



Mayor densidad vascular con revascularización miocárdica indirecta en corazones normales de ratas

Increased vascular density with indirect myocardial revascularization in normal rat hearts

Carlos Riera-Kinkel,^a Rubén Argüero-Sánchez,^a Enrique Foyo-Niembro,^a Emilio Castellanos,^b Patricia Bravo-Ontiveros,^c Julio García-Hernández^c

Introducción: el objetivo de este trabajo fue identificar si la interacción de los métodos de revascularización miocárdica incrementa el área vascular funcional.

Métodos: se realizó un estudio con un diseño factorial de 4x3 en 11 grupos, de cinco ratas por grupo, diez muestras por rata, evaluado a 45 días del posoperatorio, con las diferentes combinaciones quirúrgicas. La magnitud de la interacción fue evaluada tanto por inmunexpresión del factor vascular de crecimiento derivado del endotelio, factor de crecimiento de fibroblastos y receptor de tirosina, para permitir la actividad del factor vascular de crecimiento derivado del endotelio, factor de crecimiento de fibroblastos y trombina (Flk-1), así como de la medición del área vascular; ambas medidas fueron realizadas por morfometría computarizada.

Resultados: se identificó un incremento de la expresión inmunohistoquímica y del área vascular en proporción directa con la interacción; se puede afirmar (ANOVA $p < 0.0001$), que con la interacción de todas las maniobras se logra el efecto máximo.

Conclusiones: se demuestra que la revascularización miocárdica indirecta tiene un peso específico dentro de la revascularización miocárdica integral con un impacto real en el costo-beneficio y el costo-efectividad.

Keywords Palabras clave

Cardiac surgical procedures	Procedimientos quirúrgicos cardíacos
Myocardial revascularization	Revascularización miocárdica
Blood proteins	Proteínas sanguíneas

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares son, en la actualidad, la primera causa de muerte en el mundo.¹ Los eventos que de estas enfermedades se originan, tales como la cardiopatía isquémica, han sufrido notables cambios en las últimas décadas, derivados de las modificaciones tanto de los hábitos higiénico-dietéticos como del entorno biopsicosocial de las comunidades, especialmente aquellas en vías de desarrollo, como México.

En los Estados Unidos de Norteamérica (EE. UU.), en 1983, se reportaron 180 000 nuevos casos de cardiopatía isquémica, y diez años más tarde hubo 300 000 casos, lo que implica un crecimiento importante de la demanda de tratamiento, que genera un costo promedio anual de 50 billones de dólares.²

La tasa de mortalidad por cardiopatía isquémica en México (1999) fue de 1/44.9 pacientes, y se reportaron 44 070 nuevos casos, de los cuales 11 418 fueron pacientes en edad productiva.³ El registro más grande realizado en los EE. UU. reporta que de 1984 a 1990 se diagnosticó cardiopatía isquémica a 894 223 pacientes, de los cuales 684 286 (77%) requirieron tratamiento quirúrgico.

Tal circunstancia ha repercutido en el incremento del número de métodos de revascularización, de los cuales conocemos dos tipos: revascularización miocárdica directa y revascularización miocárdica indirecta;¹ este último método ha sido desplazado por la revascularización miocárdica directa, debido al éxito terapéutico que ha demostrado; sin embargo, a principios de la década de los ochenta del siglo pasado se replantearon las técnicas de revascularización miocárdica indirecta, con el objetivo de solucionar la angina rebelde al tratamiento médico en el 24% de los pacientes sin la opción de tratamiento quirúrgico.⁴

La revascularización miocárdica directa está representada por la angioplastia coronaria y por la colocación de puentes aorto-coronarios, cuyo objetivo es incrementar el flujo coronario efectivo, pero en una misma área vascular, la cual también tiene alteraciones estructurales;⁵ mientras que la revascularización miocárdica indirecta está dirigida a incre-

^aServicio de Cirugía Cardiorácica

^bServicio de Patología

^cBioterio

^{a-c}Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

Comunicación con: Carlos Riera Kinkel

Teléfono: (55) 5627 6927

Correo electrónico: rierac7@gmail.com

Recibido: 25/09/2015

Aceptado: 01/07/2016

Background: The aim of this study was to identify if the interaction of myocardial revascularization methods increases the functional vascular area.

Methods: A 4x3 factorial design was performed in 11 groups, five rats per group, ten samples per rat, evaluated at 45 days postoperative, with different surgical combinations. The magnitude of the interaction was evaluated by immunoexpression of vascular endothelium-derived growth factor, fibroblast growth factor and tyrosine receptor, to allow the activity of vascular endothelium-derived growth factor, fibroblast growth factor and thrombin (Flk-1), as well as vascular area

measurement; Both measures were performed by computerized morphometry.

Results: An increase in immunohistochemical expression and vascular area in direct proportion to the interaction was identified; It can be affirmed (ANOVA $p < 0.0001$), that with the interaction of all the maneuvers the maximum effect is achieved.

Conclusions: It is demonstrated that indirect myocardial revascularization has a specific weight within the integral myocardial revascularization with a real impact on cost-benefit and cost-effectiveness.

Abstract

mentar el área vascular efectiva, lo que favorece la perfusión miocárdica cuyo efecto final es el incremento del flujo coronario, restableciendo entonces la proporción entre el área vascular y la masa ventricular.⁶

Ambos procedimientos encuentran sus limitaciones en la naturaleza progresiva de la enfermedad aterosclerótica, la cual se manifiesta en la revascularización miocárdica directa, con la necesidad de reintervención a largo plazo (40% a 10 años) y la sobrevida (40% a 10 años).⁴ El incremento abrupto del flujo coronario efectivo condiciona la reducción del 30% de los vasos colaterales, lo cual podría ser responsable de la mayoría de los infartos perioperatorios.¹

Por otra parte, la revascularización miocárdica indirecta puede ser más lenta, pero sus efectos son más duraderos, lo que podría repercutir notablemente en los periodos libres de enfermedad y en la calidad de la sobrevida de estos pacientes. De tal forma que la lógica es la implementación conjunta de ambos procedimientos, dirigiéndose hacia el concepto moderno de revascularización miocárdica integral, la cual se enfoca a incrementar rápidamente el flujo coronario efectivo, a no perder los vasos colaterales, a incrementar el área vascular funcional y/o la densidad vascular, equiparando la proporción entre masa irrigada e irrigación.

El objetivo de este estudio fue: a) determinar la magnitud del efecto, consecuencia de la adición de los métodos de revascularización miocárdica en ratas sin isquemia, sobre el incremento de la proporción del área vascular efectiva (densidad vascular), y b) determinar la correlación existente entre la magnitud del incremento de la proporción del área vascular efectiva y la magnitud del incremento de la proporción de la immunoexpresión de elementos intermedios (factor vascular de crecimiento derivado del endotelio (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y receptor de tirosina para permitir la actividad del factor vascular de crecimiento derivado

del endotelio, factor de crecimiento de fibroblastos y trombina (Flk-1), identificados mediante morfometría computarizada).

Métodos

Lugar de estudio: Departamento de Cirugía experimental. Bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

Patología: Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Departamento de Investigación en Enfermedades Oncológicas.

Definición operativa de las variables

Variable dependiente (efecto)

- Proporción del área vascular efectiva y/o densidad vascular.
- *Definición conceptual:* se refiere al porcentaje de área vascular en relación al 100% del campo microscópico a 400x, el cual representa 17 624 μ .
- *Descripción operativa:* la proporción normal de área vascular es del 10%, en relación a un 90% de la masa ventricular.
- *Escala cuantitativa:* numérica (porcentaje).

