Ellerbeck EF, Bhimraj A, Hall S. Impact of organizational infrastructure on beta-blocker and aspirin therapy for acute myocardial infarction. *Am Heart J* 2006;152:579–84.
  - [22] Daly C, Clemens F, Lopez-Sendon JL, et al. The impact of guideline compliant medical therapy on clinical outcome in patients with stable angina: findings from the Euro Heart Survey of stable angina. *Eur Heart J* 2006;27:1298–304.
  - [23] Sharma SK, Kini A, Marmur JD, Fuster V. Cardioprotective effect of prior beta-blocker therapy in reducing creatine kinase-MB elevation after coronary intervention: benefit is extended to improvement in intermediate-term survival. *Circulation* 2000;102:166–72.
  - [24] Chorro FJ, Such-Belenguer L, Lopez-Merino V. Animal models of cardiovascular disease. *Rev Esp Cardiol* 2009;62:69–84.
  - [25] Basso C, Thiene G. The pathophysiology of myocardial reperfusion: a pathologist's perspective. *Heart* 2006;92:1559–62.
  - [26] Zhao ZQ, Velez DA, Wang NP, et al. Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion. *Apoptosis* 2001;6:279–90.
  - [27] Heusch G, Boengler K, Schulz R. Cardioprotection: nitric oxide, protein kinases, and mitochondria. *Circulation* 2008;118:1915–9.
  - [28] Zhao ZQ, Morris CD, Budde JM, et al. Inhibition of myocardial apoptosis reduces infarct size and improves regional contractile dysfunction during reperfusion. *Cardiovasc Res* 2003;59:132–42.
  - [29] Yue TL, Ma XL, Wang X, et al. Possible involvement of stress-activated protein kinase signaling pathway and Fas receptor expression in prevention of ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis by carvedilol. *Circ Res* 1998;82:166–74.
  - [30] Coats AJ. Ethical authorship and publishing. *Int J Cardiol* 2009;131:149–50.