

Características Imuno-Histoquímicas de Trombos Coronarianos de Pacientes com Infarto do Miocárdio com Elevação de ST e *Diabetes Mellitus*: Estudo Piloto

Daniel Rios Pinto Ribeiro, Eduardo Cambuzzi, Juliana Canedo Sebben, Karina Pezzi Melleu, Marcia Moura Schmidt, Carlos AM Gottschall, Alexandre Schaan de Quadros

RESUMO

Introdução: No contexto do infarto agudo do miocárdio, o *diabetes mellitus* está associado à maior mortalidade. O objetivo deste estudo foi avaliar se existem, entre os diabéticos, peculiaridades no processo de aterotrombose que poderiam estar implicadas em maior risco para tal desfecho. **Métodos:** Estudo piloto, proveniente de coorte de pacientes com diagnóstico de infarto agudo do miocárdio com elevação do segmento ST submetidos à intervenção coronária percutânea primária e à tromboaspiração. Foram estudadas variáveis clínico-laboratoriais de cada caso. Os trombos foram analisados quanto às características histopatológicas e às expressões imuno-histoquímicas de CD34, CD61 e fator VIII. **Resultados:** Foram incluídos os primeiros dez pacientes portadores de *diabetes mellitus* com material disponível para análise, pareados por idade, sexo e tempo de evolução do infarto com dez pacientes sem *diabetes mellitus*. Não houve associação significativa entre as expressões imuno-histoquímicas de CD34, CD61 e fator VIII com relação às variáveis histopatológicas, laboratoriais e clínicas estudadas, inclusive com relação à presença de *diabetes mellitus*. **Conclusões:** Em análise preliminar, não foi possível demonstrar diferença significativa quanto à expressão da atividade de células endoteliais, da função plaquetária e da ativação da cascata de coagulação entre trombos de pacientes com e sem o diagnóstico de *diabetes mellitus* submetidos à intervenção coronariana primária.

DESCRIPTORES: Infarto do miocárdio. *Diabetes mellitus*. Trombose coronária. Imuno-histoquímica. Intervenção coronária percutânea.

ABSTRACT

Immunohistochemical Characteristics of Coronary Thrombi in Patients with ST-Elevation Myocardial Infarction and Diabetes Mellitus: Pilot Study

Background: Diabetes mellitus is associated with increased mortality rates in the setting of acute myocardial infarction. The aim of this study was to evaluate whether there are peculiarities in the atherothrombotic process that might be implicated in increased risk for this outcome in patients with diabetes. **Methods:** Pilot study in a cohort of patients with ST-elevation acute myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention and aspiration thrombectomy. Clinical and laboratory variables were evaluated in all of the cases. Thrombi were analyzed for histopathological features as well as immunohistochemical expression of CD34, CD61 and factor VIII. **Results:** Our sample included the first ten diabetic patients with material available for analysis, who were matched according to age, gender and time elapsed since myocardial infarction with ten patients without diabetes. There was no significant association between the immunohistochemical expression of CD34, CD61 and factor VIII with other histopathological, clinical and laboratory variables, including the presence of diabetes mellitus. **Conclusions:** In this preliminary analysis, it was not possible to demonstrate any significant difference in the expression of endothelial cell activity, platelet function and activation of the coagulation cascade between thrombi of patients with and without diabetes undergoing primary coronary intervention.

DESCRIPTORS: Myocardial infarction. Diabetes mellitus. Coronary thrombosis. Immunohistochemistry. Percutaneous coronary intervention.

