



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
DEPARTAMENT DE MEDICINA

TREBALL DE RECERCA

Convocatòria Juny 2011

**VALORACIÓ DE L'EDEMA MIOCARDÍAC INTRA I  
EXTRACEL·LULAR MITJANÇANT RESSONÀNCIA  
MAGNÈTICA EN EL MODEL DE COR DE RATA EN  
PERFUSIÓ SALINA SOTMÈS A ISQUÈMIA  
REPERFUSIÓ**

Mireia Andrés Villarreal

DIRECTOR: Dr. David García-Dorado

CO-DIRECTOR: Dr. Ignasi Barba

**ÍNDEX**

	<b>Pàgina.</b>
<b>A) RESUM.....</b>	<b>3</b>
<b>B) INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>5</b>
<b>C) MATERIAL I MÈTODES .....</b>	<b>7</b>
C.1. Animals .....	7
C.2. Protocols de perfusió salina de cor aïllat .....	7
C.3. Determinació de la necrosi miocàrdica:	
quantificació de LDH.....	9
C.4. Quantificació de l'aigua total .....	11
C.5. Quantificació de l'aigua extracel·lular i intracel·lular.....	13
C.6. Anàlisi estadística.....	16
C.7. Adquisició d'imatges dels cors ex vivo per RM.....	17
<b>D) RESULTATS .....</b>	<b>18</b>
D.1. Mostres incloses a l'anàlisi .....	18
D.2. Experiments d'isquèmia reperfusió en cor aïllat .....	19
- Experiments al Langendorff .....	19
- Necrosi del teixit miocardiàc .....	20
D.3. Edema total .....	20
D.4. Edema extracel·lular i intracel·lular .....	22
D.5. Imatges per Ressonància Magnètica .....	24
<b>E) DISCUSSIÓ .....</b>	<b>25</b>
E.1. Discussió respecte la fiabilitat i les limitacions del mètode	25
E.2. Discussió sobre els resultats dels experiments	
realitzats per comprovar el mètode.....	26
<b>F) CONCLUSIONS .....</b>	<b>28</b>
<b>G) BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>29</b>

**ABREVIACIONS**

AUC	Area Under the Curve, àrea sota la corba
Blebb	Blebbistatina
CV	Coefficient de Variació
Gd	Gadolini
Gd- DOTA	Gadolini-DOTA, àcid gadotèric, gadoterat de meglumina
GEFI_ORTHO	Gradient Echo Fast Imaging - Orthogonal
IPC	Precondicionament isquèmic
IRM	Imatge per Resonància Magnètica
LDH	Lactat DesHidrogenasa
MSMEVTR	Multi Slice Multi Echo – Variable Time of Repetition
PP	Pressió de perfusió
PVE	Pressió exercida pel Ventricle Esquerre
RM	Resonància Magnètica
TE	Temps de eco
TR	Temps de repetició
UA	Unitats arbitràries d'activitat (referit a la LDH)

### **A) RESUM**

L'edema miocardiàc és present en diverses cardiopaties, entre les quals convé subratllar, per l'elevat impacte sanitari, la cardiopatia isquèmica i la hipertensió arterial. Hi ha dades que suggereixen que l'edema miocardiàc no és únicament un reflex del dany tissular sinó que contribueix a la disfunció miocardiàca (tant sistòlica com diastòlica) i a la mort dels cardiomiòcits. Malgrat ser present en quasi totes les cardiopaties, la fisiopatologia de l'edema miocardiàc no és encara ben coneguda. El fet que participi en el dany i la disfunció cardíacs fan pensar que pot constituir una diana terapèutica en sí mateix. A més, la determinació de l'edema miocardiàc és un aspecte encara no resolt des del punt de vista metodològic.

L'objectiu del present treball és contribuir a generar un major coneixement de la fisiopatologia de l'edema miocardiàc així com de les cardiopaties que en presenten. Per assolir aquest objectiu s'ha posat a punt un mètode de determinació de la distribució de l'aigua entre els espais intracel·lular i extracel·lular del miocardi, emprant Gd-DOTA com marcador d'espai extracel·lular i quantificant-lo mitjançant ressonància magnètica (RM). El model amb què s'ha treballat és el cor aïllat de rata en perfusió salina, sotmès a diferents protocols d'isquèmia reperfusió amb i sense maniobres de protecció miocardiàca enfront la isquèmia. Posteriorment s'ha començat a estudiar la correlació de determinats paràmetres d'imatge amb RM amb la distribució de l'aigua entre els espais intra i extracel·lular del miocardi, però aquests estudis queden fora de l'objectiu d'aquest treball i constituiran la base de futures investigacions.

## **B) INTRODUCCIÓ**

És sabut que l'edema miocardiàc està present en diverses malalties cardíques tant rellevants com la cardiopatia isquèmica (1, 2), la cardiopatia hipertensiva (3), les malalties valvulars, la miocarditis, la disfunció miocardiàca secundària a la sèpsia i el rebuig del cor trasplantat (4). Són diversos els mecanismes que poden contribuir a generar edema miocardiàc, entre els quals s'han descrit la inflamació, la disfunció endotelial, les alteracions de l'equilibri osmòtic cel·lular, la disminució del drenatge limfàtic o l'augment de la pressió capil·lar secundària a sobrecàrrega de pressió de diferents cambres cardíques (5-8).

Així mateix, l'edema del miocardi té conseqüències sobre la funció cardíaca: hi ha dades que suggereixen la seva contribució a l'estaborniment miocardiàc després de la isquèmia sostinguda (9); sembla ser que la presència crònica d'edema intersticial afavoreix l'aparició de fibrosi i juga un paper en la disfunció diastòlica (7,10). L'edema miocardiàc és un dels components del dany per isquèmia-reperfusió, present en diferents situacions com l'infart agut de miocardi o després de la cardioplexia en l'àmbit de la cirurgia cardíaca i del cor trasplantat (11, 12). En aquest context, l'edema miocardiàc pot contribuir a l'aparició d'arítmies, la disfunció sistòlica reversible i la mort dels cardiomiòcits (13).

Malgrat la identificació de tots aquests factors implicats en el desenvolupament de l'edema o en les seves conseqüències (14, 15), el coneixement actual de la fisiopatologia de l'edema miocardiàc encara és deficient i resten molts aspectes per dilucidar, com per exemple, l'autèntica contribució de l'edema al dany o la disfunció cardíacs (16), la distinció clara entre les causes i les conseqüències de l'edema o els mecanismes moleculars relacionats (bé amb la gènesi de l'edema o bé modificats per la seva presència, ja sigui com a mecanisme adaptatiu o com efecte pernicios). Actualment s'està investigant el paper que podrien jugar-hi les aquaporines, les caveoles, les connexines i altres proteïnes i estructures del sarcolema (17, 18, 23).

Un aspecte crític en l'estudi de l'edema miocardiàc és distingir correctament la seva distribució, ja que l'edema intersticial (vasogènic) i l'intracel·lular (citotòxic o oncolític) tenen mecanismes fisiopatològics i conseqüències sobre el miocardi prou diferents. Per exemple, el dany per isquèmia reperfusió causa edema intracel·lular que

precipita disfunció sistòlica i mort cel·lular, mentre que les situacions de sobrecàrrega crònica de pressió (hipertensió arterial o valvulopaties) s'associen fonamentalment a edema extracel·lular que afavoreix la disfunció diastòlica i l'aparició de fibrosi (20).

Una de les majors dificultats pel que fa a l'estudi de l'edema miocardiàc és el fet de no disposar d'eines o mètodes fiables i senzills per determinar la distribució de l'aigua. Ni tan sols la determinació de l'aigua total és un aspecte trivial: en l'àmbit experimental s'empra la dessecació, la liofilització i, excepcionalment, la gravimetria de mostres fresques per quantificar el contingut d'aigua total; cada mètode té les seves limitacions i no estan lliures de biaixos i possibles fonts d'error, però en general s'accepten com mètodes fiables per determinar aigua total. Se sap que la histologia no és una tècnica fiable per valorar l'aigua de les mostres a causa de la distorsió que pateix el teixit a conseqüència de la fixació i que es magnifica en situacions en què l'osmolaritat dels diferents espais no és l'habitual i, per tant, és diferent de la dels fluids emprats en el processament de les mostres (2).

Malgrat que a nivell experimental no és una determinació complexa, a nivell assistencial no hi ha gaire opcions per detectar l'edema miocardiàc: l'únic mètode aplicable en clínica per detectar i localitzar l'edema al miocardi és mitjançant RM, emprant les seqüències potenciades en T2 (12, 21). Alguns grups defensen la utilitat de la tomografia computeritzada o inclús de l'ecocardiograma per detectar l'edema però ara per ara són tècniques no validades (22,23).

La diferenciació entre espai intracel·lular i extracel·lular al miocardi és factible en models experimentals però avui per avui no és possible realitzar-la en l'entorn clínic per mètodes no invasius. S'han descrit diferents mètodes per determinar experimentalment els dos compartiments (inclús per diferenciar l'espai intersticial de l'intravascular) basats en l'ús de molècules marcades amb isòtops radioactius ( $^{14}\text{C}$ ) o amb nuclis magnètics ( $^{31}\text{P}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{39}\text{Co}$ ) que no travessen les membranes plasmàtiques o la barrera endotelial i es comporten com marcadors d'espai extracel·lular o intravascular respectivament (24, 25, 26). Aquestes tècniques tenen les seves limitacions, com per exemple el fet de requerir equips sofisticats no disponibles arreu, l'emissió de radiacions nocives, la necessitat de destruir la mostra per tal d'analitzar-la i també el fet que, tot i que en petita proporció, les molècules emprades com marcadors d'espai extracel·lular sí assoleixen l'espai intracel·lular (27).

Per tots aquests motius creiem que és de gran interès desenvolupar tècniques no invasives aplicables a l'àmbit clínic que permetin determinar la distribució de l'edema al miocardi. Això permetria aprofundir en el coneixement de la fisiopatologia de les cardiopaties que cursen amb edema miocardiàc i, possiblement, a una millor tipificació i diagnòstic d'algunes malalties cardíaques encara no del tot ben conegudes. És en aquest context que s'emmarca el present treball de recerca.

La hipòtesi concreta que es pretén contrastar és que el Gd-DOTA és un bon marcador de l'espai extracel·lular i permet quantificar l'aigua extracel·lular. Aquest mètode, associat a la determinació de l'aigua total per altres tècniques fiables (dessecació o liofilització) permet també quantificar l'aigua intracel·lular com a mesura indirecta derivada de la diferència entre l'aigua total i l'extracel·lular.

L'objectiu és desenvolupar un nou mètode experimental en el model de cor de rata sotmès a perfusió salina per determinar els espais intra i extracel·lular del miocardi, basat en l'ús de Gd-DOTA com marcador d'espai extracel·lular. És un treball, per tant, centrat en la posada a punt d'un mètode que, posteriorment, es farà servir com a referència per estudiar la possible correlació entre determinats paràmetres d'IRM i la distribució de l'aigua. Aquests paràmetres podrien tenir aplicació en l'àmbit assistencial, ja que es poden determinar amb els equips de RM d'ús clínic.

