

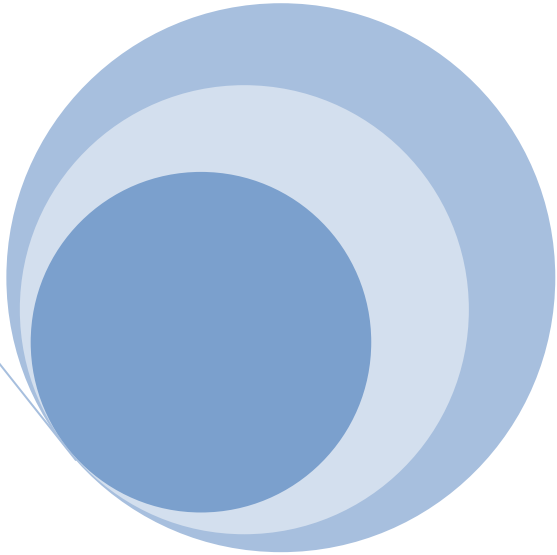


Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



TESI DOCTORAL
Paper de l'edema
miocardiàc en el dany
per isquèmia –
reperfusió. Estudi de la
distribució de l'edema
mitjançant ressonància
magnètica

Autora: Mireia Andrés Villarreal

Programa de Doctorat: Medicina

Departament de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

2017

Codirectors

Dr. David Garcia- Dorado

Dr. Ignasi Barba Vert



Paper de l'edema miocardiàc en el dany per isquèmia – reperfusió. Estudi de la distribució de l'edema mitjançant ressonància magnètica

No només hi ha aigua al món,
sinó que hi ha un món a l'aigua.
Dogen Zenji. 1200-1253.

Agraïments

“És el temps que has dedicat a la teva rosa el que l’ha feta tan important”
El Petit Príncep. Antoine de Saint Exupéry

A tots els que, al llarg de la meva vida, m’heu dedicat el vostre temps d’amistat.

Especialment al José Ramón pel seu suport incondicional.
Als nostres fills Martí, Luis i Matilde que em recorden el que és verdaderament important.
A la meva mare Maria Jesús que m’ha donat la vida.

Abreviatures

AQP: Aquaporina

BDM : monoxima 2,3-butanediona

IAM: Infart agut de miocardi

IAMEST: infart agut de miocardi amb elevació del segment ST

IR: Isquèmia - Reperfusió

mRNA: àcid ribonucleic missatger

RM: Ressonància magnètica

RS: Reticle sarcoplàsmic

SERCA: Bomba de calci del reticle sarcoendoplàsmic

VEGF : factor de creixement endotelial vascular

ÍNDIX

1	Introducció	11
1.1	Edema miocardiàc: causes i mecanismes descrits	12
1.1.1	Fisiologia del balanç hídric al miocardi i fisiopatologia de l'edema miocardiàc.....	13
1.1.2	Cardiopatia isquèmica i dany per isquèmia reperfusió	22
1.1.3	Inflamació del miocardi.....	28
1.1.4	Augment de pressió a les cavitats cardíaques.....	29
1.2	Conseqüències i efectes de l'edema miocardiàc.....	30
1.2.1	Disfunció ventricular sistòlica	30
1.2.2	Fibrosi del miocardi i disfunció diastòlica	30
1.2.3	Obstrucció microvascular i manca de flux amb artèria epicàrdica permeable en la reperfusió	31
1.3	Mesura i determinació de la distribució de l'edema miocardiàc	31
1.3.1	Quantificació del contingut d'aigua al miocardi	31
1.3.2	Determinació de la distribució de l'aigua al miocardi	33
1.3.3	Mesura de la distribució de l'aigua en cor aïllat d'animal petit sotmès a perfusió salina	35
1.4	Fonaments de l'adquisició d'imatges mitjançant ressonància magnètica.....	36
1.4.1	El fenomen de la ressonància magnètica nuclear aplicat a l'adquisició d'imatges	36
1.4.2	Els macro complexos de gadolini com agents de contrast en els estudis de ressonància magnètica	40
1.4.3	Ressonància magnètica cardíaca	41
2	Hipòtesi i objectius.....	43
3	Materials i mètodes	45

3.1	Determinació de la distribució de l'edema en models in vivo i ex vivo de cor de rata	45
3.1.1	Determinació <i>in vivo</i> i <i>in situ</i> de l'espai extracel·lular tot emprant Gadobutrol com marcador d'espai extracel·lular	45
3.1.2	Model de rata <i>in vivo</i>	46
3.1.3	Model de cor aïllat de rata sotmès a perfusió salina	46
3.1.4	Quantificació de l'extensió de l'infart	49
3.1.5	Quantificació de l'aigua total	51
3.1.6	Quantificació del contingut de gadolini a la mostra i determinació de l'espai extracel·lular	53
3.1.7	Determinació de l'aigua intracel·lular	56
3.1.8	Estudi de les seqüències d'imatge per ressonància magnètica amb possible utilitat per determinar la distribució de l'aigua al miocardi.	56
3.1.9	Anàlisi estadística	57
3.2	Determinació clínica de la distribució de l'edema miocardiàc	57
3.2.1	Mostra de pacients: infart agut de miocardi i discinèsia apical transitòria	57
3.2.2	Estudi mitjançant ressonància magnètica cardíaca	58
4	Resultats	59
4.1	El mètode	59
4.1.1	Linearitat de la relació entre [Gd] i T1 ⁻¹	59
4.1.2	Verificació de possibles interferències en la mesura de T1 degudes a restes fèrriques de l'extracte	60
4.1.3	Comprovació del nombre d'extractes necessaris per quantificar adientment el gadolini	61
4.1.4	Cinètica d'arribada del gadolini a l'efluent	63
4.2	Experiments amb cor de rata aïllat sotmès a perfusió salina	64
4.2.1	Experiments en normòxia	64
4.2.2	Experiments amb isquèmia reperfusió	64

Paper de l'edema miocardiàc en el dany per isquèmia – reperfusió. Estudi de la distribució de l'edema mitjançant ressonància magnètica

4.3	Experiments en cor de rata in vivo	67
4.4	Distribució de l'aigua al model de cor de rata	67
4.5	Mort cel·lular (necrosi) i edema	70
4.6	Imatges de RM en el cor de rata	72
4.6.1	Obtenció de les imatges de ressonància magnètica.....	72
4.6.2	Mesura dels paràmetres T2, ADC i DP	75
4.6.3	Relació entre els valors de T2, ADC i DP amb el contingut i la distribució d'aigua	79
4.7	Estudi de RM en pacients	80
4.7.1	Característiques dels pacients	80
4.7.2	Resultats de l'estudi de ressonància magnètica cardíaca.....	82
5	Discussió	85
5.1	Protocols Experimentals.....	85
5.2	Rellevància de la metodologia desenvolupada.....	86
5.3	Importància de les troballes respecte el paper de l'edema en el dany per isquèmia reperfusió al miocardi	87
5.4	Impacte de les troballes als estudis en pacients.....	90
5.5	Consideracions metodològiques	93
5.5.1	Unitats emprades per expressar el contingut d'aigua en els diferents compartiments.....	93
5.5.2	Manipulació de la mostra.....	95
6	Resum de resultats.....	97
7	Conclusions	99
8	Bibliografia.....	101
9	Annex: Articles publicats	113

9.1 Myocardial edema: a translational view. Garcia-Dorado D, Andres-Villarreal M, Ruiz-Meana M, Inserte J, Barba I. J Mol Cell Cardiol. 2012 May;52(5):931-9. Review. 113

9.2 Measuring Water Distribution in the Heart: Preventing Edema Reduces Ischemia-Reperfusion Injury. Andrés-Villarreal M, Barba I, Poncelas M, Inserte J, Rodriguez-Palomares J, Pineda V, Garcia-Dorado D. J Am Heart Assoc. 2016 Dec 17;5(12). 113

1 Introducció

La vida, com l'entendem avui en dia, està basada en l'aigua; tant és així que la recerca de vida fora de la terra es basa en trobar aigua líquida. El component principal dels organismes vius és l'aigua i aquesta suposa aproximadament el 50% del pes del cos humà¹. L'aigua constitueix la base tant del medi intern com intracel·lular². El manteniment de l'homeòstasi, crucial per la supervivència, inclou un estricte control de l'equilibri hídric, tant a nivell intracel·lular, com a nivell d'òrgans, sistemes i de l'organisme en la seva totalitat³.

L'edema (o hidropesia) és el resultat de la pèrdua de la capacitat reguladora de l'equilibri hídric i es defineix clàssicament com un excés en el contingut d'aigua als teixits⁴. Tant la deshidratació com l'edema cel·lular poden comprometre la funció i la supervivència de la cèl·lula. A nivell d'organisme apareix edema en cas de disfunció dels òrgans implicats amb el manteniment de l'equilibri hídric (sistema cardiovascular i renal fonamentalment) o quan s'altera la permeabilitat vascular o la composició de la sang (p.ex. en cas d'hipoproteinèmia⁵). A nivell cel·lular hi ha mecanismes de control del contingut d'aigua, de la tensió de membrana plasmàtica i de la tonicitat intracel·lular molt fins i que impliquen un elevat consum energètic per a la cèl·lula⁶.

En el cas del cor, l'edema miocardiàc apareix en el context de cardiopaties molt diverses, com l'infart agut de miocardi ⁷, la miocarditis ^{8,9}, el rebuig del cor trasplantat ^{10,11} i la hipertensió arterial (sistèmica o pulmonar) ^{12,13} entre d'altres. Malgrat aparèixer en situacions tan variades, hi ha dades a la literatura que suggereixen que l'edema miocardiàc no és una resposta

inespecífica davant qualsevol tipus de noxa al miocardi. Ans al contrari, s'han descrit diferents patrons pel que fa la distribució de l'edema miocardiàc entre els espais intra i extracel·lular, tot suggerint varietat de mecanismes implicats en la seva aparició ⁸. També s'han atribuït a l'edema miocardiàc diferents efectes o conseqüències en funció de la seva distribució i del tipus de dany que l'ha ocasionat. Tot i així, no s'ha demostrat de manera prou sòlida la contribució de l'edema miocardiàc a la mort dels cardiomiòcits o la disfunció cardíaca (tant sistòlica com diastòlica), de manera que la pregunta de si l'edema miocardiàc podria esdevenir una diana terapèutica, encara està per respondre.