Adoença arterial coronariana (DAC) é a maior causa de morte em nível mundial, sendo que a maioria dos eventos adversos está associada à ocorrência do infarto agudo do miocárdio (IAM).¹ Com a otimização das terapias antitrombóticas e de reperfusão, tem sido observada a diminuição da mortalidade do IAM com supradesnivelamento do segmento ST (IAMCST).² No entanto, são necessários esforços para aprimorar o manejo dessa condição, já que altas taxas de mortalidade ainda têm sido relatadas.³ Na maioria dos casos, o IAMCST é causado pela ruptura de placas ateroscleróticas vulneráveis, associadas à atividade inflamatória e a um endotélio disfuncional. A placa rota é o gatilho para a ativação e agregação plaquetárias, e para a formação de trombo, culminando na oclusão total da artéria coronária pelo trombo.⁴

A intervenção coronariana percutânea primária (ICPp) é considerada o método de reperfusão preferencial no IAM.⁵ Nos últimos anos, a técnica de tromboaspiração adjunta tem sido crescentemente utilizada, com melhora dos resultados angiográficos e dos desfechos clínicos em alguns estudos.⁶ Além disso, a retirada do trombo permitiu uma nova linha de investigação a respeito da análise da morfologia, histologia e fatores associados a diferentes tipos de trombo.⁷⁻⁹ Variáveis como cor vermelha e a cronologia do trombo foram associadas à maior mortalidade,^{10,11} mas o papel fisiopatológico dos diferentes constituintes dele ainda é pouco estudado.

A análise imuno-histoquímica dos trombos aspirados pode ser uma ferramenta complementar importante na busca dessas respostas. A expressão da atividade de células endoteliais, da função plaquetária e da ativação da cascata de coagulação pode ser estimada pela expressão imuno-histoquímica dos antígenos CD34, CD61 e fator VIII, respectivamente.¹²⁻¹⁵ No cenário do IAMCST, poucos estudos avaliaram o perfil imuno-histoquímico de trombos intracoronários *in vivo* e sua correlação com variáveis clínicas.¹³⁻¹⁶ Nesse contexto, é conhecida a importância do *diabetes mellitus* (DM), seja por aumentar o risco de DAC e trombose, seja por estar associado à maior mortalidade no IAMCST.^{17,18} No entanto, existem dúvidas sobre esse risco ser mediado por diferenças nos processos fisiopatológicos de aterotrombose ou pelo aumento de comorbidades associadas ao DM. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão imuno-histoquímica dos antígenos CD34, CD61 e fator VIII em trombos coronários de pacientes portadores de DM com IAMCST.

MÉTODOS

Pacientes

Trata-se de um estudo piloto proveniente de uma amostra de pacientes consecutivamente internados em nossa instituição com o diagnóstico de IAMCST entre dezembro de 2010 e novembro de 2012. IAMCST foi definido como dor torácica em repouso com duração

superior a 30 minutos associada à elevação do segmento ST de pelo menos 1 mm em duas derivações contíguas no plano frontal, ou de no mínimo 2 mm no plano horizontal, ou associada a novo bloqueio de ramo esquerdo. Foram excluídos pacientes com tempo de evolução superior a 12 horas, idade menor do que 18 anos ou que se recusaram a participar do estudo.

Todos os participantes forneceram consentimento livre e esclarecido por escrito. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Cardiologia, Fundação Universitária de Cardiologia, em Porto Alegre (RS).

Características clínicas e seguimento

Todos os pacientes foram avaliados prospectivamente quanto às suas características clínicas e demográficas por um dos investigadores. As variáveis clínicas, laboratoriais e angiográficas foram registradas em um banco de dados específico. Durante a internação, os participantes do estudo foram acompanhados diariamente por um dos investigadores, para verificação de eventos intra-hospitalares. Após a alta hospitalar, os pacientes foram contatados por telefone ou atendidos ambulatorialmente, para verificação dos desfechos.

Procedimentos de intervenção coronária percutânea

Na admissão hospitalar, todos os pacientes receberam 300 mg de aspirina e 300 a 600 mg de clopidogrel. Para a realização do procedimento de ICPp, foram administrados 60 a 100 U/kg de heparina não fracionada. Os procedimentos de ICPp foram realizados conforme preconizado na literatura.^{19,20} As decisões quanto a aspectos técnicos do procedimento, como via de acesso (radial ou femoral), proceder ou não à tromboaspiração, tipo e número de stents, e uso de inibidores de glicoproteína IIb/IIIa ficaram a critério dos operadores. Com relação à tromboaspiração, três diferentes cateteres foram usados: Export (Medtronic Vascular Inc, Santa Rosa, CA, Estados Unidos), Diver (Invatec, Brescia, Itália), ou Pronto (Vascular Solutions, Minneapolis, MN, Estados Unidos). Em todos os casos, as aspirações foram feitas antes da insuflação do balão, com mais de uma passagem pelo sítio de oclusão. O sangue aspirado e o material intracoronário foram retidos em um filtro.