## **C) MATERIAL I MÈTODE**

### **C.1. Animals**

Els animals han estat tractats d'acord amb la normativa europea de manipulació d'animals i ha estat aprovat pel Comitè Ètic de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron. S'ha emprat rates Sprague-Dawley d'uns 200g de pes. Un cop anestesiades profundament amb pentobarbital injectat per via intraperitoneal, es realitza l'exèresi del cor mitjançant una incisió subxifoidal. El cor se submergeix en sèrum fisiològic a 4°C i es fixa immediatament al sistema Langendorff mitjançant canulació de l'aorta ascendent tot iniciant la perfusió salina coronària amb tampó de Krebs per via retrògrada (Fig. 1)



Fig 1. Imatge del sistema Langendorff emprat en els experiments. Es pot observar el cor de rata canulat, suspès per l'aorta ascendent (feltxa blanca)

### **C.2. Protocols de perfusió salina del cor aïllat**

Un cop iniciada la perfusió salina es col·loca un baló a l'interior del ventricle esquerre per registrar la pressió exercida (PVE) de forma contínua. La PVE permet determinar de forma indirecta l'activitat elèctrica del cor, ja que per les conseqüències



sobre l'activitat mecànica cardíaca es poden detectar bradiarítmies, fibril·lació ventricular o taquicàrdies ventriculars. També es registra de forma contínua la PP.

El tampó de perfusió emprat ha estat el Krebs (composició en mmol/L: NaCl 118, KCl 4.7, MgSO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 1.8, NaHCO<sub>3</sub> 25, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, glucosa 11), pH 7.4, Osmolaritat 308 mOsm/L oxigenat contínuament amb carbogen (95% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub>) i perfós a una temperatura de 37°C i a una velocitat de perfusió constant de 11mL/min. La composició del tampó de Krebs modificat amb manitol és igual al Krebs pel que fa a la concentració dels components prèviament anomenats però duu manitol a l'1.84% de manitol, amb una osmolaritat de 410 mOsm/L. En els protocols d'isquèmia s'ha administrat blebbistatina a una concentració de 1mM en el tampó de Krebs. En tots els casos el tampó (Krebs o Krebs amb manitol) perfós els darrers 5 minuts d'experiments contenia Gd-DOTA a una concentració de 1mM.

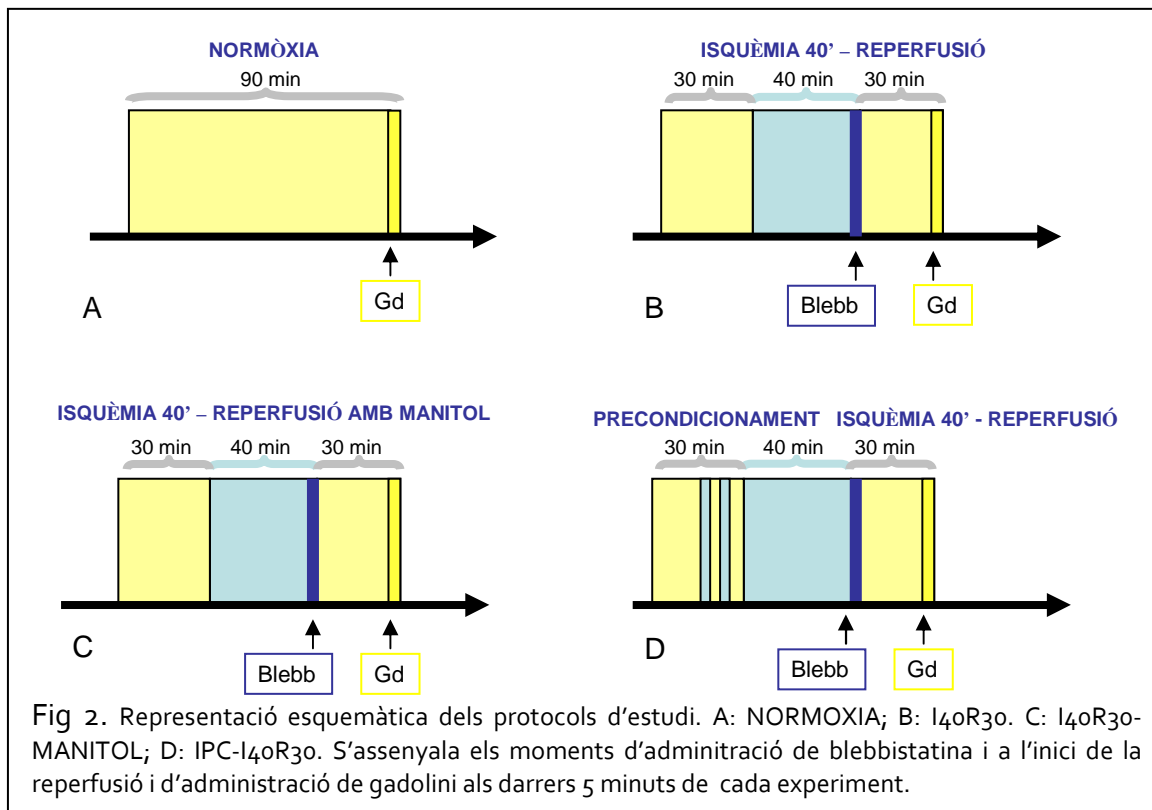
S'han realitzat quatre protocols experimentals, amb 4 experiments per cada protocol (n = 4 x 4 = 16), representats gràficament a la Fig.2.

- **NORMOXIA:** 90 de perfusió amb el tampó de Krebs.

- **I40R30:** 30 minuts d'equilibrat amb tampó de Krebs, seguit de 40 minuts d'isquèmia en què s'interrompé la perfusió dels cors i seguit de 30 minuts de reperfusió amb tampó de Krebs.

- **I40R30-MANITOL:** 30 minuts d'equilibrat amb tampó de Krebs, seguit de 40 minuts d'isquèmia en què s'interrompé la perfusió dels cors i seguit de 30 minuts de reperfusió amb tampó de Krebs modificat amb manitol (hipertònic).

- **IPC-I40R30:** 30 minuts d'equilibrat amb tampó de Krebs; durant aquests 30 minuts d'equilibrat s'apliquen 2 cicles d'isquèmia breu de 5 minuts (interrupció de la perfusió) seguits de 5 minuts de reperfusió (que és el que s'anomena "precondicionament isquèmic"). Immediatament després s'inicien els 40 minuts d'isquèmia seguida de 30 minuts de reperfusió amb tampó de Krebs.



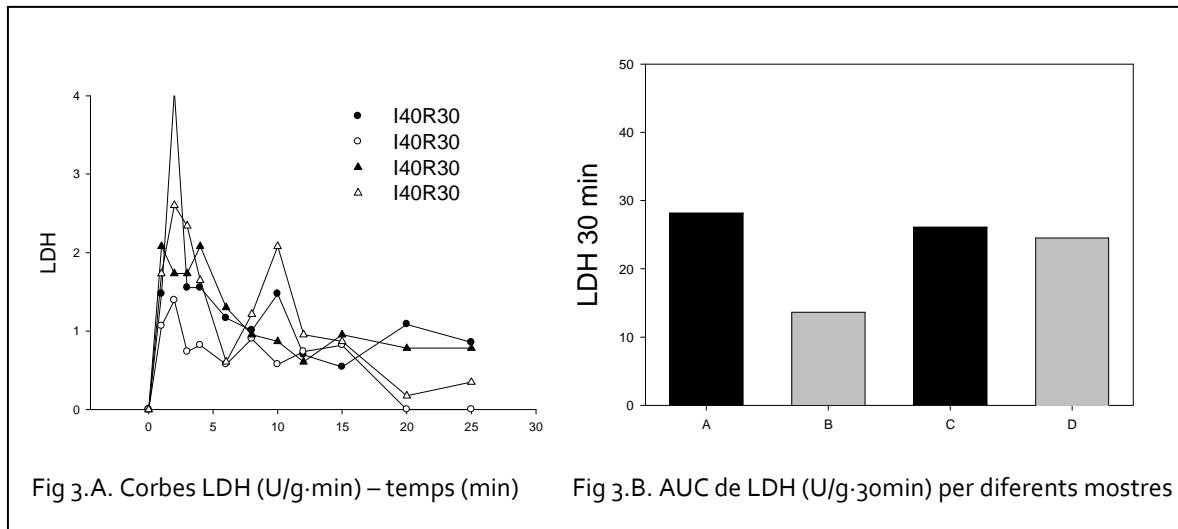
En definitiva, disposem de 4 controls normoxics sotmesos a 90 minuts de perfusió amb tampó de Krebs oxigenat. És important analitzar aquestes mostres perquè la perfusió salina causa edema intersticial per ella mateixa i, per tant, convé tenir controls de cors sotmesos a perfusió salina no exposats a isquèmia-reperfusió.

Realitzem tres protocols d'isquèmia de 40 minuts i reperfusió de 30 minuts. Aquests protocols van precedits de 30 min de perfusió normòxia, anomenada fase d'equilibrat, perquè l'edema intersticial causat per la perfusió salina s'estabilitza en els primers 20 minuts de la perfusió. Els protocols I40R30-Manitol i IPC-I40R30 són protocols de protecció miocàrdica enfront la isquèmia amb els qual es redueix la necrosi, com ja està sòlidament demostrat (28-30).

### **C.3. Determinació de la necrosi miocàrdica: quantificació de LDH**

Per tal de quantificar la mort cel·lular s'ha mesurat l'alliberament de l'enzim LDH durant la reperfusió.

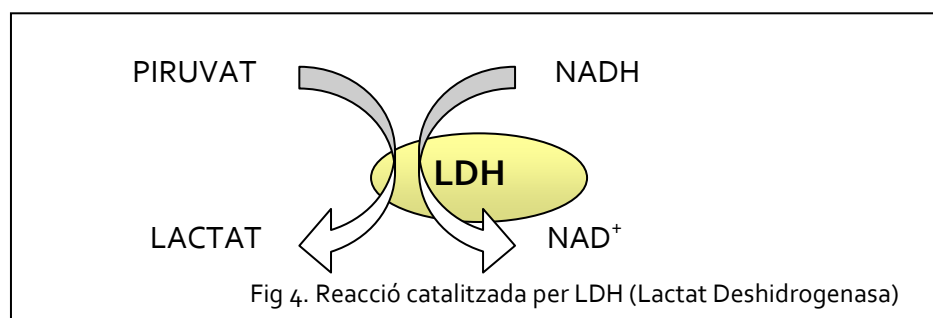
Les mostres emprades per quantificar LDH estan constituïdes per l'efluent cardíac recollit en els minuts 1,2,3,4,6,8,10,12,15,20,25 de la reperfusió. Aquest conjunt de valors permet establir l'AUC de l'alliberament de LDH (valor acumulat).