Variables intermedias (efecto intermedio)

- *Proporción (%) de la reacción immuno-específica:* área bajo la curva de la expresión immuno-histoquímica de: VEGF, FGF y Flk-1.
- a) Factor vascular de crecimiento derivado del endotelio (VEGF)
 - *Descripción conceptual:* factor de crecimiento vascular que participa en las etapas iniciales del

- proceso neoangiogénico y que determina la proliferación, migración y diferenciación celular.
- *Descripción operativa*: existe una correlación entre el grado de expresión y la magnitud del proceso neoangiogénico.
- *Escala cuantitativa*: subjetiva, numérica: número de células que expresan en su superficie el factor.
- *Objetiva: morfometría computarizada*: medida en escala ordinal (nula, leve, moderada y severa) eliminando tejido conectivo y núcleos celulares. Se transforma dicha medición integrando cada escala a una curva, expresada numéricamente en forma porcentual.
- b) Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)
 - *Descripción conceptual*: factor de crecimiento vascular que participa en las etapas finales del proceso neoangiogénico. Interviene en el proceso de maduración del primordio vascular y es capaz de provocar fisiológicamente la apertura de vasos colaterales.
 - *Descripción operativa*: igual que el VEGF, pero se espera que los niveles de FGF sean mucho más altos debido a que la etapa de evaluación es tardía para una rata.
 - *Escala cuantitativa*: la misma que el VEGF.
- c) Receptor de tirosina para permitir la actividad del factor vascular de crecimiento derivado del endotelio, factor de crecimiento de fibroblastos y trombina (Flk-1)
 - *Descripción conceptual*: receptor de tirosina para permitir la actividad del factor vascular de crecimiento derivado del endotelio, factor de crecimiento de fibroblastos y trombina. Su expresión denota el efecto real, pues se expresa en ambas etapas del proceso neoangiogénico.
 - *Descripción operativa*: igual al VEGF y FGF, se esperan niveles más elevados, es posible que prediga mejor el efecto neoangiogénico asociado al proceso lesivo. Su expresión no solo denota la participación del VEGF y FGF intramiocárdico sino también el extramiocárdico (epiplón).
 - *Escala cuantitativa*: numérica, (%) igual que VEGF y FGF.

Variable independiente (causa)

Epicardiotomía

- *Descripción conceptual*: participa como parte del proceso lesivo, el cual estimula la producción de VEGF y FGF. Permite la interacción de la superficie del miocardio con el sello de

fibrina y el epiplón, exponiendo los vasos epicárdicos.

- *Descripción operacional*: se medirá la presencia de la misma y su participación al efecto lesivo. Se realizan cinco abrasiones con lima de uñas sobre el epicardio del ápex ventricular.
- *Escala cualitativa*: nominal. Presencia/Ausencia.

Punción mecánica (acupuntura)

- *Descripción conceptual*: de ninguna forma busca el emular los corazones de reptiles con la formación de canales transmucosídicos, sino que funciona como otro factor lesivo, para la liberación de los factores de crecimiento y crear un trombo transmural.
- *Descripción operacional*: 10 punciones en el ápex ventricular (área de mayor espesor ventricular). Se medirá la presencia y/o ausencia de la misma y la participación sinérgica de la misma al proceso lesivo.
- *Escala cualitativa*: nominal. Presencia/Ausencia.

Sello de fibrina

- *Descripción conceptual*: participa de dos formas: Indirecta: matriz extracelular artificial. Directa: trombina; Estimula a Flk-1 e integrinas. Favorecen el proceso de adhesión, migración e integración del primordio vascular.
- *Descripción operativa*: 2 gotas aplicadas sobre la superficie ventricular.
- *Escala cuantitativa*: nominal. Presencia/Ausencia.

Epiplón (omentum)

- *Descripción conceptual*: es un donador natural y continuo de factores de crecimiento (FGF y VEGF). Fuente extramiocárdica.
- *Descripción operacional*: la presencia del epiplón sinergiza el efecto angiogénico.
- *Escala cualitativa*: nominal. Presencia/Ausencia.

Criterios de selección

- Ratas macho o hembras Sprague-Dawley, de peso entre 250 y 300 g.
- Aleatorización.
- Cumpliendo con los reglamentos de aseo y cuarentena.
- No embarazadas.
- Todas las ratas sometidas al procedimiento quirúrgico.

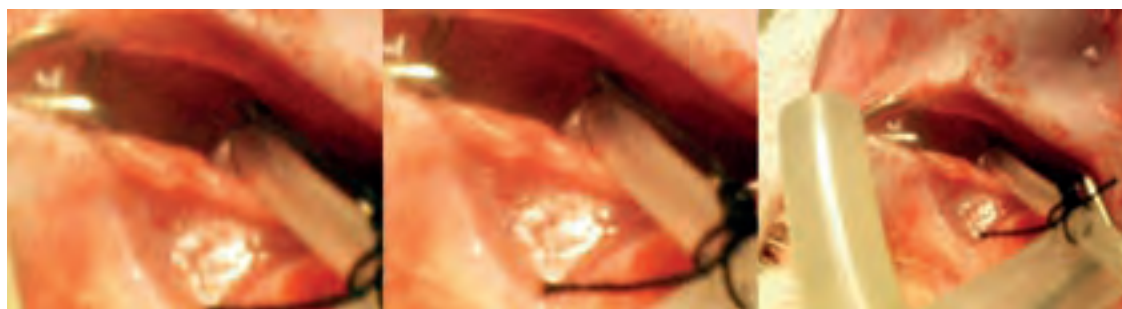


Figura 1
Traqueostomía

Descripción operativa (procedimiento quirúrgico) g) *Punción mecánica (figura 4).*

a) *Anestesia:*

- Se realiza anestesia de la rata mediante la aplicación IM de: ketamina: 90 mg/Kg; xilacina: 10 mg/Kg; atropina: 0.25 mg, intraperitoneal.

b) *Preparación del modelo:*

1. Rasurado de cuello a abdomen o tórax según sea el caso del procedimiento.
2. Fijación de extremidades con tela adhesiva a elemento de fijación de neopreno.
3. Monitorización electrocardiográfica.

c) *Traqueostomía (figura 1)*

1. Incisión longitudinal de 1 cm.
2. Disección de músculos pre-traqueales.
3. Colocación de sedas de fijación.
4. Incisión transversal de tráquea.
5. Introducción de cánula de silastic.
6. Se inicia ventilación mecánica con 2 cc de aire con mezcla del 60% de oxígeno.

d) *Toracotomía*

1. Se realiza una incisión postero-lateral izquierda.
2. Disección por planos de elementos musculares, hasta alcanzar la parrilla torácica.
3. Apertura de músculos intercostales y fijación de parrilla costal con blefarostatos.

e) *Fijación cardíaca (figura 2).*

- Se coloca un punto sobre el ápex ventricular para fijar el corazón.

f) *Epicardiotomía (figura 3).*

- Mediante una lima de uñas se realiza abrasión del epicardio en cinco ocasiones.

- Se realizan 10 punciones sobre el ápex ventricular (área de mayor tejido miocárdico), con jeringas de insulina de 1 mL y agujas # 25.