Análise dos trombos

Imediatamente após a retirada do trombo da artéria coronária, a amostra foi embebida em formalina 10% e fixada em parafina por 24 horas. Os espécimes foram cortados com micrótomo e corados pelo método de hematoxilina-eosina para as análises histopatológicas, que foram realizadas por um patologista cego para as características clínicas dos pacientes. Foram estudadas as seguintes características dos trombos: volume (cm³), cor (branco ou vermelho), padrão microscópico (recente, com lise ou em organização) e percentual de leucócitos, fibrina e hemácias, bem como a expressão imuno-histoquímica de CD34, CD61 e fator VIII. Trombos

recentes são caracterizados por apresentarem fibrina, leucócitos e hemácias. Trombos com foco de lise são caracterizados pela ocorrência da apoptose dos leucócitos. Já os trombos em organização são caracterizados pela formação de tecido conjuntivo frouxo.⁷

Para o estudo imuno-histoquímico, foram obtidos cortes histológicos de três micrômetros de espessura, os quais foram alocados em lâminas silanizadas. Para proceder à técnica de imuno-histoquímica, cada lâmina foi submetida à desparafinização do material, com uso de xilol e hidratação dos cortes com etanol. A recuperação antigênica foi realizada em forno de micro-ondas, com solução de ácido cítrico 10 mM/pH 6,0, em dois ciclos de 9 minutos cada, em potência de 750 W. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com o uso de água oxigenada a 3% (10 volumes). O anticorpo primário foi diluído em solução de albumina a 1% e azida sódica a 0,1% em PBS (sigla do inglês *phosphate-buffered saline*), incubado em câmara úmida, por 30 minutos a 37°C, com posterior permanência do material em refrigeração a 4°C por 18 horas. O anticorpo secundário biotinilado foi incubado em câmara úmida a 37°C, por 30 minutos, assim como o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (StreptABC). O substrato cromogênico utilizado foi a diaminobenzidina 60 mg% em PBS e, como contracoloração, usou-se a hematoxilina de Harris. Foram utilizados os seguintes anticorpos (Dako Corporation ou Novocastra): CD34, CD61 e fator de Von Willebrand (fator VIII). Em todos os casos, foi formado um painel imuno-histoquímico. A expressão obtida pelas células sanguíneas e/ou componentes do espécime foi revelada pela presença de coloração marrom em diferentes áreas da amostra. Considerou-se expressão positiva forte a reação imuno-histoquímica exibindo forte e difusa coloração marrom em várias células do tecido analisado. Definiu-se como expressão positiva moderada a reação imuno-histoquímica exibindo coloração marrom moderadamente intensa ("marrom mais claro") em algumas células do tecido analisado.

Análise estatística

Os dados foram analisados no *software Statistical Package for the Social Science (SPSS)* para Windows, considerando-se significativos valores com $p < 0,05$. As variáveis quantitativas foram expressas como média \pm desvio padrão ou mediana e intervalos interquartis (25 a 75%). As variáveis categóricas foram expressas como frequência absoluta e relativa, analisadas pelo teste qui-quadrado ou exato de Fisher. A infiltração celular foi analisada por meio de uma escala semiquantitativa.

RESULTADOS

No período do estudo, 310 pacientes foram submetidos à tromboaspiração com sucesso (fluxo TIMI 3 e recuperação de trombos). Nesta análise, foram incluídos os primeiros dez pacientes portadores de DM com material disponível para análise, que foram pareados por idade, sexo e tempo de infarto com dez pacientes sem

DM. Em ambos os grupos, 60% da amostra pertencia ao sexo masculino, com idades de 55 ± 6 anos e $56,5 \pm 5,8$ anos, e medianas do tempo de evolução do IAM de 3,9 horas (2,0 a 9,0 horas) e 3,7 horas (2,8 a 9,3 horas), respectivamente.