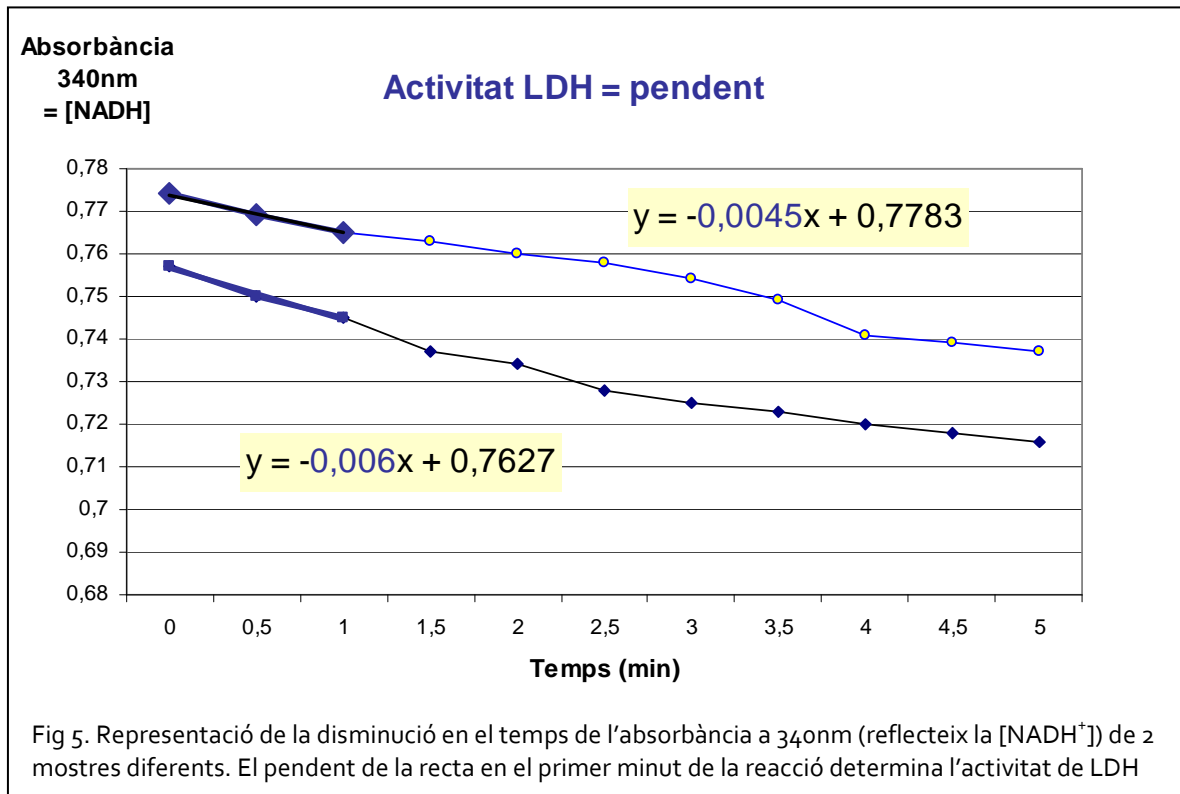
La mesura de LDH es realitza per espectrofotometria. [Espectrofotòmetre: Multiskan FC, Thermo Scientific®].

Un cop recollides totes les mostres, es pren un volum exacte i igual de cada mostra (40 µL) i es posa en un pou d'una placa de lectura per a espectrofotometria. A continuació s'afegeixen 160 µL de tampó fosfat enriquit amb NADH (310 µM) i piruvat sòdic (1mM) i es procedeix a la mesura de l'activitat de LDH. La composició del tampó fosfat emprat, expressat en mM és la següent:  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  61.4,  $K_2HPO_4$  58.6., pH 7.4,  $T^a$  37°C.

El fonament d'aquest mètode de mesura de l'activitat de LDH es basa en la reacció metabòlica catalitzada per aquest enzim, que és la conversió de piruvat en lactat i de NADH en  $NAD^+$  (Fig 4). El tampó emprat conté una quantitat d'ambdós substrats (piruvat i NADH) suficient com per saturar la reacció, de manera que el determinant de la velocitat de la reacció és únicament la concentració de l'enzim que la catalitza (és a dir, de LDH).



L'espectrofotòmetre realitza la mesura d'absorbància a 340 nm i determina la concentració del substrat NADH. Per la disminució constant en la concentració del substrat en el primer minut de la reacció es pot establir la velocitat de la reacció i, per tant, l'activitat de l'enzim LDH (equival al pendent de la recta), Fig 5..



Els resultats s'ajusten pel pes sec del cor, per la velocitat de perfusió del tampó i pel temps de recollida de mostres (temps de reperfusió, 30 minuts). L'alliberament total de LDH s'expressa en Unitats d'activitat de LDH per gram de pes sec del cor i temp. El càlcul de l'AUC s'ha realitzat amb el programa SigmaPlot®, Systat Software Inc, 2006. (Fig 3).

#### **C.4. Quantificació de l'aigua total**

Un cop finalitzat l'experiment al Langendorff els cors són retirats del sistema de perfusió salina i col·locats sobre una placa de Petri. Es retira la base del cor que conté els grans vasos i el pla valvular. La resta del cor, corresponent al teixit miocardiàc ventricular, es col·loca en un tub Falcon de 50mL dins d'un filtre de nylon (de 180µm) i se centrifuga a 50 g durant un minut a T<sup>a</sup> ambient. [Centrífuga Thermo Electron Corporation, model Jouan B<sub>4</sub>i-BR<sub>4</sub>i 4x200mL Multifunction].

Un cop finalitzada la centrifugació es pesa cada cor i es divideix en quatre porcions de mides similars (dues contenen l'apex i dues la porció més basal). Cada porció s'introdueix en un tub d'assaig prèviament pesat i es torna a pesar el conjunt (tub d'assaig amb la mostra al seu interior) per poder determinar el pes fresc de cada mostra.

A continuació les mostres es congelen amb N<sub>2</sub> líquid i es liofilitzen durant 24 hores. [Liofilitzador: LT-105, Christ<sup>®</sup>].

Un cop finalitzada la liofilització es torna a pesar els tubs d'assaig amb la mostra al seu interior i d'aquesta manera es determina el pes sec de cada mostra, ja que el la liofilització elimina l'aigua (tota l'aigua i només l'aigua) de les mostres per un procés de sublimació.

La diferència de pesos [pes fresc] – [pes sec] ens proporciona el contingut d'aigua. Les dades pel que fa al contingut d'aigua (total, intracel·lular i extracel·lular) s'han expressat com mil·lilitres d'aigua per cada 100g de teixit sec. S'ha triat aquesta manera d'expressar els resultats perquè es considera que el teixit sec és constant i no varia durant un experiment de dues hores de durada com són els d'aquest treball.

$$\text{Contingut d'aigua} = \frac{[(\text{pes fresc}) - (\text{pes sec})]}{(\text{pes sec})} * 100$$

Mereix una explicació el perquè se centrifuga les mostres abans de pesar-les per establir el pes fresc. Prèviament s'havien fet experiments sense aquest pas i els resultats eren poc homogenis; aleshores, enlloc de tractar les mostres sobre una placa de Petri es manipulaven sobre paper de cel·lulosa d'ús corrent al laboratori i s'aprofitava les propietats del paper per assecar l'excés de tampó dels cors d'una manera aparentment similar. El motiu d'assecar els cors és que, en retirar-los del sistema de perfusió salina, queden envoltats per aigua procedent del tampó de perfusió però que no pertany al teixit cardíac; el que es pretén assecant els cors és retirar aquest excés d'aigua. Però en assecar els cors al paper de cel·lulosa es perd una quantitat no controlada d'aigua per capil·laritat. Per avaluar els efectes d'aquesta pèrdua d'aigua es varen dur a terme uns experiments que varen mostrar que, com més edematosos són els cors, més aigua perden en posar-los en contacte amb el paper de cel·lulosa. Es va concloure que aquest procediment podia ser una font important

d'error. Calia trobar una altra manera d'eliminar l'aigua del tampó i va sorgir la idea d'aplicar una centrifugació molt suau als cors per tal que despreguessin aquesta aigua extratissular. Es va fer experiments per tal de comprovar la fiabilitat del mètode i es va comprovar que tractant els cors amb aquesta tècnica s'aconseguien resultats més homogenis entre grups i que el contingut d'aigua total era similar a dades prèviament descrites a la literatura (25). Finalment s'ha decidit adoptar aquest mètode perquè és reproduïble i permet una aplicació sistemàtica.

Com a mètode d'eliminació de l'aigua total s'ha triat la liofilització. Tot i que no requereix cap justificació especial, ja que és ben demostrat i acceptat que la liofilització elimina l'aigua de manera específica i completa, sí mereix una explicació de perquè s'ha triat aquest mètode enlloc de la dessecació en estufa. La liofilització permet continuar processant la mostra un cop liofilitzada i, per tant, permet quantificar el gadolini (és a dir, el volum extracel·lular) en la mateixa mostra en què s'ha determinat el contingut d'aigua total. A més, en no haver de destinar una porció del cor únicament a quantificar l'aigua total, es disposa d'un nombre de mostres major per mesurar l'espai extracel·lular. Aquests avantatges proporcionen major fiabilitat al mètode.