Per altra banda, actualment no disposem d'eines diagnòstiques que permetin caracteritzar la distribució de l'edema miocardiàc en l'entorn clínic. Ni tan sols en l'àmbit experimental es mesura habitualment la distribució de l'edema miocardiàc, quedant reduïda la qüestió a la determinació de la quantitat d'aigua total en el cor. El present treball s'emmarca en aquest context, amb la intenció de buscar eines diagnòstiques amb aplicació clínica que permetin valorar la distribució de l'edema miocardiàc i la rellevància que pot tenir l'edema miocardiàc en el context del dany per isquèmia reperfusió, tant pel que fa a la seva contribució al dany i la disfunció del miocardi com a la possibilitat de considerar l'edema com a diana terapèutica per reduir l'extensió de l'infart i la disfunció cardíaca.

1.1 Edema miocardiàc: causes i mecanismes descrits

L'aparició d'un excés d'aigua al teixit miocardiàc es produeix quan es dona un desequilibri entre l'entrada i el drenatge hídric. Per tant, tot allò que incrementi la pressió de perfusió, la permeabilitat vascular a l'aigua, la retenció d'aigua intra tissular o que dificulti un correcte drenatge hídric, tant venós com limfàtic, pot afavorir l'aparició d'edema miocardiàc ¹⁴.

A la literatura s'han descrit alguns factors fisiopatològics associats a l'aparició d'edema miocardiàc, com per exemple: l'augment de la pressió arterial¹³, la dificultat del drenatge degut a un increment de pressió a l'aurícula dreta ¹² (p.ex. en la insuficiència cardíaca o en situació d'assistòlia¹⁴), l'increment de la pressió oncòtica intersticial en cas de necrosi degut a l'alliberament del contingut intracel·lular o l'augment de la permeabilitat vascular en situacions d'inflamació (p.ex. a la miocarditis o al rebuig de cor trasplantat ^{15,16}).

1.1.1 Fisiologia del balanç hídric al miocardi i fisiopatologia de l'edema miocardiàc

En el control del balanç hídric del cor hi participen tant factors a nivell sistèmic i d'òrgan (pressió arterial sistèmica, pressió arterial pulmonar, pressió venosa central, pressió intracavitària...) com a nivell tissular (permeabilitat endotelial) i cel·lular ¹⁷. Els elements implicats en l'edema intersticial queden recollits a l'equació d'Starling ¹⁸ i representats a la Figura 1 . Hi ha forces que afavoreixen la filtració de l'aigua des de l'interior del vas cap a l'espai intersticial (pressió hidrostàtica capil·lar i pressió oncòtica intersticial) i forces que s'hi oposen (pressió hidrostàtica intersticial i pressió oncòtica capil·lar). Aquestes forces són modulades pels coeficients de filtració i de reflexió que expressen la permeabilitat de l'endoteli i les propietats físiques dels medis implicats. L'edema intracel·lular depèn fonamentalment de l'equilibri osmòtic entre els espais intra i extracel·lular: aquest equilibri depèn al seu torn de la composició dels medis i del correcte funcionament energètic de la cèl·lula, necessari per al normal funcionament dels canals i transportadors iònics responsables del manteniment de l'equilibri electrolític i hídric cel·lular.

Els mecanismes implicats en la regulació de la quantitat d'aigua del miocardi són: el cicle sístole-diàstole, la funció endotelial, la presència de resposta inflamatòria i, a nivell intracel·lular, els mecanismes osmòtics.

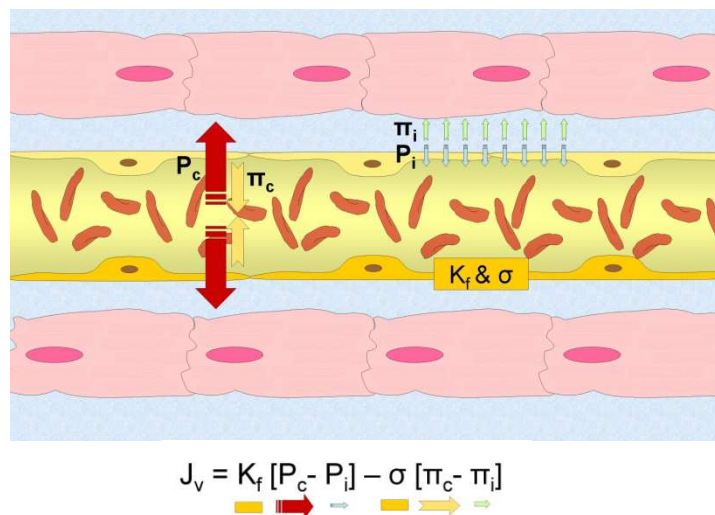


Figura 1 . Llei d'Starling de moviment de fluids, defineix com l'aigua es desplaça de l'espai intravascular a l'intersticial segons la composició del dos espais i la integritat de l'endoteli. Llegendes: Jv: moviment net de fluids entre compartiments. Pc: pressió hidrostàtica capil·lar. Pi: pressió hidrostàtica intersticial. Πc: pressió oncòtica capil·lar. Πi: pressió oncòtica intersticial. Kf: coeficient de filtració transmembrana (és una constant i depèn de la superfície de capil·lars i la seva conductància hidràulica). σ: Coeficient de reflexió (és un factor de correcció de l'efecte de les macromolècules o estructures amb efecte oncòtic que no travessen les membranes capil·lars).

A. Cicle sístole – diàstole i drenatge limfàtic cardíac

La sístole ocasiona un augment de la pressió intramiocardiàca que, per una banda impedeix la perfusió coronària (que es dona únicament durant la diàstole) però que per altra banda afavoreix el drenatge venós i limfàtic del miocardi (fenomen de munyir o *milking*)¹⁹. Aquest efecte mecànic està representat a la Figura 2. L'assistòlia (tant en el context d'aturada cardíaca com durant la cardioplexia) i la disfunció ventricular greu cursen amb una interrupció o disminució d'aquest efecte¹⁹. D'altra banda, si el drenatge venós o limfàtic del miocardi estan minvats, incrementa la pressió intra capil·lar, cosa que afavoreix l'ultra filtrat cap a l'espai intersticial del miocardi alhora que dificulta el flux coronari anterògrad²⁰. Tant l'edema del miocardi com un flux coronari insuficient poden afavorir la disfunció sistòlica post aturada o post cardioplexia o empitjorar la insuficiència cardíaca preexistent²¹, afavorint així un cercle viciós d'edema miocardiàc i insuficiència cardíaca.

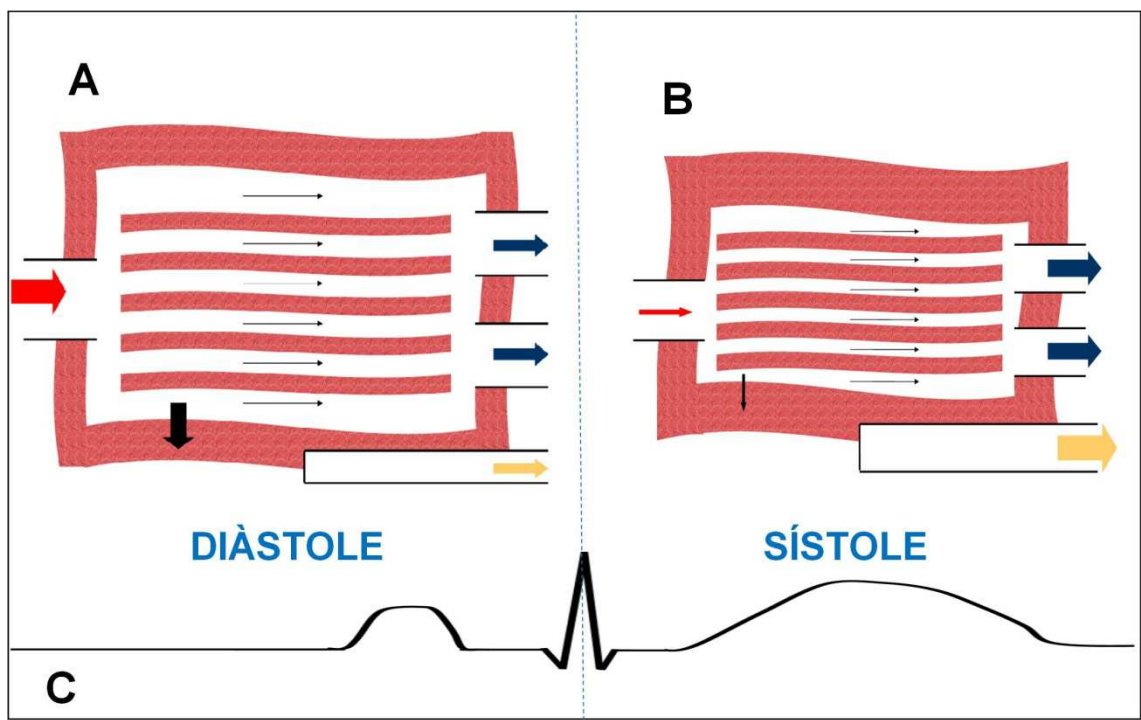


Figura 2. Representació gràfica de l'efecte del cicle sístole-diàstole sobre el moviment de fluids extracel·lulars al miocardi. La caiguda de pressió intracapil·lar durant la relaxació diastòlica (A) facilita el flux anterògrad mentre que la contracció muscular sistòlica (B) contribueix al drenatge venós i limfàtic. C) Electrocardiograma [ona P, complex QRS i ona T]. Modificat de Laine and Granger¹⁹.

B. Funció endotelial

La integritat de l'endoteli és fonamental per a controlar el balanç hídric tissular. En condicions normals, funciona com una membrana semipermeable que permet l'intercanvi de metabòlits, nutrients, gasos (CO_2 i O_2) i aigua, mentre que impedeix la sortida de les proteïnes plasmàtiques i les cèl·lules sanguínies ²².