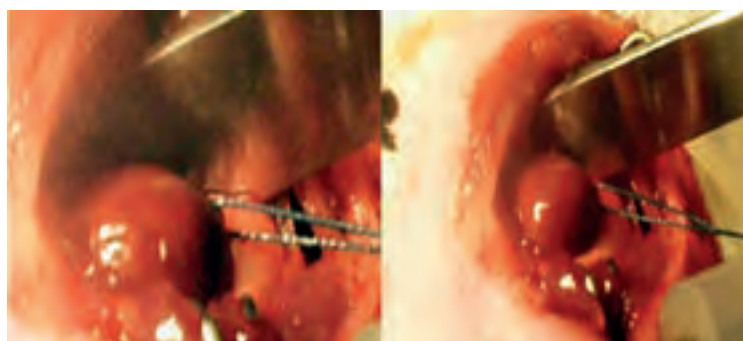


Figura 2 Fijación cardíaca

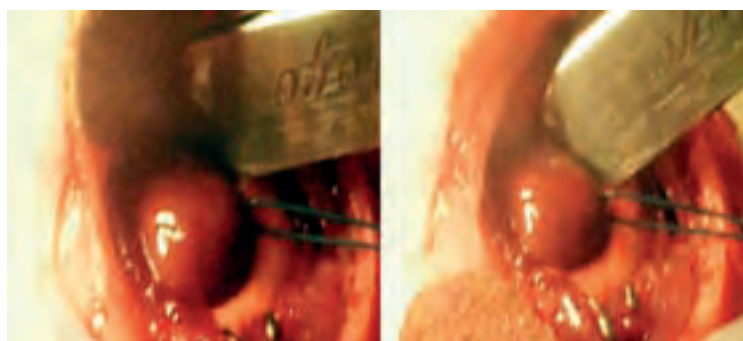


Figura 3 Epicardiotomía

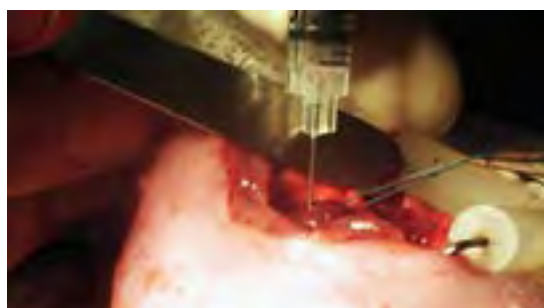


Figura 4 Punción mecánica

h) Laparotomía

1. Se realiza incisión sobre la línea media, con disección y corte por planos hasta alcanzar la cavidad abdominal.
2. Identificación del epiplón.
3. A través del tórax se pasa una pinza de mosquito para obtener el epiplón y pasarlo hacia la cavidad torácica.
4. Se realiza cierre de laparotomía mediante súrgete continuo de Vicryl del 4-0 y cierre de piel con súrgete continuo de Prolene del 4-0.

i) Colocación de injerto de epiplón

- Se coloca el epiplón sobre la superficie manipulada, previa aplicación del sello de fibrina como interfase.

j) Aplicación del sello de fibrina

- Se colocan 2 gotas de sello de fibrina sobre la superficie miocárdica.

k) Cierre de toracotomía

1. Colocación de sondas de pleurostomía por contraabertura previa colocación de puntos de Sarnoff sobre el sitio de incisión.
2. Se realiza cierre mediante súrgete continuo de Vicryl del 4-0.
3. Cierre de planos musculares continuando con la línea de sutura de Vicryl 4-0.
4. Se realiza maniobra de Valsalva y se extraen las sondas de pleurostomía con cierre de los puntos de Sarnoff.

l) Cierre de traqueostomía

1. Se realiza extracción de tubo de silastic para ventilación mecánica, con la fijación de tráquea.
2. Se colocan de dos a tres puntos separados de nylon del 10-0.
3. Cierre de planos musculares con Vicryl del 4-0, continuando con el cierre hasta la piel.

m) Recuperación

- Calor radiante con foco, para evitar la pérdida de la temperatura de la rata.

n) Tiempo posoperatorio

- 45 Días con los cuidados normales de alimentación y aislamiento, separando las ratas de acuerdo a los grupos de manipulación.

Patología

Procuración de corazón:

1. Anestesia mediante pentobarbital intraperitoneal.
2. Incisión abdominal media, con exposición de aorta abdominal.
3. Colocación de punzocat de 17 F, con paso de solución salina durante 10 minutos.
4. Apertura de tórax con sección de vena cava inferior para dejar el paso de solución.
5. Se instila por punzocat formaldehído al 16% durante 10 minutos.
6. Se realiza procuración de pieza mediante sección superior a nivel de grandes vasos y sección de venas pulmonares. Se deja pedículo de epiplón con parte de diafragma.
7. Preservación de corazón en formaldehído al 16% en refrigeración durante 24 horas.
8. Se pasan las piezas a formaldehído con buffer fosfato.
9. Envío de la muestra al Departamento de Patología.
10. Se colocan en bloques de parafina.

Departamento de patología

- Evaluación cegada.
- Microscopía de luz.
- Cortes de corazón a 3µ de distancia.

Inmuno-histoquímica

- Adición de anti-VEGF, anti-FGF y anti-1. Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA).
- Adición de peróxido de avidin, biotina y tritón X-100, incubado con peróxido de hidrogeno por 30 minutos, y posterior a 16 horas a 4° C.
- Adición de IgG con inmunoperoxidasa (Vector ABC Elite Kit, Laboratorios Vector, Burlingame, CA.).

Análisis subjetivo cegado: número de células que expresan la reacción (numérica).

1. Los métodos inmunohistológicos aplicados, se basan en la reacción de la peroxidasa, la cual permite marcar con estreptavidina-biotina (LSAB), especialmente para tejidos que se encuentran en parafina.
2. El equipo que se empleo es manufacturado por Santa Cruz Biotechnology Inc.
3. Visualización de antígeno-específico celular de VEGF, FGF y Flk-1.

Morfometría computarizada

Evaluación cegada por dos patólogos. (Software: SYS/ANALYSIS).

1. Densidad vascular: (escala numérica: %) área total frente a área vascular total de campos de 400x.
2. Inmunohistoquímica de VEGF, FGF, Flk-1.
3. Medición objetiva: (escala ordinal: leve, moderada, severa, nula), con la posterior conversión a porcentual, mediante el calculo automático del área por debajo de la curva. La morfometría computarizada analiza las imágenes y las describe de forma ordinal, expresando mediante el área por debajo de la curva en colores que representan la reacción. Negro: sin tejido; Amarillo: sin reacción; Azul: leve; Verde: moderada; Rojo: intensa.

el que hace la diferencia y efectos principales. Dependiendo de los resultados es posible también utilizar la prueba de Dunnet para compararlo con controles.

- *Análisis multivariado*: Correlación lineal simple y múltiple.

Consideraciones éticas.

La justificación de este trabajo es, precisamente, realizarlo en animales, sin embargo se siguieron todas las normas y cuidados, de acuerdo con la Declaración de Helsinki sobre el manejo de animales de experimentación.

Análisis estadístico

- *Análisis simple (estadística descriptiva)*: Medidas de tendencia central y desviación estándar (variabilidad de cada grupo). Determinar la magnitud del efecto.
- *Análisis bivariado (estadística inferencial)*: Anova de dos vías. 4 variables independientes. Determinar las diferencias entre los grupos. Búsqueda de efectos aditivos y multiplicativos. La variable de desenlace tanto de las variables intermedias como de la final se expresa de forma numérica porcentual, por lo que es posible emplear este estadístico.
- *Análisis Post-doc de HSD de Turkey (diferencias honestamente significativas)*: Permite aumentar la potencia de la prueba. Se basa en el número de combinaciones de tratamientos. Es posible utilizar intervalos de confianza del 99% para esta prueba. Permite identificar de los grupos cual es

Resultados

En el presente estudio se obtuvieron 11 grupos (diseño factorial de Yates de 4x3), de los cuales hubo 10 variaciones de la manipulación: 1) Epicardiotomía; 2) Punción mecánica (acupuntura); 3) Epicardiotomía + punción mecánica; 4) Epicardiotomía + punción mecánica + omento (epiplón); 5) Epicardiotomía + sello de fibrina; 6) Punción mecánica + sello de fibrina; 7) Epicardiotomía + punción mecánica + sello de fibrina; 8) Epicardiotomía + punción mecánica + sello de fibrina + omento; 9) Grupo control; 10) Control + sello de fibrina; y 11) Grupo control no operado). Por lo tanto se operaron 55 ratas, de las cuales se realizaron 10 observaciones por espécimen, 50 por grupo, siendo un total de 550 muestras. Para fines didácticos solo se presentan los datos más relevantes (cuadros I, II, III).