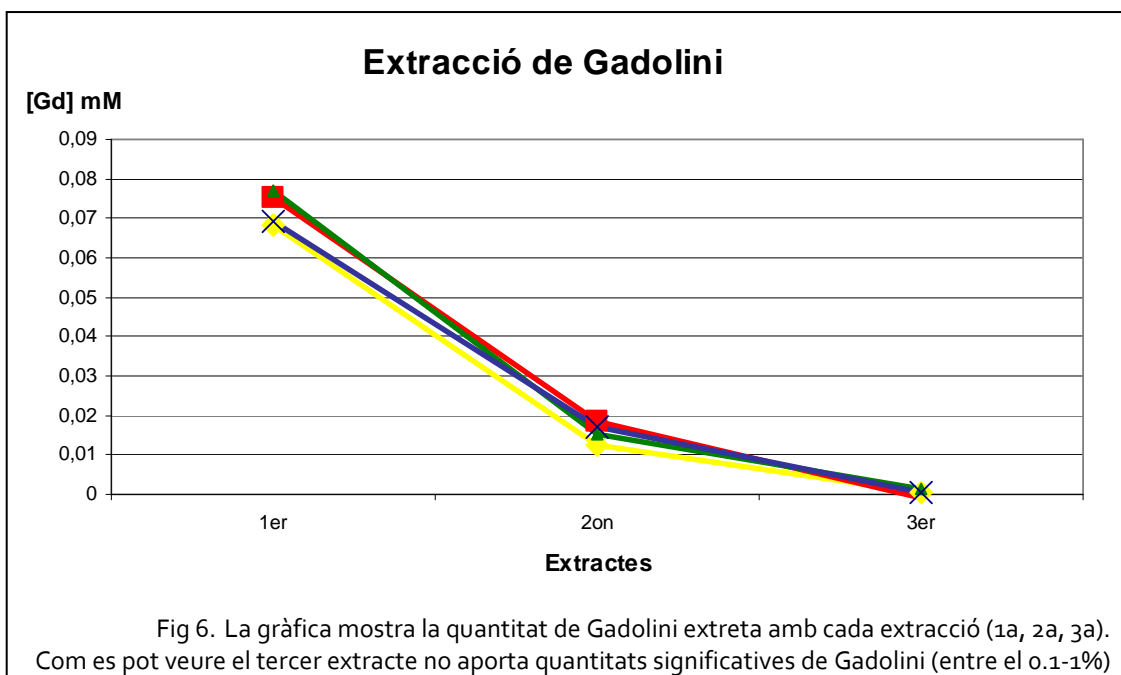
### **C.5. Quantificació de l'aigua extracel·lular i intracel·lular**

El fonament per relacionar el contingut de gadolini amb l'espai extracel·lular és que el l'àcid gadotèric (Gd-DOTA, també anomenat gadoterat de meglumina) és un complex no covalent de gadolini que es distribueix ràpidament per l'espai intersticial però que no travessa les membranes plasmàtiques. La farmacocinètica del Gd-DOTA està ben establerta (volum de distribució de 18 litres i semivida plasmàtica de 1.6h; no s'uneix a l'albumina) i en base a aquest coneixement és raonable assumir que amb cinc minuts de perfusió contínua a concentració constant n'hi ha prou per assolir l'estat d'equilibri entre l'espai intravascular i l'intersticial. Per a dur a terme els experiments s'ha emprat Dotarem<sup>®</sup> 0.5M i s'ha administrat a una concentració 1mM en el tampó de perfusió durant els 5 darrers minuts de cada experiment. S'assumeix que en finalitzar l'experiment la concentració de gadolini a l'espai extracel·lular és la mateixa que al tampó de perfusió, és a dir 1mM.

Malgrat es disposa de quatre mostres per cada cor, s'ha analitzat únicament tres mostres per cor. Es va decidir *a priori* reservar una mostra liofilitzada de cada cor per possibles futures anàlisis. Aquest fet explica que als resultats finals la suma de l'aigua intracel·lular i extracel·lular no doni exactament el valor presentat per l'aigua total (que sí s'ha determinat a partir de les quatre mostres).

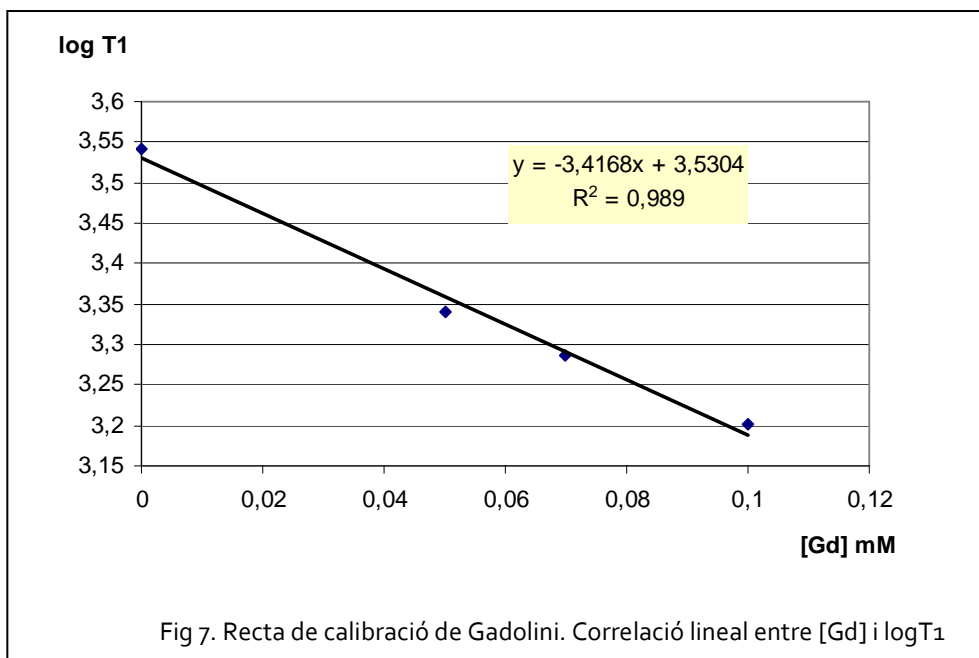
Un cop establert el pes sec, es micronitza cada mostra amb ajut d'una espàtula dins del mateix tub d'assaig on s'ha liofilitzat, fins obtenir una pols fina. A continuació es fa l'extracte del gadolini amb aigua: s'afegeix 1mL d'aigua milli-Q al tub d'assaig i es remena al vòrtex. Es deixa reposar la mostra 10 minuts i se centrifuga a 3.000 g durant 5 minuts a T<sup>a</sup> ambient. Se separa el sobrenedant i es col·loca en un tub Eppendorff de 2mL. El sobrenedant se centrifuga a 21.000 g durant 3 minuts per separar les restes de *pellet* [Centrífuga Z326K, Hermle Labortechnik GmbH<sup>®</sup>] i aquest segon sobrenedant és el que s'analitza mitjançant RM. Per acabar d'extreure tot el Gadolini es fa una segona extracció del *pellet* amb 1mL d'aigua milliQ i es repeteix el procediment fins obtenir el segon extracte.

Experiments previs han mostrat que amb dues extraccions és suficient per recuperar el gadolini (Fig 6). La tercera extracció aporta fraccions de gadolini inferiors a l'1% i per aquest motiu als experiments finals s'ha realitzat només dues extraccions. En algun cas en què el contingut de gadolini era elevat s'ha realitzat, per major seguretat, una tercera extracció que no ha modificat els resultats.



La base de quantificar gadolini mitjançant RM és que el gadolini escurça el temps de relaxació T<sub>1</sub> de l'aigua i ho fa amb una intensitat que elimina la interferència de qualsevol altre possible factor de confusió (els altres components del teixit, la presència del ferro de la mioglobina, els components del tampó de perfusió...). A més, la correlació entre el logaritme decimal de T<sub>1</sub> i la concentració de gadolini és lineal per a concentracions de gadolini inferiors a 5mM.

Elaborant una recta de calibració amb diferents concentracions de gadolini es pot establir l'equació que relaciona ambdues variables així com el coeficient de correlació (Fig 7) (s'ha realitzat els càlculs amb el programa Excel 2007, Microsoft®).



Les anàlisis a la RM s'han realitzat amb un iman vertical Bruker Advance 400 WB de 9.4T equipat amb una sonda per imatges amb diàmetre de bobina de 35mm.

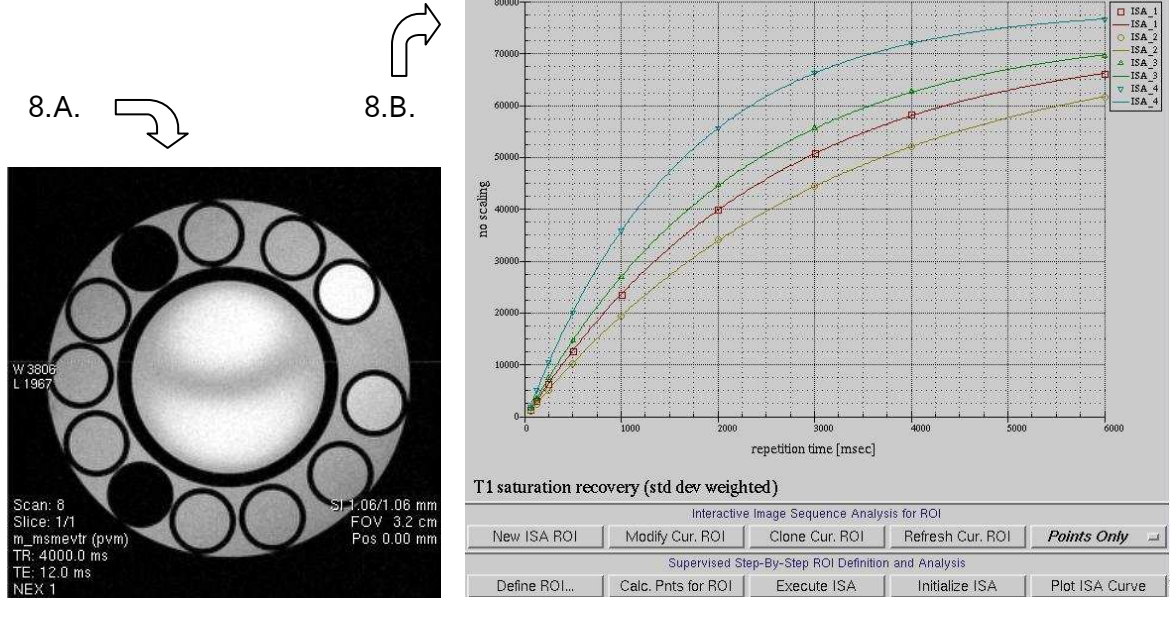
Les seqüències emprades per determinar el T<sub>1</sub> de les mostres han estat:

- 1er. Seqüència scouting GEFI\_ORTHO per localitzar la mostra.
- 2on. Seqüència MSMEVTR amb TE 3.999ms, TR (n=9): 6.000ms, 3.000 ms, 2.000 ms, 1.000 ms, 500 ms, 250 ms, 125 ms, 62.5ms, resolució de 128x128 pixels.

En cada lectura s'ha analitzat vuit mostres d'extractes (hi ha dos extractes per cada mostra) i les mostres de la recta de calibració. (Fig.8)



Fig 8.A. Imatge de RM de les mostres disposades circularment. Fig 8.B. Full de càlcul per determinar T1 (correlació entre el TR i el senyal rebut)



A partir de la concentració de gadolini en cadascun dels dos extractes de cada mostra es pot conèixer la quantitat de gadolini present a cada mostra  $i$ , de resultes (dividint per la concentració de gadolini del tampó de perfusió), s'obté el volum extracel·lular de la mostra.

El volum intracel·lular és una mesura indirecta que resulta de la diferència de l'aigua total i l'aigua extracel·lular.

### C.6. Anàlisi estadística

Els resultats s'han expressat numèricament com mitjana (promig) i desviació estàndard (desvest). A les gràfiques de columnes s'ha representat l'error estàndard.

El test estadístic emprat ha estat la t d'Student amb dues cues i considerant un error alfa de 0.05 com a límit de significació estadística. El coeficient de variació (CV) s'expressa en percentatge. Com que s'ha analitzat varies mostres procedents del mateix cor, s'ha determinat la mitjana i la desviació estàndard de les mesures procedents del mateix cor així com dels promitjos de les mostres del mateix grup.