L'increment de la permeabilitat vascular degut a inflamació causa edema intersticial ^{23–25}. L'endoteli també és vulnerable a la isquèmia - reperfusió, (tot i que és més resistent que el miocardi), de manera que les disruptions de l'endoteli i l'increment de la permeabilitat vascular són fenòmens que es donen en el context de l'infart agut de miocardi, especialment en els infarts extensos amb temps d'isquèmia prolongats²⁶. En aquests casos és més freqüent el fenomen de *no reflow* (manca de recuperació del flux anterògrad coronari malgrat permeabilitat del vas epicàrdic), causat en part pel gran dany endotelial microvascular (juntament amb embolització distal, fenòmens trombòtics locals, efecte compressor del miocardi edematós...) ^{27–29}.

C. Resposta inflamatòria

En condicions patològiques es pot produir l'activació de cèl·lules inflamatòries, tant en el context del dany per isquèmia reperfusió ³⁰, com en la miocarditis (vírica, autoimmune o tòxica) ^{31–36} i el rebuig del cor trasplantat ³⁷. La inflamació comporta hiperèmia i increment de la permeabilitat vascular, tot afavorint l'edema miocardiàc. La Figura 3 representa gràficament l'augment de permeabilitat vascular i la infiltració tissular per cèl·lules inflamatòries.

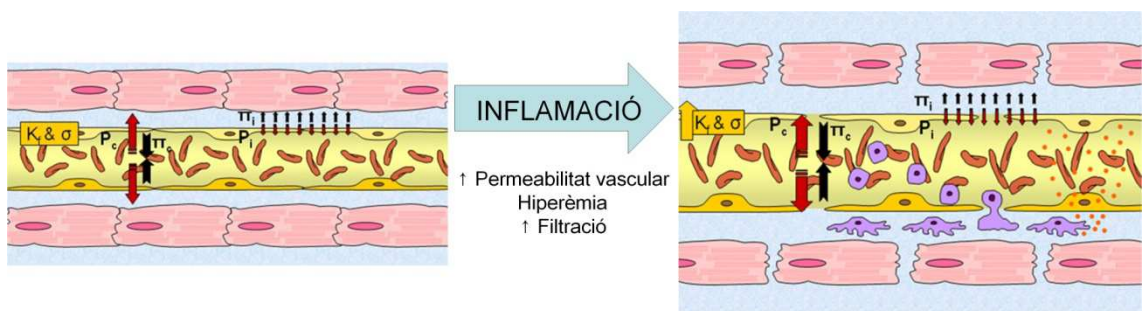


Figura 3. Pertorbació de l'equilibri hidrostàtic en cas d'inflamació: els mediadors químics alliberats durant la resposta inflamatòria aguda causen augment de la permeabilitat vascular (increment del coeficient K_f) alhora que la presència de detritus (restes cel·lulars) al medi intersticial incrementa el coeficient σ i la pressió oncòtica intersticial. L'augment de la filtració causa edema tissular.

D. Edema intracel·lular: Mecanismes osmòtics

Les membranes cel·lulars són semi-permeables, és a dir, que són permeables a unes substàncies que les travessen lliurement per difusió passiva i en canvi no permeten el pas a altres substàncies. Quan la concentració de compostos no permeables és diferent a banda i banda de la membrana semipermeable es genera pressió osmòtica que és proporcional a la diferència de concentració. La presència de transportadors específics a la membrana permet controlar la composició intracel·lular i l'equilibri osmòtic de la cèl·lula⁶. Tot i que el moviment de l'aigua és passiu, l'homeòstasi iònica és un procés d'elevat cost energètic ³⁸. La Figura 4 mostra els principals canals iònics i transportadors implicats en el manteniment de l'equilibri hídric cel·lular.

Durant la isquèmia es produeix un increment notable de catabòlits osmòticament actius degut al metabolisme anaerobi juntament amb la sobrecàrrega de sodi degut al mal funcionament de l'ATPasa Na/K que afavoreix l'edema intracel·lular dels cardiomiòcits ³⁹. En el context de l'infart, quan té lloc una oclusió completa del vas i, per tant, una interrupció completa del flux sanguini, les variacions en el contingut hídric del teixit isquèmic són mínimes (ja que no hi ha flux eficaç) i per tant el que hi ha són moviments de l'aigua entre compartiments (intravascular, intersticial i intracel·lular). Així mateix els canvis en la composició de la matèria són majoritàriament per la descomposició de les macromolècules, donant lloc a l'aparició de petits catabòlits (per exemple: descomposició del glicogen o desnaturalització de proteïnes) ⁴⁰.

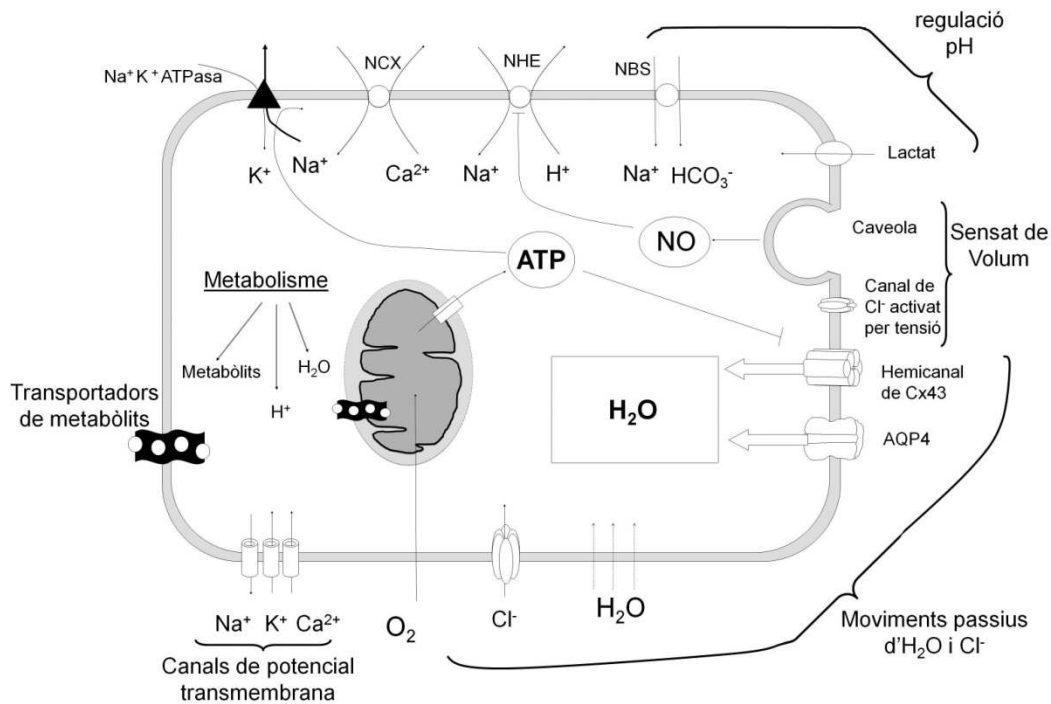


Fig 4. Components de la membrana plasmàtica i intracel·lulars involucrats en l'equilibri hídric cel·lular. Els canals iònics, juntament amb l'activitat metabòlica de la cèl·lula condicionen la pressió oncòtica intracel·lular. Les aquaporines i hemicanals estan implicats en la permeabilitat de la membrana plasmàtica a l'aigua. NCX: Intercanviador Na^+ i Ca^{2+} . NHE: intercanviador Na^+ - H^+ . NBS: Cotransportador Na^+ - HCO_3^- . Modificat de Garcia-Dorado et al ⁴¹.

Els cardiomiòcits mantenen un potencial de repòs transmembrana entorn de -80mV, gràcies fonamentalment al gradient de potassi. Aquest potencial transmembrana permet que la fase 0 del potencial d'acció sigui molt breu, degut a una entrada molt ràpida de Na^+ , mentre que la repolarització precoç és a expenses de la sortida de potassi a favor de gradient. Posteriorment l'ATPasa de Na/K permet recuperar la distribució basal dels ions, tot intercanviant el sodi intracel·lular pel potassi extracel·lular. L'acció de l'ATPasa Na/K permet també mantenir l'equilibri d'altres ions: és particularment important el del Ca^{2+} , que durant la sístole és alliberat des del reticle sarcoplàsmic [RS], però que durant la diàstole ha de ser ràpidament reincorporat al RS a través de la SERCA (bomba de calci del reticle sarcoendoplàsmic) o bé transportat a l'espai extracel·lular mitjançant l'intercanviador Na^+/Ca^+ . Això és així perquè el Ca^{2+} és el que permet l'acoblament excitació - contracció de les cèl·lules amb capacitat contràctil: el Ca^{2+} permet que la interacció entre l'actina i la miosina tingui lloc; és imprescindible per a què la contracció s'esdevingui i és indispensable també la seva absència perquè la contracció finalitzi i s'esdevingui la diàstole. Aquest cicle està representat a la Figura

5. Les situacions de dèficit energètic (com succeeix durant la isquèmia) ocasionen sobrecàrrega intracel·lular de Na^+ i, en conseqüència, edema intracel·lular ^{39,42}.

El Na^+ i el control del pH intracel·lular estan estretament relacionats. Els H^+ són transportats cap a l'espai extracel·lular gràcies a l'intercanviador Na^+/H^+ i eliminats gràcies a l'acció del cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$. És per això que, experimentalment, canvis sobtats en el pH ocasionen increments ràpids del volum cel·lular i *viceversa* i la correcció de l'acidosi intracel·lular provoca una sobrecàrrega de volum intracel·lular ⁴³. Tot i així, en condicions fisiològiques, els canvis en el volum cel·lular solen ser petits i transitoris, gràcies als mecanismes reguladors tan finament ajustats, que impliquen l'activitat de nombrosos canals i transportadors iònics, així com el metabolisme del glicogen i dels lípids de membrana ^{44,45}.

En general s'accepta que l'aigua es pot desplaçar a través de les membranes cel·lulars de forma passiva, a favor de gradient osmòtic, però els mecanismes moleculars implicats no es coneixen amb detall. Actualment s'està estudiant el paper que podrien tenir els canals transmembrana de la família de les aquaporines i els hemicanals de connexina⁴⁶, així com les superestructures caveolars ⁴⁷⁻⁴⁹ [Figura 6.B.].