Cuadro I Procedimiento realizado frente a determinación de los diversos factores

	VEGF	FGF	Flk-1	Vasos
Control	8.65	11.05	7.65	14.11
Punción mecánica	22.10	20.70	23.65	23.34
Epicardiotomía	7.20	5.25	14.30	21.44
Control + sello de fibrina	8.80	12.05	7.35	20.36
Epicardiotomía + sello de fibrina	10.05	7.95	8.20	21.33
Punción mecánica + sello	9.42	13.19	19.44	24.69
Epicardiotomía + punción mecánica	16.29	10.92	12.21	23.89
Epicardiotomía + punción mecánica + sello	24.29	16.67	15.71	26.18
Acupuntura + epicardiotomía + omento	25.42	18.75	14.67	21.98
Punción mecánica + epicardiotomía + omento + sello	21.05	25.75	24.50	27.08

VEGF = factor vascular del crecimiento del endotelio; FGF = factor de crecimiento de fibroblastos; Flk-1 = receptor de tirosina para permitir la actividad del factor vascular de crecimiento derivado del endotelio, factor de crecimiento de fibroblastos y trombina

Cuadro II Procedimiento frente a factor vascular de crecimiento del endotelio

	Intensa	Moderada	Leve	Vasos
Control	0.44427135	2.48520113	21.5681824	75.4995172
Punción mecánica	0.21368114	2.02414319	18.4703760	79.3031775
Epicardiotomía	0.06823394	1.25880234	12.0020980	86.6711580
Control + sello	0.23000000	1.69000000	10.9100000	87.1600000
Epicardiotomía + sello de fibrina	0.21237728	1.82331467	14.4204612	83.5370597
Punción mecánica + sello	0.47632014	2.96812437	26.2739360	70.2754467
Epicardiotomía + punción mecánica	0.52143190	2.77786723	24.0062630	72.7027088
Epicardiotomía + punción mecánica + sello	0.77741809	2.07393181	22.1186891	75.0320045
Punción mecánica + epicardiotomía + omento	0.24061032	1.74164052	19.2583207	78.7588908
Punción mecánica + epicardiotomía + omento + sello	2.93710686	4.07137432	33.8320249	59.1534878

Discusión

La cardiopatía isquémica por aterosclerosis coronaria es la forma más frecuente de enfermedad cardiovascular después de los 30 años de edad, y es la principal causa de mortalidad en el mundo, con alrededor de 11 millones de defunciones cada año, lo que representa el 30% del total de fallecimientos, de los cuales el 80% ocurre en países de ingresos medios y bajos;^{5,6} esto se traduce en que, a nivel mundial, cada cuatro segundos ocurre un caso de infarto agudo del miocardio (IAM).⁷ En los EE. UU. la cardiopatía isquémica es responsable de aproximadamente 500 000 defunciones anuales.⁸ En estudios comunitarios, la mortalidad estimada a 30 días es del 30 al 50% y la mitad de los fallecimientos ocurre en las primeras dos horas, antes de su llegada al hospital.^{9,10} La mortalidad después de hospitalización por IAM ha disminuido cerca de 30% en los últimos 20 años, pero alrededor de uno de cada 25 pacientes que sobreviven a la hospitalización inicial, fallece en los 12 meses siguientes al infarto. La supervivencia se acorta principalmente en los mayores de 75 años, cuatro veces más que en pacientes jóvenes. La morbilidad no se ha modificado en las últimas dos décadas, en contraste con la reducción de la mortalidad hospitalaria lograda gracias a los avances en las unidades coronarias, la terapia temprana de reperfusión farmacológica y mecánica y con el uso de los nuevos agentes antitrombóticos.^{11,12}

En México, en la población de 20 a 69 años de edad, hay más de 17 millones de adultos con hipertensión arterial, más de 14 millones con dislipidemia, más de 6 millones con diabetes mellitus, más de 35 millones con sobrepeso u obesidad y por si fuera poco, hay más de 15 millones de personas que fuman.⁶

Datos epidemiológicos de México establecen a la

cardiopatía isquémica como primera causa de mortalidad en los mayores de sesenta años, y segunda causa en la población general; en el año 2008 fue responsable de 50 000 defunciones y contribuyó con el 10% de todas las causas de mortalidad.¹³ La mayor incidencia de mortalidad por enfermedad coronaria se observa en grupos con alta productividad y en adultos mayores, con un claro predominio del sexo masculino. Después de los 75 años, la presentación es similar para ambos sexos.⁶ El impacto económico en nuestro país, durante el año 2008, fue de aproximadamente 14 mil millones de pesos, además del desequilibrio que puede generar el fallecimiento o la incapacidad del que habitualmente es el principal proveedor en la economía familiar.^{14,15,16,17} La mortalidad por IAM en la Unidad de Cuidados Intensivos Cardiovasculares del Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, es del 8-10% de los ingresos.

Se puede definir a la angiogénesis como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Así, en esencia, difiere de la vasculogénesis, el cuál es un fenómeno embriogénico en donde nuevos vasos sanguíneos se forman de novo a partir de islotes sanguíneos compuestos de células madre.¹⁸

La angiogénesis requiere de una serie procesada de eventos que incluye: la migración y proliferación de células endoteliales dentro y fuera de la microvasculatura original, el rompimiento de membranas basales, y finalmente la expresión controlada de enzimas proteolíticas que pueden degradar matriz extracelular, reensamblar nueva matriz extracelular, y formar tubos endoteliales.

El proceso normal de angiogénesis incluye moléculas proangiogénicas y antiangiogénicas. Dentro de las moléculas angiogénicas principales que se conocen en la actualidad están: VEGF, FGF, factor alfa

de necrosis tumoral, factor beta de transformación del crecimiento, factor de crecimiento derivado de plaquetas y la angiogenina. También es importante señalar, que la hipoxia tisular es una de las mayores fuerzas que estimulan la angiogénesis.

El factor de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF o FGF-1) y FGF básico (bFGF, o FGF-2) son polipéptidos de 18 kilodaltones que actúan como mitógenos potentes para las células endoteliales y las del músculo liso. Se ha observado que estos factores tienen gran afinidad por la heparina y el sulfato de heparán.¹⁹

El VEGF, también conocido como factor de permeabilidad vascular, es una proteína dimérica de 46 kilodaltones, mitogénica específica de células endoteliales. Cuatro especies de este factor han sido identificadas hasta el momento actual; cada monómero posee 121, 165, 189 y 206 aminoácidos respectivamente, siendo su actividad similar, pero diferentes sus perfiles de secreción.²⁰

Desde principios y mediados de los años noventa del siglo pasado, se han hecho esfuerzos por aumentar la respuesta angiogénica natural, aplicándola al tratamiento de la enfermedad arterial periférica y la cardiopatía isquémica avanzada. El objetivo principal, es alterar selectivamente el programa genético celular vascular. En primer lugar se identifica el gen de interés, posteriormente se introduce al huésped, el gen se transcribe y posteriormente se expresa sintetizando la molécula apropiada.