S'ha comparat cada grup respecte el control normoxic i respecte el grup d'isquèmia-reperfusió. No s'ha considerat adient una comparació conjunta dels grups ja que el que es volia avaluar eren les diferències respecte els grups control (normoxic i "isquèmia-reperfusió" sense mesures de protecció).

S'ha fet una estimació aproximada de la precisió del mètode a partir del coeficient de variació (CV) intraindividual. No es pot determinar amb exactitud la precisió del mètode perquè el fet que les mostres siguin de regions cardíques diferents pot ser causa de variació en el resultat. Això és així perquè el dany secundari a la isquèmia reperfusió així com el grau d'edema intersticial degut a la perfusió salina poden variar segons el gruix del miocardi i la tensió exercida per la paret.

### **C.7. Adquisició d'imatges del cors *ex-vivo* per RM**

Per tal de poder prendre les imatges del cor sencer, s'ha emprat un sistema de suspensió dels cors a l'interior d'un tub Falcon de 15mL que conté FOMBLIN® [Sigma], un oli amb propietats magnètiques similars a l'aigua però que no conté hidrògens; aquestes propietats permeten generar un entorn ideal per als cors i obtenir unes imatges de ressonància magnètica de qualitat, lliures d'interferències, alhora que s'aconsegueix evitar variacions en el contingut d'aigua dels cors, ja que estan envoltats d'un medi anhidre.

Les seqüències emprades per a l'adquisició de les imatges han estat les següents:

- 1er. **GEFI-ORTHO** per localitzar la mostra.
- 2on. **RARE\_8\_TRANSVERS** per adquirir els talls tomogràfics i poder quantificar T2 i, per tant, l'àrea en risc.
- 3er. **DWI** per adquirir les seqüències de difusió.

## D) RESULTATS

### D.1. Mostres incloses a l'anàlisi

A la Fig 9 es mostra el diagrama de fluxe de les dades analitzades. Partint de 4 cors per cadascun dels 4 protocols estudiats, disposem inicialment de 16 cors. D'aquests 16 cors es va excloure 1 cor del protocol de normòxia per sospita d'isquèmia no controlada durant l'experiment i 1 cor del protocol d'I40R30-manitol per alteració durant la manipulació. Cada cor es va dividir en 4 porcions: les quatre porcions es van liofilitzar per determinar aigua total. La intenció inicial era analitzar únicament 3 de les 4 mostres per cor per determinar l'aigua extracel·lular. Per problemes tècnics durant la manipulació de les mostres s'hagué d'excloure de l'anàlisi una mostra del protocol d'I40R30 i una altra del protocol IPC-I40R30.

Per tant, finalment es va analitzar 56 mostres procedents de 14 cors per determinar aigua total (12+16+12+16 per cada protocol) i 40 mostres per determinar aigua extracel·lular (9+11+9+11 per cada protocol).

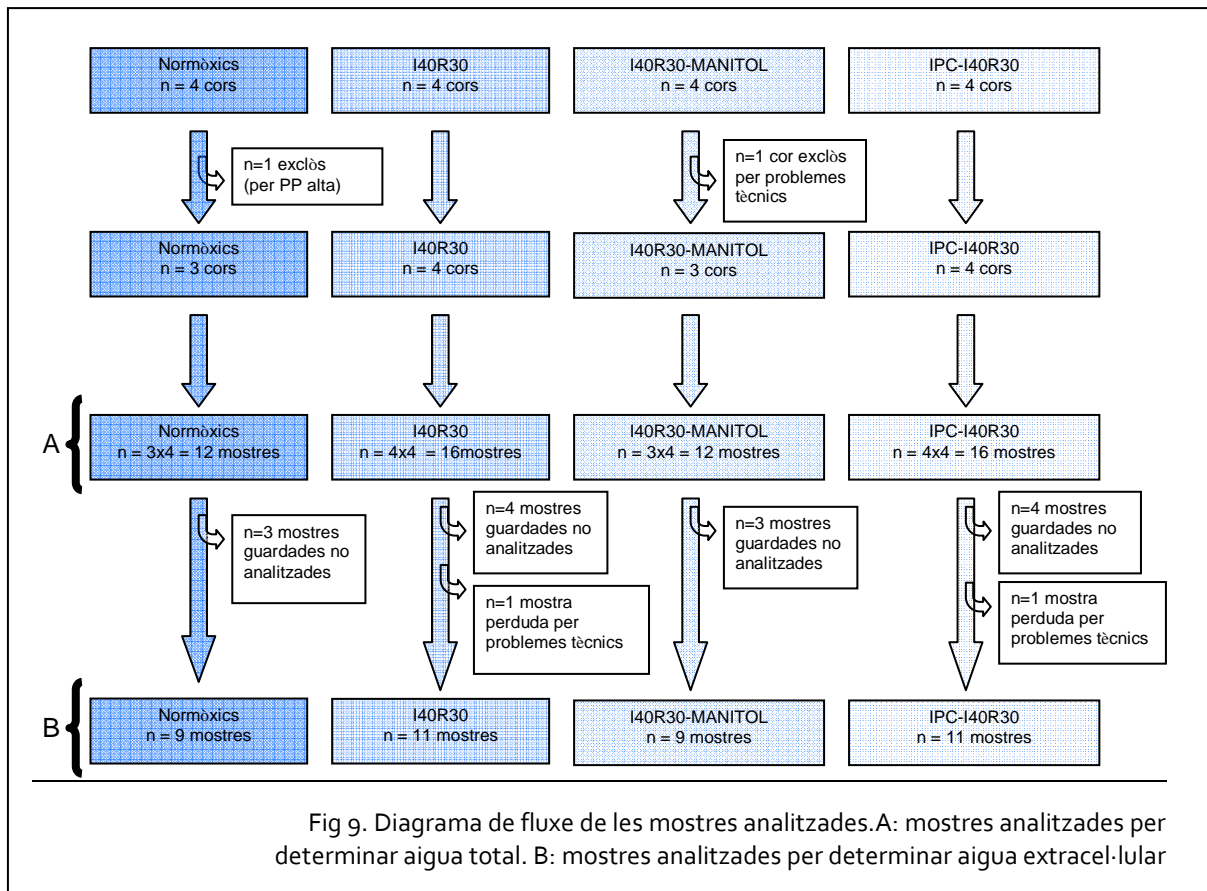


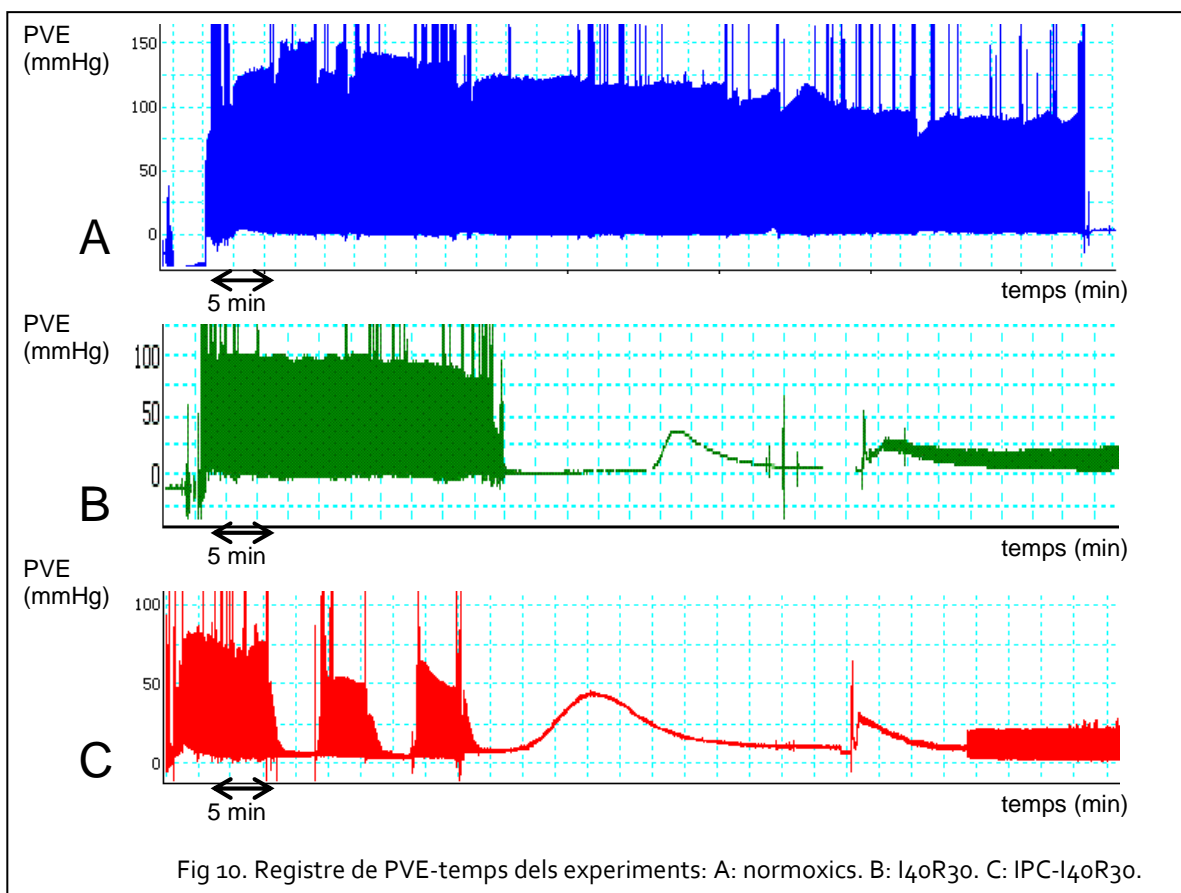
Fig 9. Diagrama de fluxe de les mostres analitzades. A: mostres analitzades per determinar aigua total. B: mostres analitzades per determinar aigua extracel·lular

## D.2. Experiments d'isquèmia-reperfusió en cor aïllat

### - Experiments al Langendorff

Com ja s'ha explicat més amunt, la part d'experiment realitzada al sistema Langendorff es va dur a terme de forma satisfactòria: dels 16 cors perfosos només un va haver de ser exclòs de l'anàlisi per presentar isquèmia no controlada (detectada com a PP massa elevada).