O perfil histopatológico está demonstrado na Tabela 1 e o imuno-histoquímico na Tabela 2. Com relação à expressão de CD34, houve tendência da associação com presença de fibrina no trombo e maiores níveis séricos de fibrinogênio. Não houve associação com outras características clínicas, laboratoriais ou histológicas (Tabela 3).

A associação entre a expressão dos anticorpos CD61 e fator VIII e as variáveis analisadas (Tabelas 4 e 5) não apresentou diferenças estatisticamente significativas, a não ser por tendência de associação entre a expressão dos anticorpos CD61 e a presença de hemácias no trombo.

DISCUSSÃO

Neste estudo piloto, não foi verificada associação significativa entre a expressão imuno-histoquímica das proteínas CD34, CD61 e fator VIII com relação às variáveis histopatológicas, laboratoriais e clínicas estudadas, inclusive com relação à presença de DM. Houve, contudo, tanto tendência à associação da expressão de CD34 com o conteúdo de fibrina no trombo e maiores níveis de fibrinogênio sérico, quanto tendência à associação de expressão de CD61 com a presença de hemácias.

TABELA 1
Características histopatológicas dos trombos dos pacientes estudados

Caso	Tipo de trombo	Leucócitos (%)	Fibrina (%)	Hemácias (%)
1	Com foco de lise	10	40	50
2	Com foco de lise	5	90	5
3	Em organização	5	70	25
4	Em organização	15	65	20
5	Recente	20	70	10
6	Recente	5	45	50
7	Recente	10	50	40
8	Em organização	5	90	5
9	Recente	30	50	20
10	Recente	30	50	20
11	Em organização	10	80	10
12	Com foco de lise	10	60	30
13	Recente	5	35	60
14	Em organização	10	50	40
15	Recente	10	45	45
16	Em organização	5	50	15
17	Recente	35	50	15
18	Recente	5	60	35
19	Com lise	10	50	40
20	Recente	10	20	70

TABELA 2
Painel imuno-histoquímico

Caso	Diabetes mellitus	CD34	Fator VIII	CD61
1	Não	Positivo	Positivo, forte	Positivo, forte
2	Sim	Negativo	Positivo, forte	Positivo, forte
3	Não	Positivo	Positivo, forte	Positivo, forte
4	Não	Positivo	Positivo, forte	Positivo, forte
5	Não	Negativo	Positivo, forte	Positivo, forte
6	Sim	Negativo	Positivo, forte	Positivo, forte
7	Não	Negativo	Positivo, forte	Positivo, forte
8	Sim	Negativo	Positivo, forte	Positivo, forte
9	Não	Positivo	Positivo, forte	Positivo, forte
10	Não	Positivo	Positivo, forte	Positivo, forte
11	Não	Positivo	Positivo, forte	Positivo, forte
12	Não	Negativo	Positivo, moderado	Positivo, moderado
13	Não	Positivo	Positivo, forte	Positivo, forte
14	Sim	Positivo	Positivo, forte	Positivo, forte
15	Sim	Positivo	Positivo, forte	Positivo, forte
16	Sim	Negativo	Positivo, forte	Positivo, forte
17	Sim	Positivo	Positivo, forte	Positivo, forte
18	Sim	Positivo	Positivo, forte	Positivo, forte
19	Sim	Positivo	Positivo, forte	Positivo, forte
20	Sim	Positivo	Positivo, moderado	Positivo, forte

TABELA 3
Associação entre a expressão de CD34 e variáveis clínico-laboratoriais e histológicas

Expressão de CD34/variável	Valor de p
Tipo de trombo	0,77
Cor do trombo	0,53
Volume do trombo	0,33
Presença de leucócitos	0,19
Presença de fibrina	0,06
Presença de hemácias	0,08
<i>Diabetes mellitus</i>	0,64
Hipertensão arterial sistêmica	0,53
Índice de massa corporal	0,69
Tabagismo	0,78
HDL colesterol	0,96
Colesterol total	0,12
PCR ultrasensível	0,66
Triglicerídeos	0,79
Fibrinogênio	0,07
Clopidogrel	0,64
Inibidor de glicoproteína IIb/IIIa	0,16

HDL: lipoproteína de alta densidade; PCR: proteína C-reativa.