Los genes transformados pueden transferirse al huésped de varias formas. En el proceso se utilizan vectores virales y no virales. Los vectores virales más frecuentes son: retrovirus, adenovirus y herpesvirus modificados. Los efectos colaterales de este tipo de vectores pueden representar riesgos para el huésped, por lo que esto ha originado otras técnicas como la inoculación directa de genes o la infusión de las propias sustancias o factores angiogénicos.²¹

De manera experimental, en 1994 Takeshita,²² utilizó VEGF-165 intraarterial en un modelo de isquemia de miembro en animales, y observó un incremento de la presión arterial y de la capilaridad del miembro afectado. El mismo autor se refirió al proceso como angiogénesis terapéutica. En el mismo año, Banai²³ en un modelo animal de isquemia cardíaca, reportaron un aumento del flujo colateral y aumento de vasos intramiocárdicos utilizando VEGF-165 por vía intracoronaria.

Con base en la experimentación en animales, se ha demostrado la utilidad de los factores angiogénicos en el miocardio isquémico.²⁴ Se ha experimentado hasta el momento varias rutas de administración de genes recombinantes o factores angiogénicos, a saber, intravenosa e intracoronaria, intrapericárdica, inyección intramiocárdica y endomiocárdica, utilizando técnicas

Cuadro II Resultados de análisis estadístico

Resultados Kruskal-Wallis		
	Máximo	P
Área vascular	AES	< 0.0001
VEFG	AEOS	< 0.0001
FGF	AEOS	< 0.0001
Flk-1	AEOS	< 0.0001
Resultados U de Mann Whitney		
	U	P
Área vascular (AES) frente a:		
AEOS	1087	0.261
AEO	774	< 0.0001
A	937	0.031
C	361	< 0.0001
Resultados U de Mann Whitney		
	U	P
Inmunoexpresión VEGF (AEOS) frente a:		
587	< 0.0001	
553	< 0.0001	
281	< 0.0001	
0.000	< 0.0001	
Resultados U de Mann Whitney		
	U	P
Inmunoexpresión FGF (AEOS) frente a:		
AEO	974	0.79
AES	1037	0.142
A	555	< 0.0001
C	308	< 0.0001
Resultados U de Mann Whitney		
	U	P
Inmunohistoquímica Flk-1 (AEOS) frente a:		
AEO	851	< 0.0001
AES	1499	0.995
A	966	0.02
C	206	< 0.0001

C = control; E = epicardiotomía; S = sello de fibrina; A = acupuntura; AEE = acupuntura + epicardiotomía + epiplón; O = omento

de cateterismo percutáneo. En el momento actual se desconoce cuál es la vía más efectiva y segura.²⁵

El primer estudio clínico fase I en humanos fue iniciado en 1997, utilizando VEGF-165 por vía intracoronaria e intravenosa. Los pacientes incluidos fueron aquellos con enfermedad coronaria crónica avanzada y angina estable, con demostración de áreas de miocardio viables y sin posibilidades de cirugía de revascularización coronaria y/o angioplastia coronaria. Los resultados de la investigación estimularon la realización de un estudio fase II (estudio VIVA), que se inició en 1998 y fue terminado de manera prematura por la ausencia de un efecto positivo de acuerdo a los objetivos de los investigadores.²⁶ El estudio en sí, fue criticado por no haber sido una investigación controlada, lo que a juicio de algunos investigadores pudo influir en la ausencia de resultados.²⁷

Con relación a estudios utilizando inyección intramiocárdica directa, la primera experiencia clínica fue reportada por Schumacher.²⁸ En la investigación se utilizó factor de crecimiento fibroblástico recombinante, que fue inyectado directamente en el miocardio de pacientes sometidos a cirugía con puente de arteria mamaria. La inyección se hizo de manera distal al sitio de la anastomosis. Al realizar una angiografía a estos pacientes, 12 semanas después de la cirugía, se observó un aumento de la red arterial alrededor del sitio de la inyección.

El estudio demuestra, objetivamente, la respuesta positiva de angiogénesis con los diversos procedimientos de revascularización miocárdica indirecta, que, además, son aditivos a excepción (*U* de Mann-Whitney) del uso de epiplón, que no parece ser importante en el modelo animal de revascularización miocárdica indirecta.

Más recientemente se ha diseñado un sistema basado en técnicas de cateterismo percutáneo y guiado por un mapeo endocárdico electromecánico basado en campos magnéticos (sistema Biosense), el cual permite la administración de genes o factores angiogénicos directamente en el endocardio.²⁹ Esta técnica parece prometedora, ya que teóricamente se aplicaría en un sitio específico y local del miocardio isquémico.

La cirugía cardíaca fue la primera que estableció algunos métodos para incrementar la circulación coronaria, esta podía realizarse ya sea mediante la incorporación de nuevos vasos de origen extramiocárdicos (circulación pericardio-frénica) Beck (1934), o bien implante de epiplón, Vineberg (1968), en los que se incrementaba el proceso de adherencia hacia el miocardio por medio de la epicardiotomía, que al final de cuentas era parte de un proceso cicatrizal en donde se encontraba involucrado el fenómeno angiogénico (formación de vasos a partir de uno ya existente). Por otro lado, está el incrementar la circulación colateral

intramiocárdica, la cual se logró por el mismo principio cicatrizal que no involucra al fenómeno angiogénico sino al proceso vasogénico (formación de nuevos vasos a partir de la diferenciación de otras células hacia la formación de elementos celulares que conforman los vasos, tales como las células endoteliales y musculares lisas).

En la década de los ochenta, la implementación de la revascularización transmiciocárdica con láser,⁸ logró captar la atención internacional, no solo por su nombre tecnológicamente rimbombante, sino por el impacto que esta causa en el resurgimiento de los conceptos de antaño sobre la circulación coronaria anormal, así como los intentos quirúrgicos por restablecerla,^{9,10} equiparándose a la punción mecánica del corazón,¹¹ la cual emula experimentalmente la ontofilogenia del corazón de los reptiles, logrando que la sangre circule a través de canales transmiciocárdicos durante la sístole.^{7,11,12,13,14,15,16}

A pesar de que sus argumentos fisiopatológicos tienen un carácter dudoso,¹⁷ la mejoría de los pacientes con revascularización transmiciocárdica con láser es clínica y estadísticamente significativa en estudios multicéntricos ($p < 0.001$, $n = 200$),¹⁸ fundamentado por la mejoría de la angina ($p < 0.05$),¹⁹ el incremento de la contractilidad ventricular ($p < 0.05$),²⁰ y el flujo subendocárdico del 20 al 40% ($p < 0.001$).¹⁹ Sin embargo, el escepticismo continúa siendo manifiesto pues existen otros autores que explican sus efectos con base en el “efecto placebo”, o bien a la denervación miocárdica.²¹ Por otra parte, los altos costos que esta tiene, limita la implementación rutinaria y extendida en la mayoría de las instituciones.^{22,23,24,25,26,27,28,29,30}