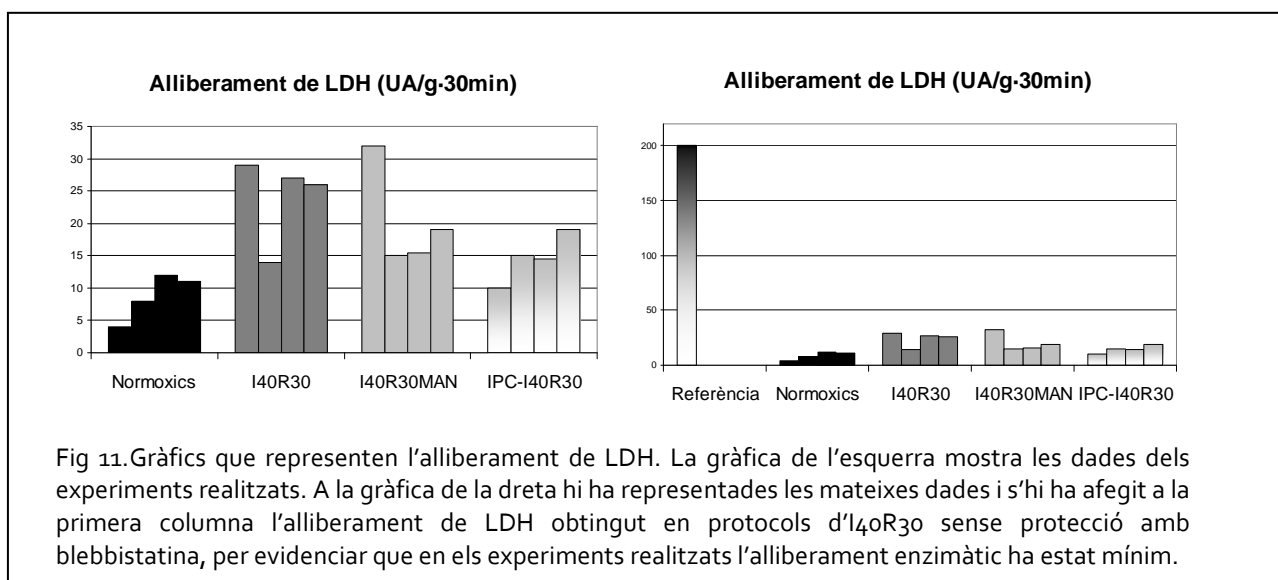
Les PVE s'han mantingut en els períodes d'equilibrat entre 10-15mmHg la pressió telediastòlica i entre 75-115 mmHg la pressió màxima exercida durant la sistole. Als períodes d'isquèmia s'observa una disminució progressiva de l'activitat sistòlica generada pel ventricle fins arribar a l'asistòlia en els primers 2 minuts de la isquèmia. Passats uns 20 min d'isquèmia els cors presenten augment de la pressió intraventricular com a reflex del rigor secundari a la isquèmia. Durant la reperfusió s'observa una discreta recuperació de l'activitat sistòlica, que en el nostre model és molt pobre degut a l'administració de blebbistatina (un inhibidor de la contractilitat) durant el primer minut de reperfusió (Fig 10). Les PP han oscil·lat entre 35-45mmHg i en cada experiment s'han mantingut estables.



### - Necrosi del teixit miocardiàc

Segons la determinació d'alliberament de LDH mesurada per espectrofotometria i calculada finalment com AUC de les diferents determinacions realitzades al llarg del temps, s'ha obtingut les mesures de necrosi miocardiàca representades a la Fig 11 i expressada com Unitats de LDH per gram de miocàrdic (teixit sec) i temps.

Aquests resultats reflecteixen una escassa mort cel·lular si ho comparem amb la mort cel·lular en protocols similars d'isquèmia-reperfusió en què la quantitat de LDH alliberada és al voltant de 200 UA/gram de teixit sec en el mateix període de temps (31). Per tant, en els experiments realitzats, tot i que sí que hi ha hagut alguns cors que han presentat més mort cel·lular que altres, aquest grau de necrosi és igualment molt escàs i no creiem que aquestes diferències puguin afectar els resultats.



### D.3. Edema total

S'ha observat un increment estadísticament significatiu ( $p < 0.01$ ) del contingut total d'aigua respecte els controls normoxics als cors sotmesos a isquèmia reperfusió sense maniobres de protecció (376 vs 423 mL d'aigua total per 100g de teixit sec) i també als cors tractats amb preconditionament isquèmic (376 vs 439 mL d'aigua total per 100g de teixit sec), Fig 12. Els cors tractats amb reperfusió hipertònica no presenten diferències estadísticament significatives respecte els controls normoxics

pel que fa al contingut total d'aigua ( 376 vs 363 mL d'aigua total per 100g de teixit sec).  
Fig 12.

Si comparem les dues estratègies de protecció miocardiàca enfront la isquèmia (precondicionament isquèmic i reperfusió hipertònica) amb la isquèmia reperfusió sense protecció s'observa una reducció de l'edema total amb la reperfusió hipertònica (423 vs 363 mL d'aigua total per 100g de teixit sec,  $p < 0.001$ ) però no amb el precondicionament isquèmic.

Les dades es troben expressades a la taula de la Fig 12.A i representades gràficament a la Fig 12.B (12.B.1: controls normoxics amb cadascun dels protocols i 12.B.2.: I40R30 respecte els protocols amb protecció miocardiàca).

	PROMIG	DESVEST	CV (%)
NORMOXIC-A	351	14,8	4,2
NORMOXIC-C	396	14,3	3,6
NORMOXIC-D	382	13,8	3,6
PROMIG	<b>376</b>	<b>14,3</b>	<b>3,8</b>
DE	<b>23,2</b>		
CV (%)	<b>6,2</b>		

	PROMIG	DESVEST	CV (%)
I40R30-MAN-A	381	12,6	3,
I40R30-MAN-B	370	7,2	1,9
I40R30-MAN-C	355	3,6	1,0
I40R30-MAN-D	349	11,9	3,4
PROMIG	<b>364</b>	<b>8,8</b>	<b>2,4</b>
DE	<b>14,3</b>		
CV (%)	<b>3,9</b>		

	PROMIG	DESVEST	CV (%)
I40R30A	430	8,0	1,9
I40R30B	410	9,5	2,3
I40R30C	439	6,9	1,6
I40R30D	415	6,6	1,6
PROMIG	<b>423</b>	<b>7,8</b>	<b>1,8</b>
DE	<b>13,2</b>		
CV (%)	<b>3,1</b>		

	PROMIG	DESVEST	CV (%)
IPC-I40R30-A	438	15,1	3,5
IPC-I40R30-B	436	7,6	1,8
IPC-I40R30-C	426	3,3	0,8
IPC-I40R30-D	440	7,5	1,7
PROMIG	<b>435</b>	<b>8,4</b>	<b>1,9</b>
DE	<b>6,2</b>		
CV (%)	<b>1,4</b>		

Fig 12.A.

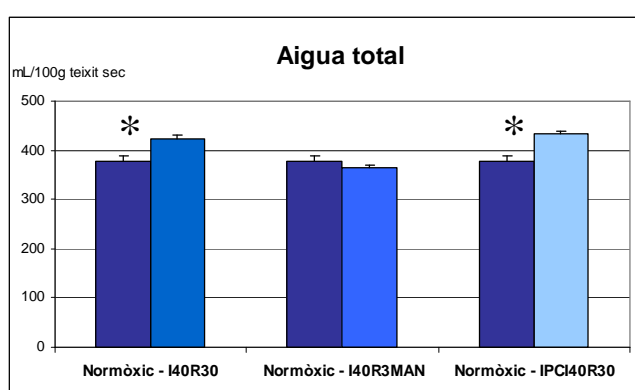


Fig 12.B.1

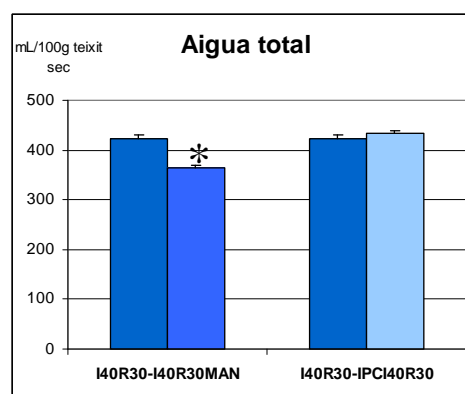


Fig 12.B.2

#### D.4. Edema extracel·lular i intracel·lular

No s'han trobat diferències estadísticament significatives pel que fa a l'aigua extracel·lular entre els diferents grups, ni en els diferents protocols d'isquèmia respecte els normoxics ni en els protocols de protecció enfront la isquèmia respecte la isquèmia-reperfusió sense estratègies de protecció. Les dades es presenten de la mateixa manera que l'aigua total (Fig 13.A: taula; Fig 13.B.1: Gràfica de comparació amb controls nomòxics; Fig 13.B.2 Gràfica de comparació amb I40R30)

	PROMIG	DESVEST	CV (%)
NORMOXIC-A	152	11,1	7,3
NORMOXIC-C	215	0,3	0,1
NORMOXIC-D	203	22,7	11,2
PROMIG	<b>183</b>	<b>5,7</b>	<b>3,7</b>
DE	<b>44,6</b>		
CV (%)	<b>24,3</b>		

	PROMIG	DE	CV (%)
I40R30-MAN-A	252	20,3	8,1
I40R30-MAN-B	223	6,8	3,0
I40R30-MAN-C	211	3,1	1,4
PROMIG	<b>228</b>	<b>10,0</b>	<b>4,2</b>
DE	<b>21</b>		
CV (%)	<b>9,2</b>		

	PROMIG	DE	CV (%)
I40R30A	226	29,3	13,0
I40R30B	180	6,0	3,3
I40R30C	237	20,4	8,6
I40R30D	170	16,7	9,9
PROMIG	<b>203</b>	<b>18,1</b>	<b>8,7</b>
DE	<b>33,3</b>		
CV (%)	<b>16,4</b>		

	PROMIG	DE	CV (%)
IPC-I40R30-A	204	12,8	6,3
IPC-I40R30-B	242	5,1	2,1
IPC-I40R30-C	204,6	18,6	9,1
IPC-I40R30-D	220,7	19,5	8,8
PROMIG	<b>218,0</b>	<b>14,0</b>	<b>6,6</b>
DE	<b>21,8</b>		
CV (%)	<b>10,0</b>		

Fig 13.A

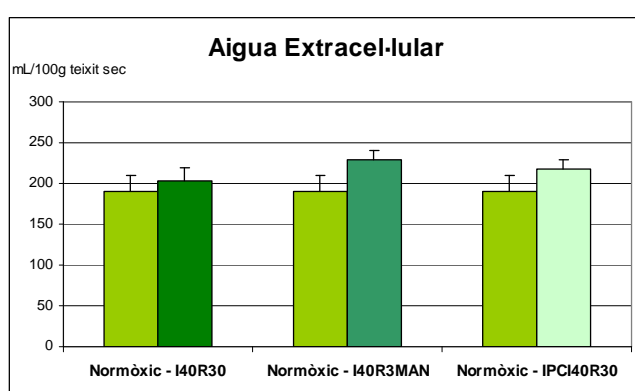


Fig 13.B.1

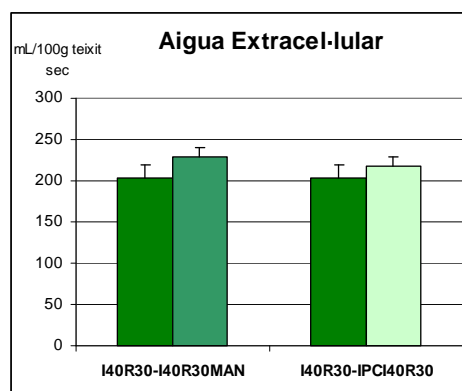


Fig 13.B.2

Sí s'han trobat, en canvi, diferències estadísticament significatives pel que fa al contingut d'aigua intracel·lular. Respecte els controls normoxics s'observa diferència estadísticament significativa en tots els grups: en els grups I40R30 i IPC- I40R30 s'observa un augment del contingut d'aigua intracel·lular (192mL al normoxic vs 222mL a I40R30 o 214mL a IPC-I40R30,  $p = 0.04$  i  $p = 0.02$  respectivament) mentre que el grup I40R30-Manitol mostra una reducció de l'edema intracel·lular (139mL,  $p = 0.001$ ) Fig 14.