Paper de l'edema miocàrdic en el dany per isquèmia – reperfusió. Estudi de la distribució de l'edema mitjançant ressonància magnètica

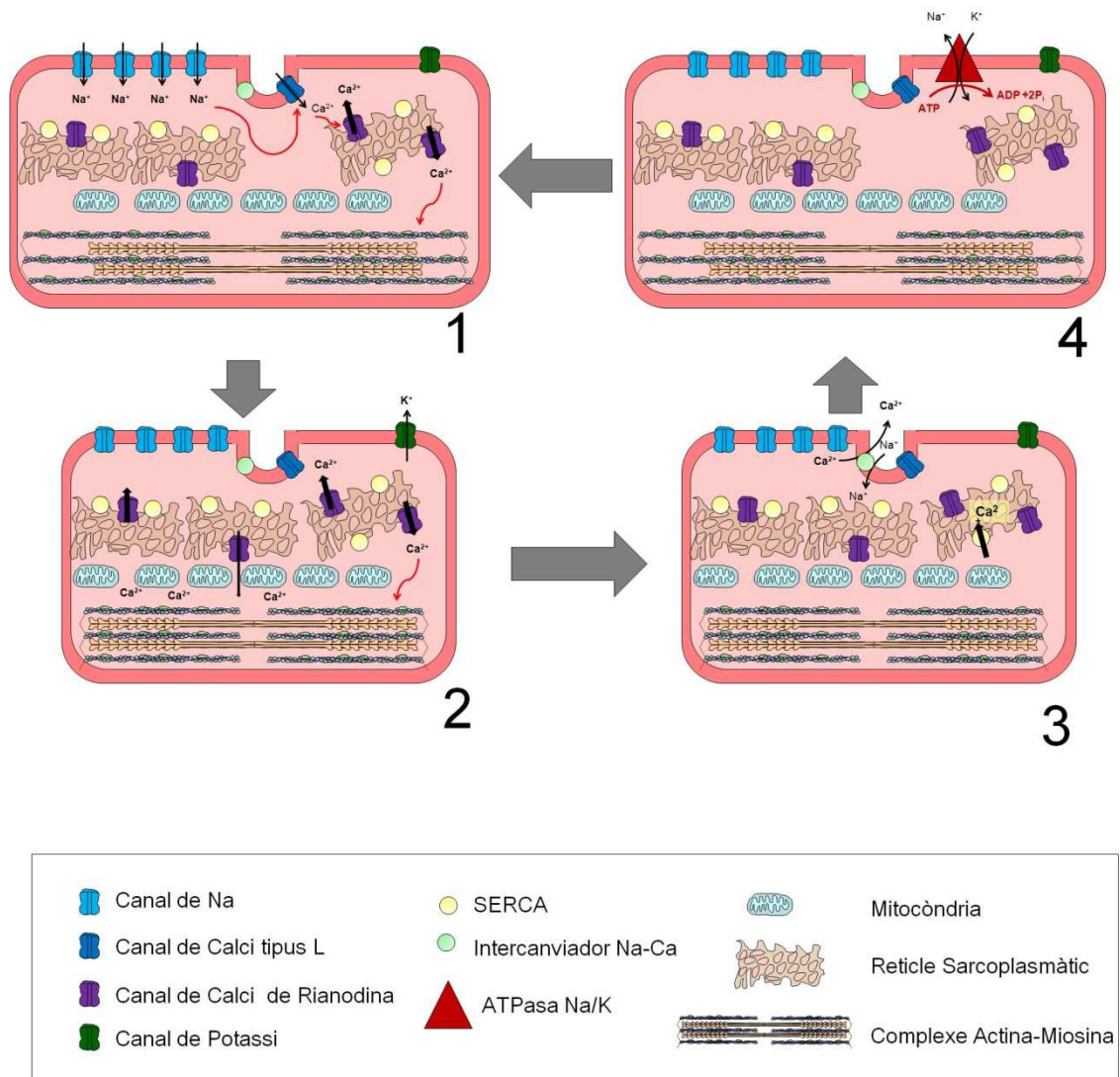


Fig 5. Cicle cardíac i corrents iònics: 1. A la fase 0 del potencial d'acció el Na^+ entra en gran quantitat a la cèl·lula causant la despolarització ràpida. Aquesta despolarització provoca l'obertura dels canals de Calci tipus L de manera que entra dins la cèl·lula una discreta quantitat de Calci. 2. L'entrada de Calci a través dels canals tipus L estimula l'obertura del canal de Rianodina i la sortida de gran quantitat de calci des del reticle sarcoplàsmic al citosol. El calci, en unir-se a la Troponina, permet la interacció entre l'actina i la miosina i es produeix la sistole mecànica. Durant la fase 2 del potencial d'acció es manté una $[\text{Ca}^{2+}]$ intracel·lular elevada mentre que el corrent de sortida de potassi és responsable de la repolarització. 3. A l'inici de la fase 4 del potencial d'acció el calci és reincorporat al reticle sarcoplàsmic a través de la SERCA o extret a l'espai extracel·lular a través de l'intercanviador de Na^+ i Ca^{2+} . 4. Més tardanament, l'acció de l'ATPasa Na/K permet recuperar les concentracions basals d'aquests ions, en extreure Na^+ al medi intracel·lular tot intercanviant-lo per K^+ , en contra de gradient, consumint ATP.

Les aquaporines [AQP] són una família de proteïnes transmembrana amb sis hèlix transmembrana que solen oligomeritzar en tetràmers tot formant porus altament permeables a l'aigua i soluts petits no iònics ⁵⁰ [Figura 6.A.]. Juguen un paper fonamental en el transport

d'aigua i la regulació osmòtica. Està molt ben establerta la seva funció al ronyó i la glàndula salival ^{51,52}. Els ratolins deficients en AQP-4 mostren graus menors d'edema i de necrosi cerebral a causa de la isquèmia ⁵³. Recentment s'han identificat també a la membrana plasmàtica del cardiomiòcit, però la seva funció en aquest òrgan no està ben establerta ⁵⁴. Se sap que el mRNA de l'AQP-4 està sobre produït i sobre expressat al sarcolema del cardiomiòcit després de la isquèmia miocardiàca ⁵⁵. S'ha descrit col·localització de AQP-1 i caveolina-3 als cardiomiòcits de rata i aquests complexos sembla que es relacionen amb el sensor de pressió osmòtica i la regulació de la permeabilitat a l'aigua ⁴⁸. Recentment també s'ha descrit que la deficiència d'AQP-1 en ratolins redueix l'edema, l'apoptosi i l'extensió de l'infart ⁴⁷. Aquestes dades suggereixen que les AQP podrien tenir un paper en el dany per isquèmia reperfusió a través de la regulació del volum cel·lular.

Les connexines [Fig 6.C.] són proteïnes amb quatre segments transmembrana que formen hemicanals per oligomerització de sis unitats. La connexió de dos hemicanals de cèl·lules adjacents forma un canal intercel·lular que participa en la comunicació cèl·lula - cèl·lula als vertebrats. Els hemicanals se solen concentrar en regions de la cèl·lula, anomenades *gap junctions*. Al marge de la seva funció de comunicació intercel·lular ben documentada, hi ha dades que suggereixen un paper dels hemicanals en la regulació del volum cel·lular ja que s'ha vist que l'obertura dels hemicanals provoca un augment del volum cel·lular que pot ser evitat si s'impedeix l'obertura de l'hemicanal ⁴⁶.

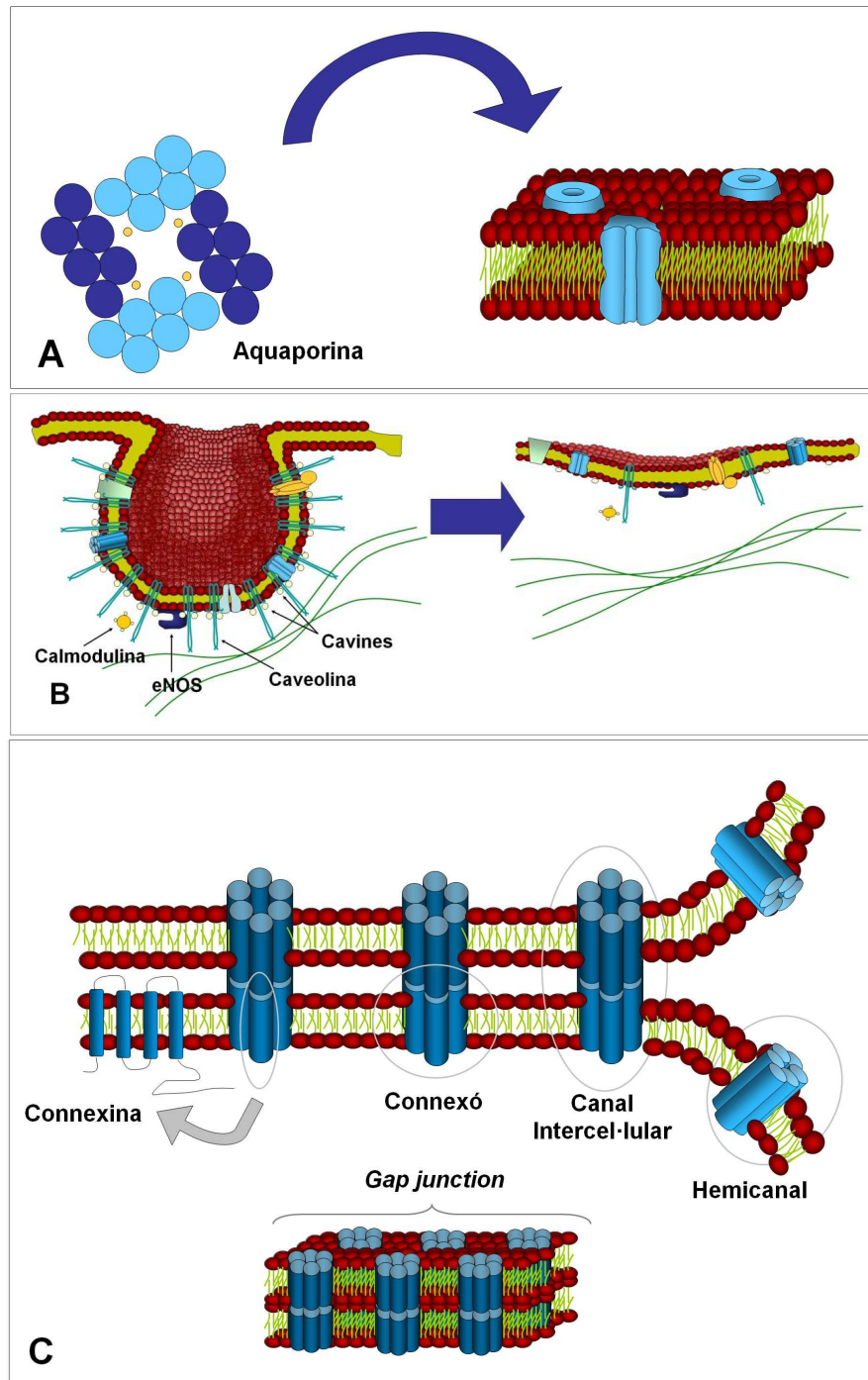


Fig 6. A: Els canals d'Aquaporina estan conformats per 4 unitats de proteïna de 6 dominis transmembrana.