Algunos investigadores se han dado a la tarea de encontrar la causa de la mejoría de los pacientes, concluyendo que sus efectos no radican en la formación de canales, pues estos desaparecen a los dos meses del procedimiento,³¹ sino que es producto del proceso inflamatorio que origina la neoangiogénesis y/o el reclutamiento de vasos colaterales, efecto que se resume en el incremento del área vascular funcional.³² Estos efectos pueden ser equiparables experimentalmente al someter a cerdos bajo isquemia crónica a diez disparos con láser frente a diez punciones mecánicas, en donde el láser es mejor ($n = 20$, $p < 0.001$), pero tan solo con incrementar el número de punciones mecánicas a 30 en otro grupo, la diferencia desaparece ($n = 10$, $p = \text{NS}$), logrando como efecto adicional la mayor protección miocárdica, al evitar la quemadura excesiva del tejido y al reducir las complicaciones como la microembolia aérea y las arritmias por el uso del láser.³³ Aunque existe un reporte experimental realizado en 25 cerdos, los cuales fueron divididos en cinco grupos: isquemia crónica sometidos a 22 disparos de láser, cinco a punción

mecánica caliente, cinco en normotermia, y cinco con aguja ultrasónica; se midió el área vascular, en donde el uso del láser resultó superior ($p < 0.05$).³⁴

Los otros métodos de revascularización miocárdica indirecta se fundamentan en favorecer la circulación colateral intramiocárdica y/o extramiocárdica. Los primeros propuestos se dirigieron a incrementar la circulación extramiocárdica por medio del aumento de la circulación vicariante o pleuro-pericárdica, ocasionando la abrasión del epicardio o epicardiectomía, cuyo efecto ocasionaba el incremento del proceso adherencial y la neovascularización del pericardio al miocardio, o bien mediante la reducción de la estimulación simpática.⁵ La circulación intramiocárdica era supuestamente incrementada con base en dos sistemas: el sinusoidal o “lagos transmiciocárdicos”; o el sistema trabecular “golfos endomiocárdicos”, ambos sistemas incrementan la superficie de contacto entre la sangre y el miocardio.^{5,9}

Dentro de esta misma lógica, Vineberg fue el primero en proponer el uso conjunto de estos procedimientos para provocar el efecto sinérgico, utilizando epicardiectomía con un injerto libre o pediculado de epiplón, asociado a la implantación de arteria mamaria intramiocárdica, con buenos resultados clínicos.^{5,10,12}

El análisis deductivo y la congruencia de los trabajos experimentales y clínicos nos demuestran que los efectos de las diferencias de los métodos radican en la magnitud del efecto lesivo sobre el corazón (epicardiectomía, punción mecánica, láser), el cual desencadena un proceso inflamatorio y de reparación, que condiciona la liberación de factores intermediarios de crecimiento celular como: VEGF, FGF,⁷ factor de transformación beta,^{35,36} factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor de crecimiento derivado del corazón (HDGF).^{33,34,35,36,37,38,39,40}

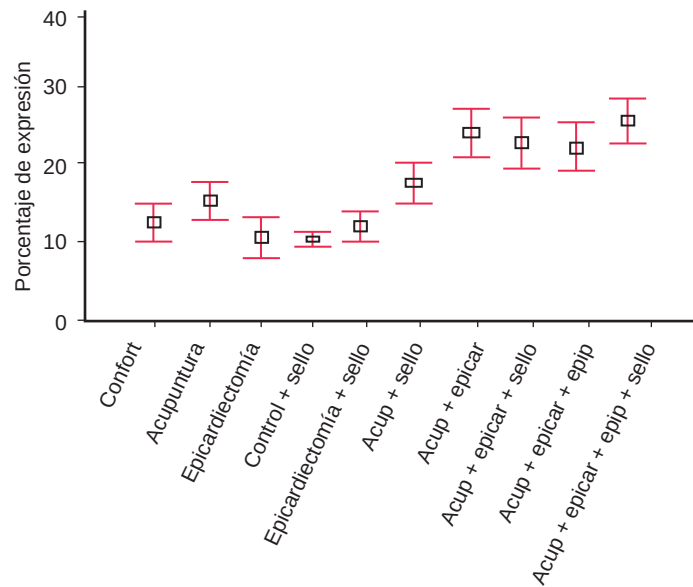


Figura 5 Factor vascular derivado del endotelio LEVE (promedio $\pm$ 1 DE) en relación a los procedimientos y el crecimiento celular

La expresión del factor vascular de crecimiento derivado del endotelio y del factor de crecimiento de fibroblastos se obtiene a través de un receptor de tirosina llamado Flk-1 o KDR.³⁶ Estos factores pueden ser producidos por el corazón en respuesta a una lesión o bien donados por el epiplón activado, los cuales favorecen el proceso neoangiogénico por medio del incremento de la transcripción y transducción genética, aumento de la síntesis de ADN, y la expresión proteica por medio del RNA mensajero y ribosomal, lo cual repercute en la capacidad endotelial de proliferar y migrar en una matriz extracelular, la cual

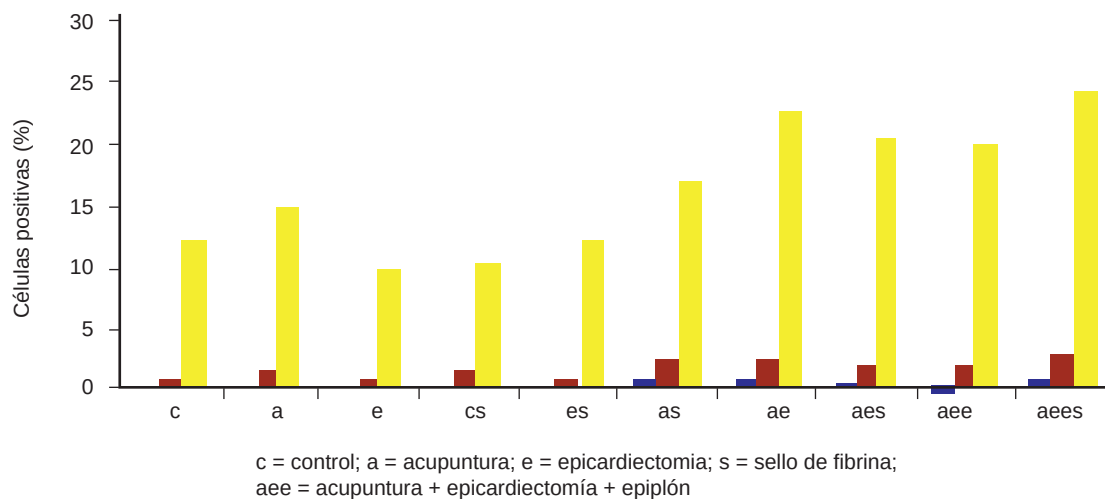


Figura 6 Se presenta la respuesta al factor de crecimiento de fibroblastos en relación a los procedimientos quirúrgicos

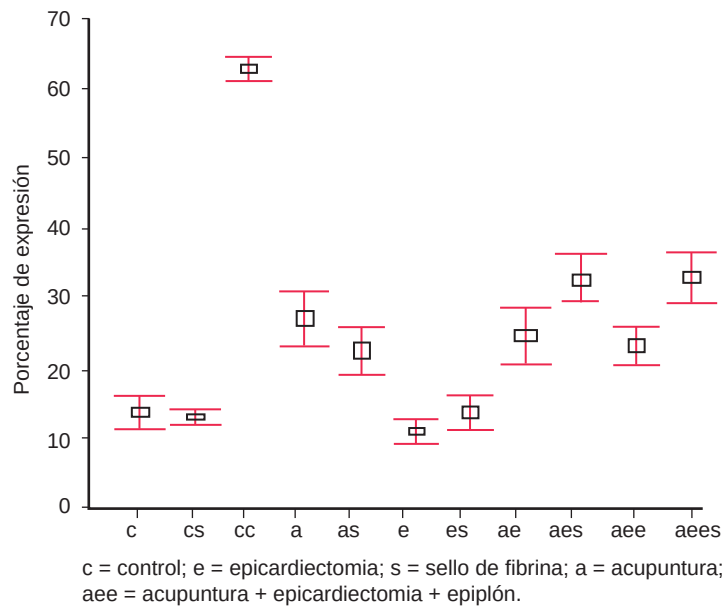


Figura 7 Se presenta la respuesta al factor de crecimiento de fibroblastos (promedio ± 1DE) en relación a los procedimientos quirúrgicos

es esencial para los mecanismos de nutrición, sostén y adhesividad. De la misma forma se ha demostrado el incremento de las isoformas de actina, y la reducción de la proteólisis del FGF, cuyas consecuencias finales contribuyen a la remodelación cardíaca.