TABELA 4
Associação entre a expressão de CD61 e variáveis clínico-laboratoriais e histológicas

Expressão de CD61/variável	Valor de p
Tipo de trombo	0,21
Cor do trombo	0,37
Volume do trombo	0,69
Presença de leucócitos	0,57
Presença de fibrina	0,19
Presença de hemácias	0,06
<i>Diabetes mellitus</i>	0,86
Hipertensão arterial sistêmica	0,21
Índice de massa corporal	0,16
Tabagismo	0,28
HDL colesterol	0,28
Colesterol total	0,27
PCR ultrasensível	0,35
Triglicerídeos	0,27
Fibrinogênio	0,26
Clopidogrel	0,74
Inibidor de glicoproteína IIb/IIIa	0,58

HDL: lipoproteína de alta densidade; PCR: proteína C-reativa.

TABELA 5
Associação entre a expressão de fator VIII e variáveis clínico-laboratoriais e histológicas

Expressão de fator VIII/variável	Valor de p
Tipo de trombo	0,51
Cor do trombo	0,15
Volume do trombo	0,49
Presença de leucócitos	0,28
Presença de fibrina	0,59
Presença de hemácias	0,19
<i>Diabetes mellitus</i>	0,58
Hipertensão arterial sistêmica	0,37
Índice de massa corporal	0,14
Tabagismo	0,71
HDL colesterol	0,44
Colesterol total	0,26
PCR ultrasensível	0,37
Triglicerídeos	0,26
Fibrinogênio	0,22
Clopidogrel	0,75
Inibidor de glicoproteína IIb/IIIa	0,36

HDL: lipoproteína de alta densidade; PCR: proteína C-reativa.

Diferentes autores têm proposto técnicas de imuno-histoquímica como ferramenta adicional ao exame

histopatológico, de maneira a aumentar a sensibilidade para reconhecimento dos componentes formadores do trombo, seja em nível vascular ou cavitário, utilizando espécimes extraídos cirurgicamente ou provenientes de autópsia.^{12,21} Estudos dessa natureza, feitos em pacientes com diagnóstico de síndromes coronarianas agudas, *in vivo*, são escassos na literatura.^{13,15,16,22}

Ikuta et al.²², comparando material extraído de indivíduos com angina estável *versus* indivíduos com angina instável, constataram maiores agregação e ativação plaquetárias no segundo grupo, vistas, respectivamente, pela imunexpressão aumentada de glicoproteína IIb/IIIa ($p < 0,0005$) e P-selectina ($p < 0,0001$). Foi identificada, ainda, maior concentração de neutrófilos nas placas dos pacientes instáveis. Em outro estudo, que avaliou trombos em contexto de IAMCST tratado por reperfusão mecânica, foi demonstrada correlação negativa do conteúdo plaquetário com o tempo decorrido desde o início da dor. Além disso, a taxa de células com expressão para CD34 teve correlação positiva com reestenose no seguimento (coeficiente de correlação = 0,76; $p = 0,01$).¹³

Em estudo recente, que ressaltou a potencial aplicabilidade prática de um maior conhecimento da constituição dos trombos, Sambola et al.¹⁵ avaliaram a carga trombótica aspirada de dez pacientes submetidos à ICPp, comparando a dez pacientes submetidos à ICP de resgate após resposta inefetiva à tenecteplase. Nos pacientes do último grupo, foram detectados níveis superiores de fibrina ($p = 0,016$), P-selectina ($p = 0,03$) e fator de von Willebrand ($p = 0,03$).