Fig 6. B. Les caveoles són supraestructures de la membrana plasmàtica, dominis rics en proteïnes transductores de senyal i canals diversos, en estreta comunicació dins l'estructura caveolar. Són sensibles no només a missatgers químics sinó també a estímuls mecànics. Les caveoles també constitueixen una reserva de sarcolema que en cas de sobrecàrrega hídrica intracel·lular pot atenuar l'estrès mecànic sobre la membrana plasmàtica cel·lular.

Fig 6.C. Connexines en els seus diferents estats d'associació i confluència: la unió de 6 connexines conforma un canal anomenat connexó; l'aposiació longitudinal de dos connexons de cèl·lules veïnes conforma el canal intercel·lular,

mentre que el connexó en comunicació amb l'espai intersticial constitueix l'hemicanal. Les regions de sarcolema riques en canals intercel·lulars s'anomenen *gap junctions*.

1.1.2 Cardiopatia isquèmica i dany per isquèmia reperfusió

La isquèmia es defineix com l'estrès que pateixen les cèl·lules degut a la interrupció o disminució del reg sanguini i el consegüent dèficit d'oxigen (hipòxia) i nutrients. Si la isquèmia és prou intensa i prolongada, es pot produir la mort cel·lular per necrosi (infart). El restabliment de la circulació sanguínia al territori isquèmic s'anomena reperfusió. Si bé és imprescindible que hi hagi reperfusió per evitar o reduir la mort cel·lular, s'ha demostrat que els canvis sobtats que ocasiona la reperfusió poden contribuir a la mort de cèl·lules isquèmiques no irreversiblement danyades en el moment de la reperfusió⁵⁶⁻⁵⁸. La Figura 7 mostra gràficament l'evolució en el temps de l'extensió de l'infart i la contribució de la isquèmia i de la reperfusió a la necrosi. Es considera que el dany per reperfusió, en produir-se a partir del moment en què es recupera el flux, pot ser previngut amb intervencions realitzades amb anterioritat o durant el restabliment del flux coronari. La suma del dany ocasionat per la isquèmia i el dany ocasionat per la reperfusió s'anomena dany per "isquèmia - reperfusió"⁴⁰.

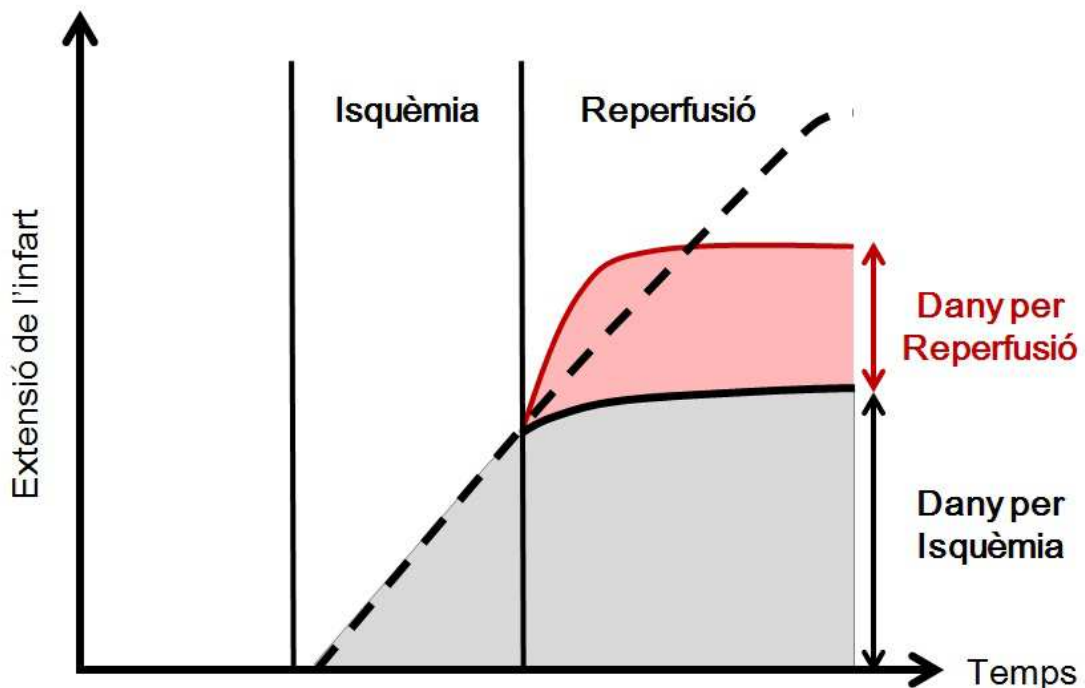


Figura 7. Evolució de la mort cel·lular en el temps. Com més dura la isquèmia, major és l'extensió de l'infart. Però en el moment de la reperfusió s'accelera la mort cel·lular degut als canvis sobtats de pH, osmolaritat i edema que tenen lloc en obrir l'artèria responsable de l'infart i restablir el flux coronari. En el tractament de l'infart els esforços terapèutics

Paper de l'edema miocardiàc en el dany per isquèmia – reperfusió. Estudi de la distribució de l'edema mitjançant ressonància magnètica

es concentren en dos punts: escurçar al màxim el temps d'isquèmia (reperfusió precoç) i aclarir els mecanismes implicats en el dany per reperfusió per poder-lo limitar. Modificat de Garcia-Dorado and Piper ⁵⁹.

En el cas concret de l'infart agut de miocardi, ocasionat per l'obstrucció d'una artèria coronària, el tractament inicial va dirigit a restablir la circulació coronària al més aviat possible per tal de reduir el temps d'isquèmia. Paral·lelament s'està fent recerca dirigida a identificar els mecanismes concrets del dany per reperfusió, considerat com a diana terapèutica, per tal de desenvolupar estratègies que permetin reduir l'extensió de l'infart ⁶⁰⁻⁶³.

El preconditionament isquèmic va ser descrit per Murry *et al* al 1986 ⁵⁸, consisteix en el fet que breus períodes d'isquèmia precedint un episodi més prolongat d'isquèmia amb reperfusió té un efecte protector, tot reduint l'extensió de l'infart. És degut a la inducció de mecanismes adaptatius que augmenten la tolerància a la isquèmia. Aquest concepte està força ben consolidat a la literatura científica però té l'inconvenient de tenir poca utilitat clínica, ja que els pacients amb infart agut de miocardi es presenten per rebre assistència mèdica quan l'infart ja està en curs i no abans que es produeixi l'oclusió coronària. Per tal de reduir l'extensió de l'infart en el moment de la reperfusió, una de les primeres estratègies que es van provar, suggerida pels mateixos autors, va ser aplicar aquest mateix concepte (breus períodes d'isquèmia) a l'inici de la reperfusió: és el que es coneix com post condicionament isquèmic ⁵⁹. Les estratègies dirigides a reduir del dany per reperfusió van molt més enllà del post condicionament, tot i que l'inclouen. Un restabliment sobtat del flux coronari pot tenir efectes deleteris per una normalització sobtada del pH, l'activació de proteases, la hipercontractura relacionada amb un excés de calci citoplasmàtic, l'obertura del por de transició mitocondrial i la presència de radicals lliures d'oxigen, entre d'altres ^{39,43,64,64,65,65-67}. Per això es considera que una reperfusió controlada (post condicionament isquèmic) o bé la modulació directa dels factors implicats en el dany per reperfusió poden ajudar a reduir el dany per reperfusió i, per tant, l'extensió de l'infart. En els darrers anys s'han fet estudis valorant l'efecte de controlar el pH durant la reperfusió ⁶⁴, reduir l'edema emprant medis hiperosmòtics ⁶⁸, limitar la hipercontractura amb monoxima 2,3-butanediona (BDM) o blebbistatina, inhibir les proteases ⁶⁹ o l'obertura del por de transició mitocondrial ⁷⁰, amb resultats favorables a nivell experimental però sense clar benefici clínic. La blebbistatina és un inhibidor selectiu de la unió actina miosina⁷¹ i s'ha observat que quan s'administra a l'inici de la reperfusió, impedeix la hipercontractura i redueix l'extensió de l'infart ⁷².

La Figura 8 representa els canvis estructurals al miocardi en el decurs de la isquèmia i reperfusió. L'aparició d'edema és un dels trets característics del miocardi sotmès a isquèmia-reperfusió. L'acumulació de substàncies osmòticament actives fruit del metabolisme anaerobi (glicòlisi, proteòlisi), la disrupció de l'equilibri iònic (caiguda del pH, sobrecàrrega de Na⁺, Cl⁻ i Ca²⁺) i la ruptura del sarcolema i els orgànuls intracel·lulars, juntament amb l'increment de la permeabilitat endotelial, afavoreixen l'edema durant la reperfusió del miocardi que ha patit isquèmia ⁷³.