Los pasos que derivan en la neoangiogénesis se dividen en dos etapas: una inicial, llamada vasogénesis, que se caracteriza por diferenciación, proliferación y migración celular, controlada primordialmente por

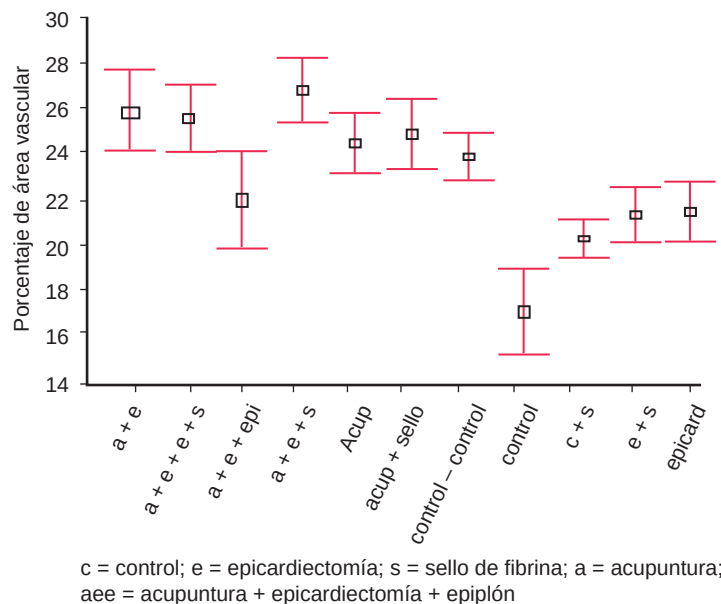


Figura 8 Se presenta la respuesta al receptor de tirosina llamado Flk-1 o KDR (promedio ± 1DE) en relación a los procedimientos quirúrgicos

la presencia del factor vascular de crecimiento derivado del endotelio; y la segunda etapa, o angiogénesis, la cual se refiere a la formación de un primordio vascular y maduración del mismo, o bien, la extensión de un vaso ya existente a otro territorio, determinada primordialmente por la expresión del factor de crecimiento de fibroblastos.

La asociación entre el fenómeno lesivo y la angiogénesis ha encontrado sus evidencias en base a la determinación intrapericárdica del factor de crecimiento de fibroblastos en pacientes que han padecido un infarto del miocardio,⁷ además de que se ha demostrado, mediante inmunohistoquímica, la expresión tanto de VEGF como del FGF, evaluadas de manera objetiva por medio de morfometría computarizada, cuyo método ha sido validado por varios investigadores, y representa el método más fehaciente en la actualidad.³³

Los utilidad de sellos de fibrina como interfase de tejidos ha sido demostrado experimentalmente en ratas, aumentando la capilaridad entre aorta y miocardio o en zonas de unión, permitiendo el crecimiento endotelial ($n = 10$, $p < 0.05$), ya sea de tejidos diferentes; músculo estriado al miocardio o epiplón a las anastomosis bronquiales.

Consideramos que no solo es importante incrementar el flujo coronario efectivo mediante angioplastia o puentes aortocoronarios, sino que es necesario restablecer la proporción perdida entre área vascular y masa ventricular.

Los investigadores debemos reconocer que el efecto neoangiogénico y angiogénico toma cierto tiempo, y que este no puede ser evaluado a tan corto plazo, debemos esperar a que el proceso este más bien maduro y que se trate no solo de un vaso formado (matriz extracelular no destruida) frente a un vaso funcional (matriz extracelular no destruida y vaso permeable).

Conclusiones

Área vascular: el efecto máximo es epicardiotomía + punción mecánica + sello de fibrina sin diferencias significativas con la maniobra completa (+ omento u epiplón). El uso de epiplón no es un factor importante en el modelo de corazón normal.

El factor vascular de crecimiento derivado del endotelio tiene significancia máxima, a pesar de que la evaluación fue a los 45 días de epicardiotomía + punción mecánica + sello de fibrina + epiplón (figura 5).

El Factor de crecimiento de fibroblastos solo mostró diferencias con A y C por lo que sería igual realizar + punción mecánica + sello de fibrina que epicardiotomía + punción mecánica + epiplón + sello de fibrina, datos que coinciden con los resultados en el área vascular (figuras 6 y 7).

El Flk-1 Existen diferencias con todos los grupos, pero no en el grupo de presencia de epiplón, lo que sustenta que el epiplón no es un factor significativo en el modelo de corazón normal (figura 8).

La angiogénesis es una información valiosa en el modelo de corazón normal. Se debe de incluir a la isquemia en proyectos futuros para amplificar el efecto (figura 9).

Se demuestra en este estudio que existe interacción entre los métodos de revascularización miocárdica indirecta obteniendo los mismos beneficios con el uso de epicardectomía + punción mecánica + sello de fibrina, lo cual facilita técnicamente el procedimiento sin disminuir el efecto angiogénico además de reducir el proceso adherencial.

Se demuestra que la revascularización miocárdica indirecta sí tiene un peso específico dentro de la revascularización miocárdica integral con un impacto real en el costo-beneficio y el costo-efectividad.

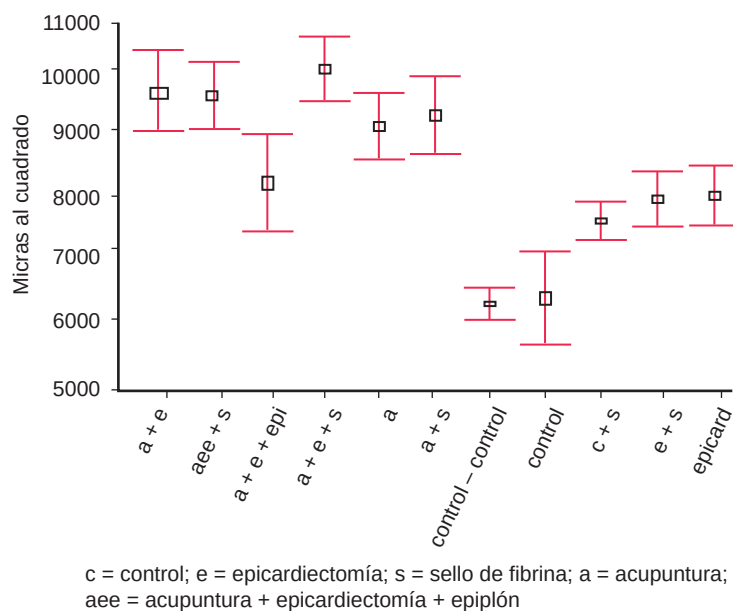


Figura 9 Se presenta la respuesta de angiogénesis (promedio $\pm$ 1DE) en relación a los procedimientos quirúrgicos

Agradecimientos:

Al Programa de Becas para Maestrías y doctorados de la UNAM del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Un agradecimiento especial a Omrix Biopharmaceutical® por su apoyo en la disposición de los reactivos utilizados.