Apesar de evidências indicarem reatividade plaquetária e coagulabilidade aumentadas, bem como fibrinólise comprometida em pacientes com DM tipo 2,²³ o perfil imuno-histoquímico dos nossos pacientes diabéticos não foi diferente daquele dos não diabéticos, mesmo pareando os grupos para fatores confundidores importantes, como idade, sexo e tempo de evolução do IAMCST. Nossos achados foram, ainda, de encontro aos resultados de Yamashita et al.,¹⁶ que chegaram a um número significativamente menor de células CD34 positivas nos trombos de pacientes portadores de DM tipo 2. Acredita-se que esse grupamento celular possa coibir a formação e facilitar a organização do trombo, de forma que sua escassez possa impactar negativamente no prognóstico. Ademais, não foram verificadas quaisquer associações, com relevância estatística, entre os antígenos CD34, CD61 ou fator VIII e outras variáveis clínicas ou constituintes do trombo.

A principal limitação deste estudo piloto foi seu número amostral reduzido, o que pode ter contribuído para a ausência de diferença entre os grupos. Por outro lado, a divulgação desses resultados pode alertar outros pesquisadores e intervencionistas para a importância das análises imuno-histoquímicas em trombos coronarianos de pacientes com IAMCST.

CONCLUSÕES

Concluimos que, nesta análise preliminar, não foi possível demonstrar diferença significativa quanto à expressão da atividade de células endoteliais, da função plaquetária e da ativação da cascata de coagulação, entre trombos de diabéticos e não diabéticos submetidos à intervenção coronariana primária como tratamento de infarto agudo do miocárdio com elevação do segmento ST.

CONFLITO DE INTERESSES

Não há.

FONTE DE FINANCIAMENTO

Este trabalho foi financiado pelo Instituto de Cardiologia/Fundação Universitária de Cardiologia (IC/FUC), em Porto Alegre (RS), por meio do Fundo de Apoio do IC/FUC à Ciência e a Cultura (FAPICC).

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colegas Alexandre Azmus, André Mânica, Carlos Cardoso, Cláudio Vasques de Moraes, Cláudio Ramos de Moraes, Cristiano Cardoso, Flavio Leboutte, Henrique Gomes, Julio Teixeira, La Hore Rodrigues, Luis Maria Yordi, Mauro Moura e Rogerio Sarmento-Leite, pela participação na execução dos procedimentos de intervenção coronária percutânea primária.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. The top 10 cause of death. Fact sheet N° 310, updated May 2014 [Internet]. Geneva; 2014 [cited 2014 Apr 25]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
2. Jernberg T, Johanson P, Held C, Svennblad B, Lindback J, Wallentin L. Association between adoption of evidence-based treatment and survival for patients with ST-elevation myocardial infarction. *JAMA*. 2011;305(16):1677-84.
3. Fox KA, Dabbous OH, Goldberg RJ, Pieper KS, Eagle KA, Van de Werf F, et al. Prediction of risk of death and myocardial infarction in the six months after presentation with acute coronary syndrome: prospective multinational observational study (GRACE). *BMJ*. 2006;333(7578):1091.
4. Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *N Engl J Med*. 2013;368(21):2004-13.
5. Keeley EC, Boura JA, Grines CL. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet*. 2003;361(9351):13-20.
6. Vlaar PJ, Svilaas T, van der Horst IC, Diercks GF, Fokkema ML, de Smet BJ, et al. Cardiac death and reinfarction after 1 year in the thrombus aspiration during percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction study (TAPAS): a 1-year follow-up study. *Lancet*. 2008;371(9628):1915-20.
7. Rittersma SZ, Van Der Wal AC, Koch KT, Piek JJ, Henriques JP, Mulder KJ, et al. Plaque instability frequently occurs days or weeks before occlusive coronary thrombosis: a pathological thrombectomy study in primary percutaneous coronary intervention. *Circulation*. 2005;111(9):1160-5.