L'endoteli és més resistent al dany per isquèmia reperfusió que els cardiomiòcits ²⁶, de manera que els fenòmens secundaris al dany endotelial, com l'aparició de transformació hemorràgica i obstrucció microvascular, es donen en els infarts més greus, amb temps d'isquèmia prolongats i necrosis extenses ⁷⁴. L'important edema miocardiàc que apareix en aquests casos afavoreix l'obstrucció microvascular que al seu torn contribueix a l'aparició del fenomen *no-reflow* (és a dir, el flux lent i la perfusió miocardiàca deficient malgrat el restabliment de la permeabilitat del vas epicàrdic) ^{29,75}. També als infarts de menor magnitud es produeixen canvis reversibles en la permeabilitat endotelial que afavoreixen l'edema: el factor de creixement endotelial vascular (VEGF) juga un paper en aquesta pèrdua d'integritat vascular mitjançant l'activació de la Src cinasa ⁷⁶. Probablement el VEGF contribueix a l'angiogènesi induïda per la isquèmia ⁷⁷, però a la fase aguda, la seva sobre expressió contribueix a causar edema miocardiàc amb efectes immediats potencialment deleteris.

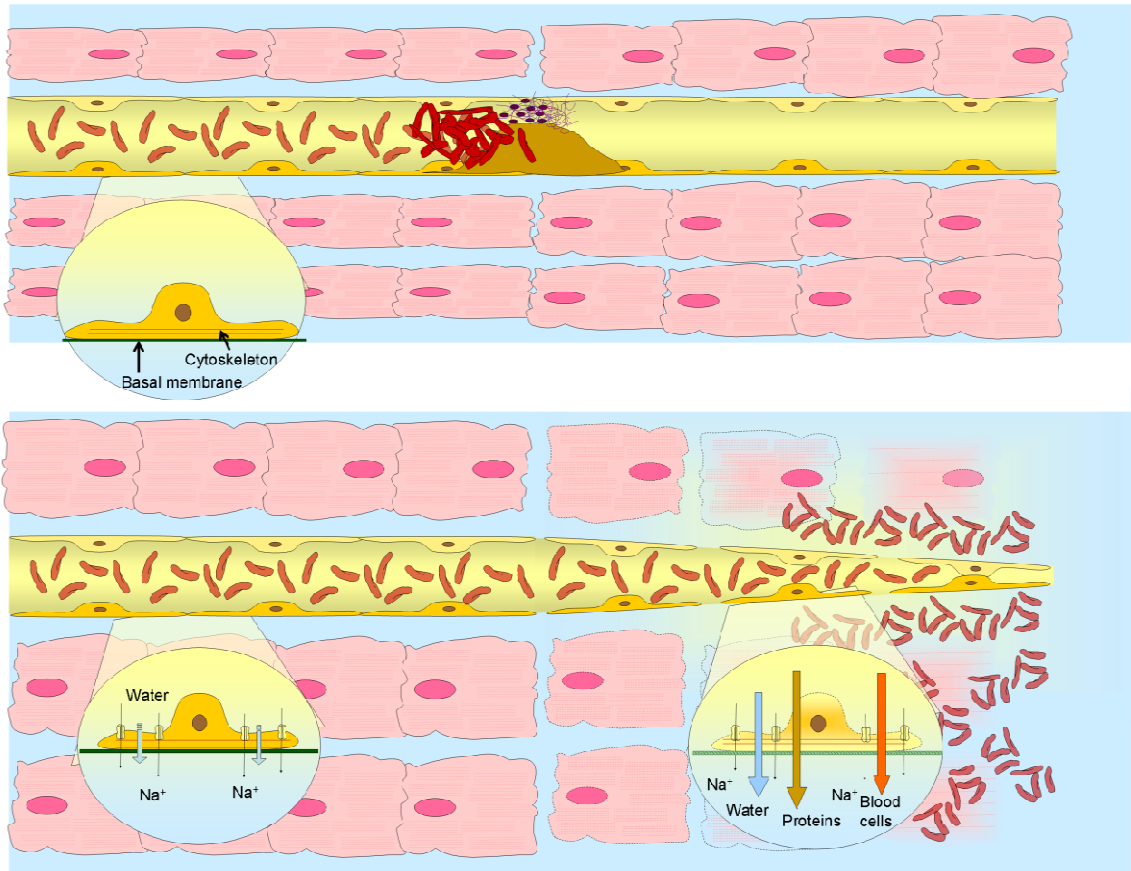


Figura 8. Evolució dels canvis en el contingut hídric del miocardi sotmès a isquèmia reperfusió: durant la isquèmia no es produeix un guany net d'aigua al teixit degut a la manca de flux sanguini al territori isquèmic; tot i així es pot produir un cert desplaçament d'aigua des de l'espai intersticial cap al citosol a favor de gradient osmòtic. És en el moment de la reperfusió en què es produeix un edema molt significatiu afavorit per la presència de substàncies osmòticament actives al citosol durant la isquèmia, de restes cel·lulars a l'interstici quan té lloc la ruptura del sarcolema i a la pèrdua d'integritat de l'endoteli, també danyat per la isquèmia reperfusió. En cas de dany molt acusat es pot produir el fenomen *no reflow* afavorit en part per embolització distal i obliteració extrínseca de petits vasos per l'edema i l'hemorràgia.

A la pràctica clínica hi ha diferents escenaris en què el cor pateix dany per isquèmia - reperfusió. El més comú és l'infart agut de miocardi, causat generalment per l'oclusió d'una artèria coronària per un mecanisme de trombosi sobre una placa d'ateroma inestable. Els cors sotmesos a cirurgia cardíaca amb circulació extracorpòria són sotmesos a una interrupció de la circulació coronària i també pateixen isquèmia i reperfusió ²¹; per minimitzar el dany s'administren solucions de cardioplexia per minimitzar els requeriments d'oxigen del cor durant la cirurgia ^{78,79}. El mateix succeeix en el cor trasplantat. En aquests escenaris es treballa per

reduir al màxim el temps d'isquèmia alhora que s'investiga la manera de controlar la reperfusió per minimitzar la mort cel·lular en restablir la circulació coronària.

A. Infart agut de miocardi

L'infart agut de miocardi es produeix a causa de la mort per necrosi dels cardiomiòcits per isquèmia prolongada, degut majoritàriament a l'oclusió sobtada d'una artèria coronària. Ja fa més de 20 anys, quan es començaven a realitzar estudis de ressonància magnètica cardíaca, es va demostrar que en els primers dies posteriors a l'infart, el miocardi en risc (zona de teixit miocardiàc que rep irrigació del vas distal al punt d'oclusió coronària) presenta important augment en el contingut d'aigua. Aquest miocardi edematós apareix a l'estudi de ressonància magnètica com una regió amb hiperintensitat de senyal en les imatges potenciades en T2⁷. D'aleshores ençà s'identifica les zones amb hiperintensitat de senyal en T2 com miocardi edematós i s'assumeix sovint que es correspon amb el miocardi en risc ^{73,80}. En aquests moments aquesta correlació està qüestionada i es motiu de controvèrsia a la literatura científica ^{81,82}. Paral·lelament s'estan posant a punt noves seqüències de ressonància magnètica que permeten obtenir nous paràmetres del miocardi i també s'està avaluant la cronologia dels canvis que pateix el miocardi en els primers dies post infart ^{83,84}. S'ha descrit un patró bimodal pel que fa a l'edema del miocardi després del dany per isquèmia reperfusió: a les primeres 24h apareix edema agut que es resol ràpidament i en un segon temps s'instaura de forma progressiva, arribant al màxim entorn el setè dia posterior a l'infart ⁸⁴. Les seqüències que permeten obtenir mapes de T1 porten informació sobre el volum extracel·lular del miocardi i permeten definir les àrees d'edema miocardiàc i fibrosi ⁸⁵⁻⁸⁷.

B. Discinèsia apical transitòria

La discinèsia apical transitòria o síndrome de Takotsubo es va descriure a la dècada del 1990, quan es va començar a realitzar coronariografies urgents als pacients amb infart agut de miocardi ^{88,89}. Aleshores es van descriure casos, inicialment al Japó, de pacients que clínicament es presentaven amb dolor toràcic anginos, electrocardiograma amb elevació del segment ST, suggestiu d'infart agut de miocardi i amb indicació de tractament de reperfusió. Contràriament al que sol passar amb l'infart amb elevació de l'ST la coronariografia mostrava absència de lesions coronàries que justificuessin el quadre i la ventriculografia mostrava extensa discinèsia apical ⁹⁰. Els pacients amb discinèsia apical transitòria solen cursar amb una lleu o moderada elevació de marcadors de necrosi miocardiàca⁷³. L'alteració de la motilitat és

reversible en unes poques setmanes i fora de la fase aguda (en què hi pot haver complicacions greus ⁹¹) el pronòstic és favorable. Encara es desconeix amb exactitud la fisiopatologia responsable d'aquesta situació clínica. S'especula el paper d'una descàrrega catecolaminèrgica ⁹², ja que el 25-75% dels casos es presenten després d'un estrès psicològic important ⁹³⁻⁹⁵.

Les imatges de ressonància magnètica a la fase aguda dels pacients amb discinèsia apical transitòria es caracteritzen per important augment del senyal potenciat en T2 a les regions discinètiques ⁹⁶, generalment en absència de necrosi, que s'atribueix a la presència d'important edema miocardiàc als segments discinètics ⁹⁷.

Discinèsia apical transitòria: casuística de l'Hospital Vall d'Hebron

Entre els anys 2011 i 2015, 49 pacients van ser diagnosticats de síndrome de discinèsia apical transitòria a l'Hospital Vall d'Hebron. S'ha realitzat estudi amb ressonància magnètica cardíaca a 32 d'aquests pacients (65%). Les característiques clíniques queden recollides a la Taula 1.

N	49	Discinèsia apical	85%
Edat promig	73 anys (17-90)	Discinèsia mitja	10%
Dones	78%	Discinèsia basal	5%
HTA	74%	FEVE inicial	44%
Dislipèmia	50%	FEVE recuperada	64%
Diabetis	30%	Estada promig	6 dies
Desencadenant psicològic/físic	75%	Mortalitat	5%
Killip I	56%	Recurrència	5%
Killip II	12%	CKMB pic	24,53
Killip III	17%	SAM	22%

Killip IV	15%	Gradient TSVE	18%
Intenció ICPP	61% (1-1,3%)	Trombus IV	5%

Taula 1. Característiques clíniques dels pacients amb Discinèsia apical transitòria

Un tret freqüent de la discinèsia apical transitòria és l'estrès psicològic com a factor desencadenant de l'episodi. A la nostra sèrie de pacients, es va descriure un desencadenant estressant en el 75% dels casos: en el 33% dels pacients aquest desencadenant era psicològic (patir un robatori, disc, discussió amb familiars o a la feina, malaltia o defunció de familiar, estrès per ingrés a l'hospital, estrès en context d'hiponatrèmia i afàsia, visita de l'assistent social per valoració dependència, pèrdua les claus del cotxe, incendi a la cuina). En un 42% dels casos es va descriure un estrès físic rellevant precedint l'episodi. En el 25% dels pacients no es va identificar cap desencadenant.