Declaración de conflicto de interés: los autores han completado y enviado la forma traducida al español de la declaración de conflictos potenciales de interés del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas, y no fue reportado alguno que tuviera relación con este artículo.

Referencias

- Serrano-Sánchez JA. Epidemiología de la cardiopatía isquémica: En Cardiopatía isquémica. Madrid, España: ENE Ediciones; 1999. p.13-71.
- Braunwald E. Chronic coronary artery disease. En: Heart Disease, a textbook of cardiovascular medicine. 5ª ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1997. p.1316.
- Portal de la Secretaría de Salud de México. México: Secretaría de Salud; 2012. Disponible en: <http://www.gob.mx/salud>
- Buxton B, Frazer OH, Westaby S. The Decision-Making Process: en Ischemic Heart Disease, Surgical Management. London: MOSBY; 1999. p.39-57.
- World Health Organization. Health Topics: Cardiovascular diseases. Ginebra, Suiza; World Health Organization; 2014. Disponible en: http://www.who.int/topics/cardiovascular_diseases/en/
- Dimmeler S, Mann DL, Zeiher AM. Emerging therapies and strategies in the treatment of heart failure. En: Libby: Braunwald's Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine. 8ª ed. Philadelphia: WB Saunders; 2007. p.697-705.
- Rosas-Peralta M, Attie F. Enfermedad cardiovascular. Primera causa de muerte en adultos de México y del mundo. Arch Cardiol Mex. 2007;77:91-3.
- García-Castillo A, Sánchez-Díaz CJ, Martínez-Sánchez C, Llamas-Esperón G, Cardona E, Barragán R, González-Camid F, Sahagún G, Treviño AJ. Guías clínicas para el manejo del infarto agudo del miocardio con elevación del segmento ST. Arch Cardiol Mex. 2006;76(Supl. 3):S12-S120.
- Buda AJ. The role of echocardiography in the evaluation of mechanical complications of acute myocardial infarction. Circulation. 1991;84(Suppl. I):S109-21.
- Hasai D, Begar S, Wallentin L, Danchin N, Gitt AK, Boersma et al. A prospective survey of the characteristics, treatments and outcomes of patients with acute coronary syndromes in Europe and the Mediterranean basin. The Euro Heart Survey of Acute Coronary Syndromes. Eur Heart J. 2002;15:1190-201.
- Armstrong A, Duncan B, Oliver MF, Julian DG, Donald KW, Fulton et al. Natural history of acute coronary attacks. A community study. Br Heart J. 1972;34:67-80.
- Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M, Tolonen H, Ruko-Koski E, Amouyel P, for the WHO MONICA Project: Contribution of trends of survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring

- trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet*. 1999;353:1547-57.
13. Grupo Cooperativo RENASICA. Sociedad Mexicana de Cardiología: El Registro Nacional de los Síndromes Isquémicos Coronarios Agudos (RENASICA I). *Arch Cardiol Méx*. 2002;72(Supl.1):S45-64.
14. García-Castillo A, Sánchez-Díaz CJ, Martínez BP, Azpiri-López JR, Autrey CA, Martínez-Sánchez C *et al.* RENASICA II. A Mexican registry of acute coronary syndromes. *Arch Cardiol Mex*. 2005;75:S18-30.
15. Manson JE. The primary prevention of myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1992;326(21):1406-16.
16. Braunwald E, Antman EM. Evidence based coronary care. *Ann Intern Med*. 1997;126:551-3.
17. Hunink MG. The recent decline in mortality from coronary heart disease, 1980-1990. The effect of secular trends in risk factors and treatment. *JAMA*. 1997;277:535-42.
18. Engler D. Use of vascular endothelial growth factor for therapeutic angiogenesis. *Circulation*. 1996;94:1496-8.
19. Selke FW, Jianyi L, Stamler A. Angiogenesis induced by acidic fibroblast growth factor as an alternative method of revascularization for chronic myocardial ischemia. *Surgery*. 1996;120:182-8.
20. Ashahara T, Bauters C, Zheng LP. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation*. 1995;92(Suppl. 2):S365-71.
21. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem*. 1992;267:1031-4.
22. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M. Therapeutic angiogenesis a single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest*. 1994;93(2):662-70.
23. Banai S, Jaklitsch MT, Schou M, Lazarus DF. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation*. 1994;89:2183-9.
24. Peña-Duque MA. Angiogénesis. *Arch Cardiol Mex*. 2001;71(Supl.1):S136-8.
25. Kornowski R, Fuchs S, Leon M, Epstein S. Delivery strategies to achieve therapeutic myocardial angiogenesis. *Circulation*. 2000;101:454-8.
26. Henry TD, Annex BH, Azrin MA, Mckendall GR, Willerson JT. Double blind, placebo, controlled trial of recombinant human vascular endothelial growth factor: the VIVA trial. *J Am Coll Cardiol*. 1999;33(Suppl. A):384A.
27. Srinivas G, Anversa P, Frishman WH. Cytokines and myocardial regeneration. A novel treatment option for acute myocardial infarction. *Cardiol Rev*. 2009;17:1-9.
28. Kornowski R, Fuchs S, Vodovotz Y, Gordon D, Flynn M, Kovesdi I *et al.* Successful gene transfer in a porcine ischemia model using the biosense guided transendocardial injection catheter. *J Am Coll Cardiol*. 1999;33(Suppl. A):355A.
29. Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K *et al.* Constitutive expression of ph-VEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation*. 1998;97(12):1114-23.
30. Cooley D, Frazer OH, Kadipasaoglu K, Lindenmeir M, Pehlivanoglu S, Wolff J *et al.* Transmyocardial laser revascularization. Clinical experience with twelve month follow up. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1996;111:791-9.
31. Favaloro R, Effler D. History. In *Surgical Treatment of coronary arteriosclerosis*. Baltimore: Williams and Williams; 1970. p.1-10.
32. Sabiston D. The coronary circulation. En: *Sabiston D. Surgery of the chest*. 5ª ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1990. Vol. II. p.1654-61.
33. Fernandez-Santander SM. La circulación colateral coronaria en la cardiopatía isquémica. Mexico: Editorial Panamericana; 1997.
34. Petiti I, Guinovart M, Rig I, Vilallonga J. Introducción histórica y justificación. En: *Arterias coronarias. Aspectos anatómo-clínicos*. Barcelona: Masson-Salvat; 1993.
35. Kohmoto T, Argenzino M, Yamamoto N, Vliet K, Gu A, De Rosa C *et al.* Assessment of transmyocardial perfusion in alligator hearts. *Circulation*. 1997;95:1585-91.
36. Tsang J, J-Chiu R. The Phantom of myocardial sinusoids. A historical reappraisal. *Ann Thorac Surg*. 1995;60:1831-5.
37. Kirklin J, Barratt-Boyes B. Stenotic arteriosclerotic coronary artery disease. En: *Kirklin J, Barratt-Boyes B. Cardiac Surgery*. Churchill Livingstone. 1993; Vol. 1. p.286.
38. Sen PK, Udwadia TE, Kinare SG, Parulkar GB. Transmyocardial acupuncture. A new approach to myocardial revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1965;50:2:181.
39. Hammond G, Provan J, Austen GW. Experimental evaluation of myocardial revascularization procedures. *Ann Surg*. 1966;164:951-8.
40. Mack MJ. Advances in the treatment of coronary artery disease. *Ann Thorac Surg*. 2003;76(Suppl.):S2240-5.