8. Silvain J, Collet JP, Nagaswami C, Beygui F, Edmondson KE, Bellemain-Appaix A, et al. Composition of coronary thrombus in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(12):1359-67.
9. Cambruzzi E, Sebben JC, David RB, Mattos EI, Bernardi GLM, Ioppi J, et al. Avaliação histopatológica de trombos coronários em pacientes com infarto agudo do miocárdio e elevação do segmento ST. *Rev Bras Cardiol Invasiva*. 2012;20(3):267-73.
10. Kramer MC, van der Wal AC, Koch KT, Ploegmakers JP, van der Schaaf RJ, Henriques JP, et al. Presence of older thrombus is an independent predictor of long-term mortality in patients with ST-elevation myocardial infarction treated with thrombus aspiration during primary percutaneous coronary intervention. *Circulation*. 2008;118(18):1810-6.
11. Quadros AS, Cambruzzi E, Sebben J, David RB, Abelin A, Welter D, et al. Red versus white thrombi in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: clinical and angiographic outcomes. *Am Heart J*. 2012;164(4):553-60.
12. Arbustini E, Dal Bello B, Morbini P, Gavazzi A, Specchia G, Viganò M. Immunohistochemical characterization of coronary thrombi in allograft vascular disease. *Transplantation*. 2000;69(6):1095-101.
13. Iwata H, Sata M, Ando J, Fujita H, Morita T, Sawaki D, et al. Impact of primitive cells in intracoronary thrombi on lesion prognosis: temporal analysis of cellular constituents of thrombotic material obtained from patients with acute coronary syndrome. *Heart*. 2010;96(10):748-55.
14. Aoki J, Serruys PW, van Beusekom H, Ong AT, McFadden EP, Sianos G, et al. Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34: the HEALING-FIM (Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First In Man) Registry. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(10):1574-9.
15. Sambola A, Francisco J, Del Blanco BG, Ruiz-Meana M, Martí G, Otaegui I, et al. Immunohistochemical and molecular characteristics of coronary thrombus resistant to fibrinolysis. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59(13s1):E448-E448.
16. Yamashita A, Nishihira K, Matsuura Y, Ito T, Kawahara K, Hatakeyama K, et al. Paucity of CD34-positive cells and increased expression of high-mobility group box 1 in coronary thrombus with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 2012; 224(2):511-4.
17. Moreno PR, Murcia AM, Palacios IF, Leon MN, Bernardi VH, Fuster V, et al. Coronary composition and macrophage infiltration in atherectomy specimens from patients with diabetes mellitus. *Circulation*. 2000;102(18):2180-4.
18. Donahoe SM, Stewart GC, McCabe CH, Mohanavelu S, Murphy SA, Cannon CP, et al. Diabetes and mortality following acute coronary syndromes. *JAMA*. 2007;298(7):765-75.
19. Levine GN, Bates ER, Blankenship JC, Bailey SR, Bittl JA, Cercek B, et al. 2011 ACCF/AHA/SCAI Guideline for Percutaneous Coronary Intervention: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions. *J Am Coll Cardiol*. 2011; 58(24):e44-122.
20. Holmes DR Jr, Hirshfeld J Jr, Faxon D, Vlietstra RE, Jacobs A, King SB 3rd, et al. ACC Expert Consensus document on coronary artery stents. Document of the American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32(5):1471-82.
21. Fukuchi M, Watanebe J, Kumagai K, Katori Y, Baba S, Fukuda K, et al. Increased von Willebrand factor in the endocardium as a local predisposing factor for thrombogenesis in overloaded human atrial appendage. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37(5):1436-42.
22. Ikuta T, Naruko T, Ikura Y, Ohsawa M, Fukushima H, Shirai N, et al. Immunolocalization of platelet glycoprotein IIb/IIIa and P-selectin, and neutrophil – platelet interaction in human coronary unstable plaques. *Int J Mol Med*. 2005; 15(4): 573-7.
23. Ferroni P, Basili S, Falco A, Davì G. Platelet activation in type 2 diabetes mellitus. *J Thromb Haemost*. 2004;2(8):1282-91.