C. **Cirurgia cardíaca amb cardioplexia**

Les primeres intervencions quirúrgiques cardíques es realitzaven amb el cor bategant i, de fet, únicament es podien reparar defectes extracardíacs ⁹⁸. L'any 1953 John Gibbon va realitzar la primera cirurgia amb circulació extracorpòria i aturada cardíaca controlada amb l'ajut de solució cardioplèxica per reparar un defecte del septum interauricular ⁹⁹. El fet de poder treballar a cor obert gràcies a la circulació extracorpòria i amb el cor aturat gràcies a la cardioplexia va permetre realitzar intervencions intracavitàries sobre les vàlvules ¹⁰⁰ i els tabics cardíacs, el transplantament cardíac ^{101,102} i la cirurgia coronària ¹⁰³.

La majoria d'intervencions quirúrgiques cardíques que es fan avui en dia requereixen treballar amb el cor aturat i amb el suport de circulació extracorpòria. Durant un temps, el cor queda exclòs del circuit de circulació i no rep circulació coronària, de manera que pateix isquèmia. Per minimitzar el dany cardíac, s'administra per via intra coronària o a través del si coronari, una solució de cardioplexia, rica en potassi o pobra en calci per tal d'aturar el cor en diàstole, que redueix els requeriments metabòlics i limita el dany per isquèmia - reperfusió. En cas contrari es produiria infart o estaborniment reversible del miocardi que pot complicar el postoperatori immediat. A més, el cor aturat pateix una disminució del drenatge limfàtic (afavorit pel cicle sístole - diàstole) que pot contribuir a l'edema miocardiàc post cirurgia ²¹.

1.1.3 **Inflamació del miocardi**

En el context de les miocarditis i el rebuig del cor trasplantat l'edema apareix a conseqüència de la inflamació del teixit mediat per les cèl·lules implicades en la resposta del sistema immunitari i factors plasmàtics i tissulars. Tot plegat comporta hiperèmia i augment de la permeabilitat vascular (edema vasogènic)¹⁰⁴. La distribució de l'edema en el cas de la miocarditis s'ha establert mitjançant RM: típicament apareix un patró irregular amb zones d'edema distribuïdes de manera informe, indistintament al subendocardi, al miocardi o al subepicardi, a diferència de la isquèmia que típicament genera un front d'ona del subendocardi al subepicardi ⁸². La ressonància magnètica també permet identificar precoçment el rebuig de cor trasplantat, precisament identificant l'edema miocardiàc. En aquestes situacions clíniques però, les conseqüències a curt-mig-llarg termini de l'edema en sí no estan ben establertes ¹¹.

1.1.4 Augment de pressió a les cavitats cardíques

Hi ha dades experimentals en models canins que demostren que tant la hipertensió arterial sistèmica com l'augment de la pressió a les cavitats dretes ocasionen edema al miocardi del ventricle esquerre degut a la dificultat per al drenatge venós i limfàtic. L'edema intersticial crònic en aquest context s'ha associat a un augment de la fibrosi i la disfunció diastòlica ^{105,106}.

Un model força ben estudiat per Laine i col·laboradors és el de la sobrecàrrega de pressió: en un model de lligadura de l'artèria pulmonar (model crònic) o d'augment de la pressió al si coronari (model agut), s'aconsegueix generar edema miocardiàc al ventricle esquerre, fonamentalment intersticial, degut a l'augment de pressió post capil·lar microvascular ^{105,106}, tal i com es representa a la Figura 9.

El mateix grup va demostrar que la hipertensió arterial sistèmica induïx edema al ventricle esquerre mediat per un increment en la permeabilitat microvascular ¹⁰⁷.

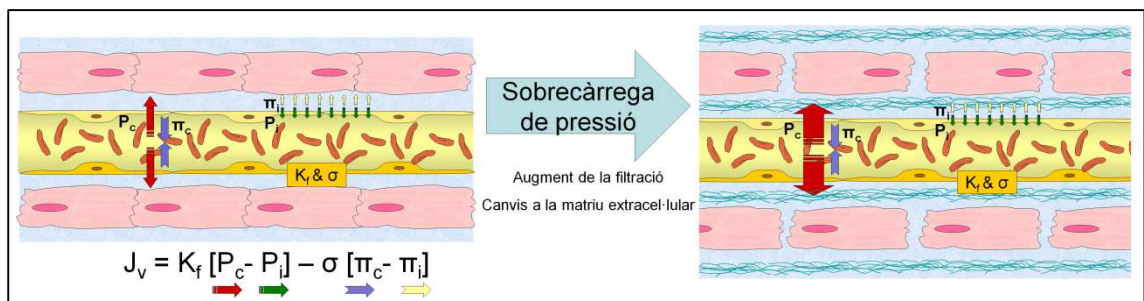


Figura 9. Efectes de la sobrecàrrega de pressió al si coronari: de forma retrògrada ocasiona un increment de la pressió hidrostàtica intracapil·lar que afavoreix el pas d'aigua cap a l'espai intersticial. L'edema intersticial crònic induïx canvis en l'expressió de les proteïnes de matriu extracel·lular (col·lagen).

1.2 Conseqüències i efectes de l'edema miocardiàc

En funció de la causa inicial i de la distribució de l'edema miocardiàc els efectes sobre la funció cardíaca varien. L'edema agut del miocardi pot afectar de forma immediata la funció sistòlica i diastòlica així com la circulació coronària (per compressió de capil·lars) ²⁶. Els efectes a llarg termini estan més relacionats amb el desenvolupament de fibrosi ¹⁰⁶, disfunció diastòlica i menor tolerància a la isquèmia¹⁰⁸.

1.2.1 Disfunció ventricular sistòlica

A la literatura hi ha dades discordants en relació al possible efecte deleteri de l'edema miocardiàc sobre la funció sistòlica ventricular en absència de dany miocardiàc. Davis et al demostraven en un model caní de lligadura d'artèria pulmonar una reducció de la funció sistòlica del ventricle esquerre associada a l'edema intersticial miocardiàc ¹². Diversos estudis demostren que l'edema intracel·lular en cardiomiòcit aïllat ocasiona disfunció contràctil ^{109,110}. En la pràctica clínica, la discinèsia apical transitòria, caracteritzada per la discinèsia reversible de segments intensament edematosos suggereix una possible relació entre edema miocardiàc i disfunció sistòlica ⁹⁶.

1.2.2 Fibrosi del miocardi i disfunció diastòlica

En el model agut de Laine i Desai et al ja mencionat, l'edema intersticial afavoreix la rigidesa del miocardi tot causant disfunció diastòlica i sistòlica ¹⁰⁵. A més, l'increment de la rigidesa persisteix en el temps malgrat la resolució de l'edema miocardiàc ¹¹¹. En el model crònic, l'edema intersticial sembla contribuir a iniciar els senyals que indueixen la formació de fibres de col·lagen, tot afavorint la fibrosi ¹⁰⁵; però en aquest model la composició de la matriu extracel·lular també es modifica, de manera que s'incrementa la proporció de fibres de col·lagen de tipus III en comparació al col·lagen tipus I, tot afavorint la compliància del ventricle enfront d'una sobrecàrrega aguda de pressió intersticial ¹⁰⁵. Aquestes dades posen de relleu que la relació de proporció entre col·lagen tipus I i tipus III condiciona el grau de rigidesa del miocardi. En funció del tipus de noxa s'afavoreix l'expressió d'un o altre tipus de col·lagen amb efectes diferents sobre la compliància del miocardi. La sobrecàrrega de pressió dels ventricles afavoriria l'expressió de col·lagen tipus I mentre que el model d'edema intersticial crònic descrit afavoreix la producció de col·lagen tipus III.

1.2.3 Obstrucció microvascular i manca de flux amb artèria epicàrdica permeable en la reperfusió

L'edema miocàrdiac que apareix durant la reperfusió immediata a una isquèmia coronària pot contribuir (juntament amb fenòmens d'embolització distal, activació plaquetària, hemorràgia i altres) al fracàs en el restabliment de flux coronari efectiu malgrat l'obertura del vas epicàrdic responsable de l'infart per compressió mecànica extrínseca dels capil·lars ²⁸.

1.3 Mesura i determinació de la distribució de l'edema miocàrdiac

1.3.1 Quantificació del contingut d'aigua al miocardi

Per estudiar l'edema convé poder mesurar tant el contingut d'aigua d'una mostra o teixit com la seva distribució dins d'aquest. Fins l'actualitat s'han desenvolupat estratègies per quantificar el contingut d'aigua total basades en la dessecació amb calor o en la mesura de la densitat (gravimetria). Ambdues, però, impliquen la destrucció de la mostra en el procés de mesura.

A. Tècniques basades en la diferència entre pes fresc i pes sec

- Deshidratació amb calor: És el mètode més senzill per calcular el contingut d'aigua de les mostres d'òrgan o teixit. Consisteix a pesar la mostra fresca, sotmetre-la a 100°C de temperatura durant 24h i pesar la mostra seca. La diferència entre les dues pesades és el contingut d'aigua de la mostra.
- Liofilització: La liofilització és un procés de dessecació àmpliament utilitzat en el món de la indústria farmacèutica i de l'alimentació. Permet eliminar > 99.9% del contingut d'aigua. Per tant, es pot aplicar també a la dessecació de mostres biològiques d'òrgan o teixit. Té l'avantatge sobre la dessecació amb calor el fet de no deteriorar la mostra i permetre anàlisis ulteriors de certs components. Consisteix en la sublimació a baixa pressió d'una mostra congelada.