En comparar els protocols amb protecció miocardiaca respecte la I40R30 s'ha trobat una reducció de l'edema intracel·lular, que en el grup de I40R30-manitol és estadísticament significativa (139mL vs 222mL,  $p = 0.001$ ) però per al grup IPC-I40R30 aquesta reducció no arriba a ser estadísticament significativa. (Fig 14.A: taula; Fig 14.B.1: Gràfica de comparació amb controls nomòxics; Fig 14.B.2 Gràfica de comparació amb I40R30).

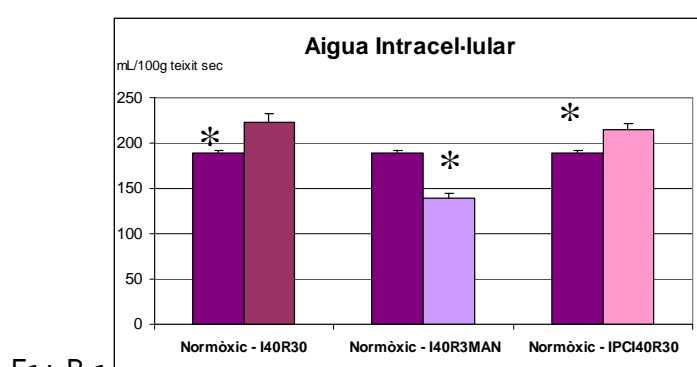
	PROMIG	DESVEST	CV (%)
NORMOXIC-A	192	6,8	3,5
NORMOXIC-C	192	24,2	12,6
NORMOXIC-D	182	13,4	7,4
PROMIG	<b>192</b>	<b>15,5</b>	<b>8,1</b>
DE	<b>0,03</b>		
CV (%)	<b>0,02</b>		

	PROMIG	DESVEST	CV (%)
I40R30-MAN-A	131	6,8	5,2
I40R30-MAN-B	144	5,0	3,5
I40R30-MAN-C	145	3,6	2,5
PROMIG	<b>140</b>	<b>5,1</b>	<b>3,7</b>
DE	<b>7,9</b>		
CV (%)	<b>5,6</b>		

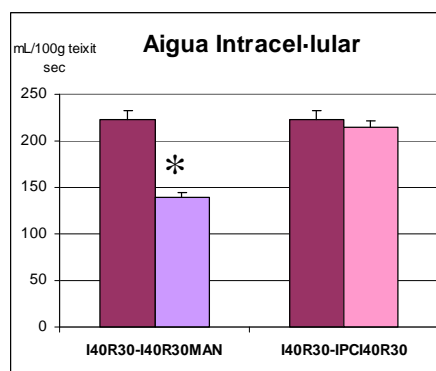
	PROMIG	DESVEST	CV (%)
I40R30A	207	17,0	8,2
I40R30B	232	9,1	3,9
I40R30C	204	19,6	9,6
I40R30D	247	22,6	9,2
PROMIG	<b>222</b>	<b>17,0</b>	<b>7,7</b>
DE	<b>20,3</b>		
CV (%)	<b>9,2</b>		

	PROMIG	DESVEST	CV (%)
IPC-I40R30-A	223	1,6	0,7
IPC-I40R30-B	196	11,1	5,7
IPC-I40R30-C	221	18,0	8,2
IPC-I40R30-D	219	15,7	7,2
PROMIG	<b>215</b>	<b>11,6</b>	<b>5,4</b>
DE	<b>13,8</b>		
CV (%)	<b>6,4</b>		

Fig 14.A



F14.B.1

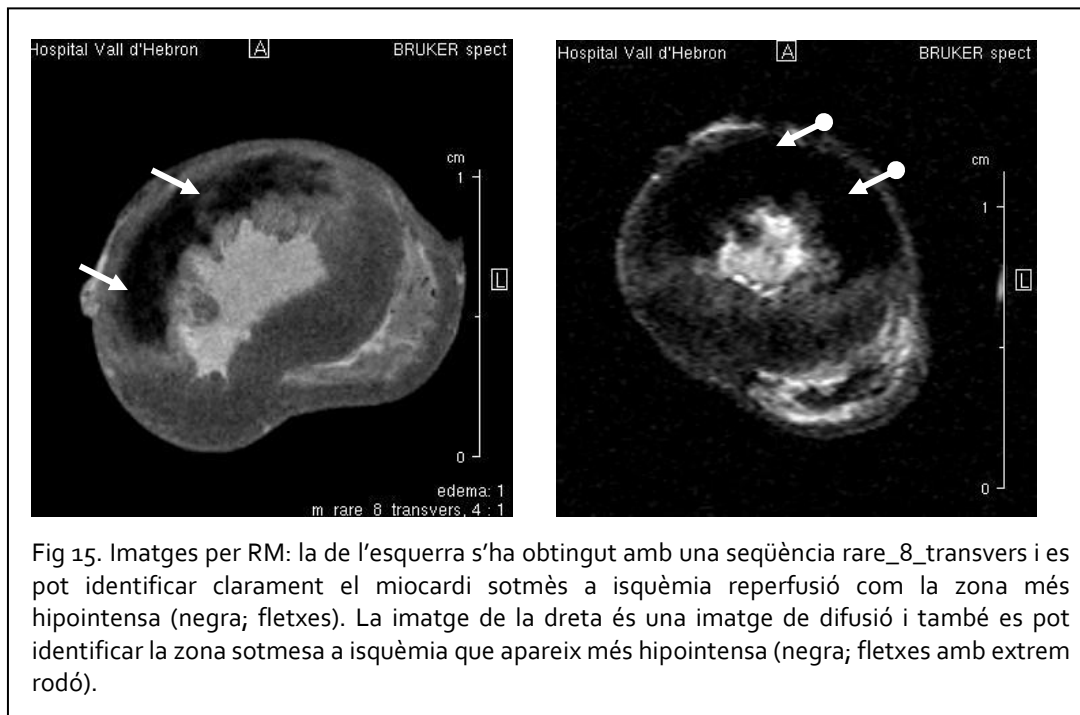


14.B.2



### D.5. Imatges per ressonància magnètica

S'ha realitzat algunes imatges amb RM per començar a valorar la possibilitat de diferenciar l'edema intracel·lular de l'extracel·lular al miocardi (Fig 15). Tot i que són experiments molt preliminars, sí podem dir que amb les seqüències emprades per valorar la difusió es diferencia clarament les zones de necrosi del miocardi sa. Aquest és un camí encara per explorar i serà motiu de pròximes investigacions.



## **E) DISCUSSIÓ**

### **E. 1. Discussió respecte la fiabilitat i les limitacions del mètode**

Les dades obtingudes amb el nostre mètode són concordants amb experiments previs realitzats amb altres marcadors d'espai extracel·lular, la qual cosa fa reforçar la idea que la determinació de l'espai extracel·lular emprant gadolini com marcador és factible. Així mateix els resultats suggereixen que el mètode és tan reproduïble i fiable com altres tècniques prèviament descrites a la literatura. Donat que no existeix cap "gold standard" per a la determinació de la distribució dels espais intracel·lular i extracel·lular, no s'ha considerat oportú comparar el mètode directament amb una altra tècnica en ús però no contrastada amb un referent vàlid.

Respecte la precisió del mètode, com ja s'ha comentat a l'apartat C.6., només s'ha pogut fer una estimació aproximada de la precisió en base a la comparació del CV intraindividual, que ha estat raonablement petit, amb valors que s'han comprès entre 1.8-3.8%. Aquests valors de CV intraindividual ens fan pensar que la precisió del mètode és suficient.

Una consideració respecte el mètode que no es pot ignorar és el fet d'haver-lo validat únicament en situacions d'absència de necrosi significativa. Es va decidir *a priori* emprar models amb poca mort cel·lular perquè en cas de ruptura del sarcolema els espais intra i extracel·lular deixen d'estar ben diferenciats i creïem important que, almenys per posar a punt el mètode, aquests espais estiguessin ben definits. És precisament per evitar la ruptura del sarcolema que s'ha administrat blebbistatina a l'inici de la reperfusió. La blebbistatina és un inhibidor selectiu de l'acoblament actina-miosina i redueix intensament la mort cel·lular durant la reperfusió en evitar la hipercontractura i la ruptura del sarcolema. Cal matisar que la mort cel·lular no equival exactament a la ruptura del sarcolema, ja que pot haver-hi cèl·lules irreversiblement danyades però que gràcies a l'efecte de la blebbistatina han preservat la integritat del sarcolema durant els 30 minuts de reperfusió. Ara per ara, però, la manera de verificar i quantificar la mort cel·lular és precisament mesurant l'alliberament de proteïnes intracel·lulars, és a dir, valorant quantitativament el miocardi que ha patit ruptura del sarcolema. No es pot

assegurar, doncs, que la blebbistatina eviti la mort cel·lular, sinó que impedeix la ruptura del sarcolema (tant de cèl·lules irreversiblement danyades com de cèl·lules encara viables i que gràcies a l'efecte de la blebbistatina sobreviuran).

Probablement el mètode és aplicable també en cas de ruptura del sarcolema, però caldrà fer més experiments per tal de comprovar-ho. En qualsevol cas, encara que el mètode sigui vàlid independentment de si s'ha produït o no necrosi, la dificultat en cas de ruptura del sarcolema no és quantificar l'espai extracel·lular sinó interpretar les dades, ja que en el moment en què el sarcolema perd la seva integritat, el contingut de la cèl·lula deixa de ser espai intracel·lular i passa a forma part de l'espai extracel·lular. Determinar bé aquesta qüestió també serà un dels reptes pel futur.

## **E.2. Discussió sobre els resultats dels experiments realitzats per comprovar el mètode**

És un fet àmpliament acceptat que l'edema miocardiàc és un dels components del dany per isquèmia-reperfusió (32-34), juntament amb el dany microvascular, les alteracions en el metabolisme del calci o l'hemorràgia.

D'acord amb les evidències prèvies, els nostres resultats mostren un augment de l'edema miocardiàc total als cors sotmesos a isquèmia-reperfusió. El fet que s'hagi emprat blebbistatina per evitar la ruptura del sarcolema secundària a la hipercontractura durant la perfusió pot explicar en part el menor grau d'edema observat en els cors sotmesos a isquèmia-reperfusió sense estratègies de protecció, ja que experiments previs en què no s'havia administrat blebbistatina mostraven un grau d'edema significativament superior.

Els cors sotmesos a isquèmia reperfusió però tractats amb estratègies de protecció (reperfusió hipertònica o preconditionament isquèmic) mostren una reducció de l'edema intracel·lular: en el cas de la reperfusió hipertònica amb manitol aquesta reducció és estadísticament significativa ( $p = 0.0002$ ) mentre que amb el preconditionament isquèmic queda només en una tendència.

El fet que amb les dues estratègies de protecció s'observi una reducció de l'edema intracel·lular resulta interessant per dos motius. Per una banda la reperfusió hipertònica és una estratègia directament dirigida a reduir l'edema intracel·lular per un mecanisme merament osmòtic (el fet que el medi extracel·lular sigui hipertònic arrossega aigua del citosol cap a l'interstici a favor del gradient osmòtic, ja que el medi hipertònic administrat durant la reperfusió supera l'augment de la osmolaritat intracel·lular generat durant la isquèmia); per tant era esperat observar aquest resultat. Experiments previs ja han demostrat que aquesta estratègia redueix la mort cel·lular per isquèmia reperfusió i, per tant, es pot relacionar l'efecte protector amb la disminució de l'edema intracel·lular (28). Un possible mecanisme pel qual l'edema intracel·lular afavoreix la mort cel·lular durant la reperfusió és per la major tensió experimentada pel sarcolema en produir-se la hipercontractura durant la reperfusió, tot i que probablement hi ha altres mecanismes implicats encara no identificats.

Per altra banda, amb el preconditionament isquèmic també s'observa una tendència a la reducció de l'edema intracel·lular que caldrà continuar valorant amb més experiments, ja que pot tractar-se d'una diferència menor des del punt de vista quantitatiu no detectable amb una  $n=4$ , però rellevant des del punt de vista fisiopatològic. En aquest cas el menor edema intracel·lular ha d'estar en relació al menor dany cel·lular induït pels cicles breus d'isquèmia del preconditionament. Està per demostrar si aquesta reducció de l'edema és només un reflex de la protecció miocardiàca induïda pel preconditionament o bé és un dels efectes pels quals es redueix la mort cel·lular.

## **F) CONCLUSIONS**

1er. Els experiments realitzats demostren que és factible emprar el Gd-DOTA com marcador d'espai extracel·lular.

2on. La isquèmia incrementa l'edema intracel·lular mentre que la reperfusió hipertònica el redueix de manera significativa. El preconditionament isquèmic presenta una tendència a la disminució de l'edema intracel·lular que no ha arribat a ser estadísticament significativa.

3er. Es reforça la idea que la reducció de l'edema intracel·lular contribueix a reduir el dany cel·lular secundari a la isquèmia miocardiàca, tot i que cal investigar profundament la relació "causa-efecte" entre l'edema i el dany cel·lular així com els mecanismes implicats en la fisiopatologia de l'edema miocardiàc.

**G) BIBLIOGRAFIA**

1. García-Dorado D, Oliveras J, Gili J, Sanz E, Pérez-Villa F, Barrabés 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
2. Tranum-Jensen J, Janse MJ, Fiolet WT, Krieger WJ, D'Alnoncourt CN, Durrer D. Tissue osmolality, cell swelling, and reperfusion in acute regional myocardial ischemia in the isolated porcine heart. *Circ Res.* 1981 Aug;49(2):364-81.
3. Laine GA, Allen SJ. Left ventricular myocardial edema. Lymph flow, interstitial fibrosis, and cardiac function. *Circ Res.* 1991 Jun;68(6):1713-21.
4. Butler CR, Thompson R, Haykowsky M, Toma M, Paterson I. Cardiovascular magnetic resonance in the diagnosis of acute heart transplant rejection: a review. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2009 Mar 12;11:7. Review.
5. Salisbury PF, Cross CE, Katsuhara K, Rieben PA. Factors which initiate or influence edema in the isolated dog's heart. *Circ Res.* 1961 May;9:601-6.
6. Dongaonkar RM, Stewart RH, Geissler HJ, Laine GA. Myocardial microvascular permeability, interstitial oedema and compromised cardiac function. *Cardiovasc Res* 2010 Jul 15;87(2):331-9
7. Desai KV, Laine GA, Stewart RH, Cox CS Jr, Quick CM, Allen SJ, Fischer UM. Mechanics of the left ventricular myocardial interstitium: effects of acute and chronic myocardial edema. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 Jun;294(6):H2428-34.
8. Salisbury PF, Cross CE, Rieben PA. Distensibility and water content of heart muscle before and after injury. *Circ Res.* 1960 Jul;8:788-93.
9. Bragadeesh T, Jayaweera AR, Pascotto M, Micari A, Le DE, Kramer CM, Epstein FH, Kaul S. Post-ischaemic myocardial dysfunction (stunning) results from myofibrillar oedema. *Heart* 2008;94:166-171.
10. Davis KL, Laine GA, Mehlhorn U, Brennan M, Allen SJ. Effects of myocardial edema on the development of myocardial interstitial fibrosis. *Microcirculation.* 2000 Aug; 7 (4):269-80.

11. Saeed M, Hetts S, Wilson M. Reperfusion injury components and manifestations determined by cardiovascular MR and MDCT imaging. *World J Radiol.* 2010 Jan 28;2(1):1-14.
12. Eitel I and Friedrich MG. T2-weighted cardiovascular magnetic resonance in acute cardiac disease.. *J Cardiovasc Magn Reson* 2011;13:13
13. García-Dorado D. and Oliveras J. Myocardial oedema: a preventable cause of reperfusion injury? *Cardiovasc Res* 1993;27:1555-1563
14. Vandenberg JI, Rees SA, Wright AR, Powell T. Cell swelling and ion transport pathways in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 1996; 32:85-97.
15. Friedrich MG. Myocardial edema-a new clinical entity? *Nat Rev Cardiol* 2010;7:292-296
16. Butler TL, Egan JR, Graf FG, Au CG, McMahan AC, North KN, Winlaw DS. Dysfunction induced by ischemia versus edema: does edema matter? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009 Jul; 138(1):141-7, 147.e1
17. Page E , Winterfield J, Goings G, Bastawrous A, Upshaw-Earley Water channel proteins in rat cardiac myocyte caveolae:osmolarity-dependent reversible internalization. *J. Am J physiol Heart Circ Physiol* 1998;274:H1988-H2000.
18. Rodriguez-Sinovas A, Cabestrero A, López D, Torre I, Morente M, Abellán A, Miró E, Ruiz-Meana M, García-Dorado D. The modulatory effects of connexin 43 on cell death/survival beyond cell coupling. *Prog Biophys Mol Biol.* 2007;94:219-232.
19. Kozera L, White E, Calaghan S. Caveolae act as membrane reserves which limit mechanosensitive I(Cl,swell) channel activation during swelling in the rat ventricular myocyte. *PLoS One.* 2009 Dec 14;4(12):e8312.
20. Desai KV, Laine GA, Stewart RH, Cox CS Jr, Quick CM, Allen SJ, Fischer UM. Mechanics of the left ventricular myocardial interstitium: effects of acute and chronic myocardial edema. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 Jun;294(6):H2428-34.
21. Giri S, Chung YC, Merchant A, Mihai G, Rajagopalan S, Raman SV, Simonetti OP. T2 quantification for improved detection of myocardial edema. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2009 Dec 30;11:56.

22. Turschner O, D'hooge J, Dommke C, Claus P, Verbeken E, De Scheerder I, Bijmens B, Sutherland GR. The sequential changes in myocardial thickness and thickening which occur during acute transmural infarction. *Eur Heart J* (2004) 25, 794-803
23. Dent CL, Scott MJ, Wickline SA, Hall CS. High-frequency ultrasound for quantitative characterization of myocardial edema. *Ultrasound Med Biol*. 2000 Mar;26(3):375-84.
24. Dobson GP, Cieslar JH. Intracellular, interstitial and plasma spaces in the rat myocardium in vivo. *J Mol Cell Cardiol*. 1997 Dec;29(12):3357-63.
25. Aliev MK, Dos Santos P, Hoerter JA, Soboll S, Tikhonov AN, Saks VA. Review: water content & its intracellular distribution in intact and saline perfused rat hearts revisited. *Cardiovasc Res* .2002, 53 (1): 48-58
26. Shinar H, Navon G. The determination of intracellular water space by NMR. *FEBS Lett*. 1985 Nov 25;193(1):75-8.
27. Aliev MK, Khatkevich AN, Tsyplenkova VG, Meertsuk FE, Kapelko VI. Tracer kinetics analysis of the extracellular spaces in saline perfused hearts. *Exp Clin Cardiol*. 2001 ; 6(4):188-94.
28. García-Dorado D, Théreoux P, Muñoz R, Alonso J, Elizaga J, Fernández-Avilés F, BOtas J, Solares J, Soriano J, Duran JM. Favorable effects of hyperosmotic reperfusion on myocardial edema and infarct size. *Am J Physiol*. 1992 Jan;262(1 Pt 2):H17-22.
29. Garcia-Dorado D, Rodriguez-Sinovas A, Ruiz-Meana M, Inserte J, Agulló L , Cabestrero A. The end-effectors of preconditioning protection against myocardial cell death secondary to ischemia–reperfusion. *Cardiovasc Res* 70 (2006) 274 – 285
30. Padilla F, Garcia-Dorado D, Rodríguez-Sinovas A,Ruiz-Meana M, Inserte J, and Soler-Soler J. Protection afforded by ischemic preconditioning is not mediated by effects on cell-to-cell electrical coupling during myocardial ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H1909–H1916, 2003.
31. Inserte J, Barba I, Hernando v, Abellán A, Ruiz-Meana M, Rodríguez-Sinovas A, Garcia-Dorado D. Effect of acidic reperfusion on prolongation of



- intracellular acidosis and myocardial salvage. *Cardiovascular Research* (2008) 77, 782–790
32. Abdel-Aty H, Cocker M, Meek C, Tyberg JV, Friedrich MG. Edema as a very early marker for acute myocardial ischemia: a cardiovascular magnetic resonance study. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Apr 7;53(14):1194-201.
33. Saeed M, Hetts S, Wilson M. Reperfusion injury components and manifestations determined by cardiovascular MR and MDCT imaging. *World J Radiol*. 2010 Jan 28;2(1):1-14.
34. Jennings RB, Schaper J, Hill ML, Steenbergen C Jr, Reimer KA. Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. Changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure. *Circ Res*. 1985 Feb;56(2):262-78.