B. Mètodes basats en la densitat: gravimetria

La gravimetria s'empra fonamentalment en estudis de sistema nerviós central ¹¹²⁻¹¹⁴. Consisteix en fer una escala de densitats en una proveta, amb mescles de dissolvents orgànics ¹¹⁵ o amb Percoll enriquit amb NaCl [Figura 10]. La variació en la densitat del teixit depèn del contingut d'aigua de la mateixa ja que la composició tissular sòlida no es modifica en experiments a curt termini. Per poder calcular el contingut d'aigua, aquest mètode requereix assumir algunes dades calculades indirectament com és la densitat del teixit sec i també s'ha d'assumir que el contingut sec del teixit no es modifica en els diferents experiments ni al llarg de l'experiment (tindria limitacions si es volgués fer estudis a llarg termini que permetessin l'aparició d'hipertròfia o fibrosi). Per fer l'anàlisi per microgravimetria cal mostres de petites (3-8mm³) de manera que es pot fer múltiples mesures per cada individu i guardar mostra per altres anàlisis complementàries.

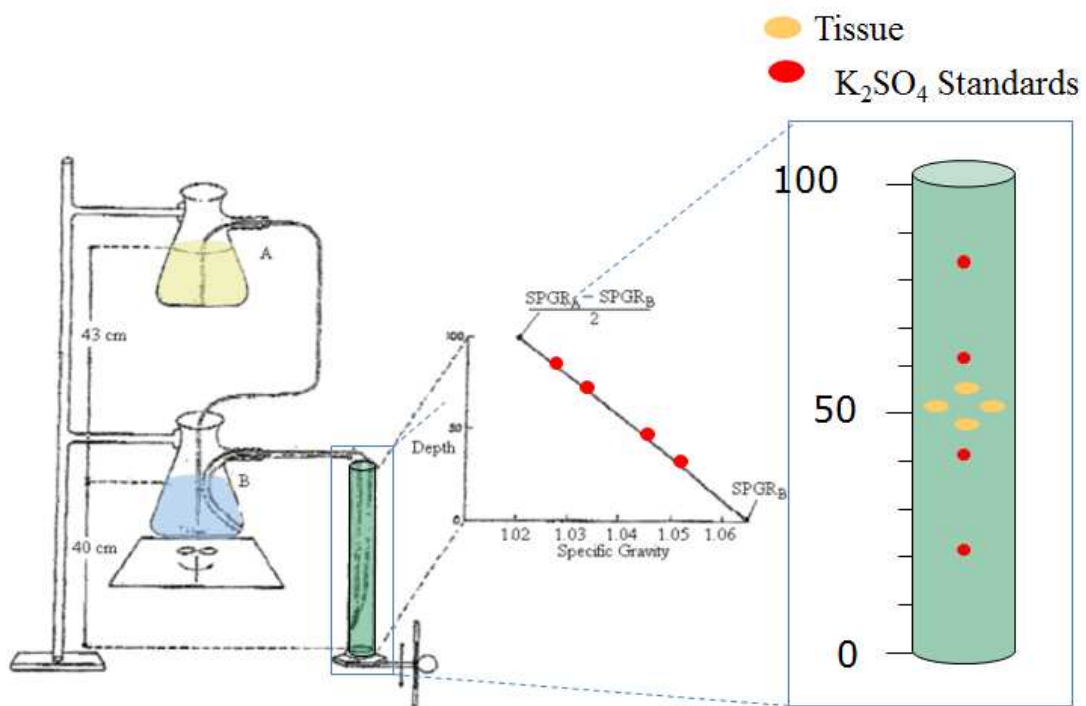


Figura 10. Esquema de la tècnica de gravimetria: preparació de la columna de densitats amb dos dissolvents orgànics de diferent densitat: es van mesclant els dissolvents en diferents proporcions, començant pel de major densitat de forma pura i modificant la mescla tot incrementant de forma progressiva la proporció del dissolvent de menor densitat i reduint la proporció del dissolvent de major densitat: d'aquesta manera s'obté una columna de densitats. La calibració de la columna es realitza amb partícules de sulfat de potassi de densitat coneguda. Un cop està calibrada la columna es deixen caure les mostres de teixit i s'estableix la seva densitat (i per tant, el contingut d'aigua) en funció de l'alçada de la columna on s'estabilitzen. Cessió de Dra. Laia Chavarria.

1.3.2 Determinació de la distribució de l'aigua al miocardi

La distribució anormal d'aigua en un teixit o organisme també pot causar disfunció, encara que no hi hagi variacions en el contingut total de l'aigua. Per tant també és important mesurar la distribució de l'edema.

A. **Compartiments: intracel·lular i extracel·lular (intersticial i intra vascular)**

Des del punt de vista dels fluids, als òrgans es pot diferenciar dos compartiments: l'espai intracel·lular, és a dir, el contingut a l'interior de les membranes plasmàtiques i l'espai extracel·lular (és a dir, la resta), també conegut com medi intern. Aquest darrer està integrat pel plasma (contingut a l'espai intra vascular: interior d'artèries, capil·lars, venes i cambres cardíques), la limfa, l'espai intersticial que ocupa el volum intercel·lular i entre la paret dels vasos i les cèl·lules. A nivell d'organisme també hi ha els tercers espais, diferents del medi intracel·lular i del medi intern, com el líquid sinovial, el líquid cefaloraquidi, l'humor aquós i, de forma patològica, els vessaments pleural, pericardiàc o abdominal (ascites) ¹¹⁶.

- **Marcadors d'espai intra vascular:** Els marcadors d'espai intra vascular han de complir el requisit de no distribuir-se fora d'aquest espai. Per tant, han de ser partícules que es puguin detectar i quantificar d'una grandària suficient com per no poder difondre o filtrar-se a l'espai intersticial. S'han utilitzat eritròcits o albúmina, marcats, tradicionalment amb isòtops radioactius ¹¹⁷.
- **Marcadors d'espai extracel·lular:** Han de complir el requisit de difondre per l'espai intersticial i no travessar les membranes plasmàtiques. Per ser útils com a marcadors, a més, han de tenir una bona cinètica de distribució (que assoleixin l'estat d'equilibri ràpidament) ¹¹⁸. Els més emprats en estudis clàssics han estat inulina, manitol o sorbitol, marcats amb isòtops radioactius ¹¹⁹⁻¹²⁴. També s'han emprat marcadors quantificables mitjançant espectroscopia basada en ressonància magnètica nuclear, con el ³¹P-fenilfosfonat ^{121,125}.

B. **Mètodes per quantificar els compartiments**

- **Mètodes basats en radionúclids:** Els radionúclids són isòtops radioactius. Tenen la propietat d'emetre radiació ionitzant que es pot estudiar amb detectors de radiació (α , β , γ). El radionúclid es pot administrar de forma pura (com per exemple el Tal·li 201),

però generalment, s'uneixen a molècules sintètiques, proteïnes o cèl·lules, tot obtenint radio fàrmacs o cèl·lules marcades. D'aquesta manera es pot obtenir marcadors isotòpics d'espais biològics: per exemple: hematies marcats (^{51}Cr), albúmina marcada (^{131}I) o qualsevol molècula amb les propietats farmacocinètiques desitjades marcada amb un radionúclid ^{123,126}.

- **Mètodes basats en ressonància magnètica:** Tot i que de bon principi es va valorar la utilitat de diferents nuclis amb propietats magnètiques (gadolini, crom, ferro¹²⁷) com a medis de contrast als estudis d'imatge per ressonància magnètica, el més emprat a la clínica és el gadolini [Gd], generalment unit a macro complexos en forma de quelat)^{128,129}. En funció de la composició dels macro complexos, varia la seva cinètica de distribució, tot obtenint contrastos de medi intra vascular ¹³⁰ o contrastos d'espai intersticial ¹³¹.

El Gd és un agent T1 àmpliament emprat en clínica: escurça el temps de relaxació longitudinal T1, cosa que permet detectar-lo en imatges de ressonància magnètica potenciades en T1: el teixit ric en gadolini apareix com una zona hiper intensa (augment del senyal). En la pràctica clínica, la seva cinètica de distribució permet per una banda fer estudis de perfusió (distribució de primer pas) i per altra banda, detectar dany tissular (per tumors o fibrosi), ja que penetra més als teixits amb disrupció vascular i queda retingut en cas de fibrosi. Altres nuclis amb propietats magnètiques com el Ferro, són potenciadors de T2¹³².

En estudis *in vitro* es pot quantificar el gadolini present en un teixit de manera absoluta. En estudis *in vivo* es pot semi quantificar amb imatges de ressonància magnètica potenciades en T1 ¹²⁹. Com a marcador de compartiments hídrics es pot emprar tant com a marcador d'espai intra vascular (Gd unit a albúmina ¹³³, quelats dendrífics de gadolini ^{128,130}) o com a marcador d'espai intersticial (els quelats de Gadolini amb macro complexos). De fet, en clínica, s'empra la cinètica de primer pas del gadolini per estudiar l'espai intersticial. Concretament, als estudis de ressonància magnètica cardíaca, aquesta seqüència permet valorar la perfusió del miocardi ¹³⁴.

També s'han emprat com a marcadors d'espai intra vascular agents de contrast basats en partícules súper paramagnètiques d'òxid de ferro (SPIO) ¹²⁷.

El gadolini unit a macrocomplexos en forma de quelat presenta una farmacocinètica adient per al seu ús com marcador d'espai extracel·lular. No travessa les membranes plasmàtiques íntegres, de manera que no accedeix a l'espai

intracel·lular, mentre que la seva distribució per l'espai intersticial és ràpida des de l'espai intravascular. El gadolini present en una mostra es pot quantificar mitjançant ressonància magnètica tot mesurant T1 ¹³⁵.

- **Morfometria:** Els estudis de microscòpia òptica i electrònica de mostres de teixit també s'empren per valorar el grau d'edema del miocardi ^{136,137}. Aquesta aproximació té l'inconvenient que en el procés de fixació de la mostra es produeix deshidratació i substitució de l'espai hídric per substàncies lipòfiles o bé un procés de congelació. Ambdós tipus de manipulació de la mostra poden distorsionar l'aparença o el volum de l'espai interposat entre estructures sòlides del teixit. A més, variacions locals de l'osmolaritat durant la fixació poden modificar aquests espais en el procés de preparació de la mostra. Per tant, si bé l'anàlisi histològica té el seu paper en la valoració de l'edema miocardiàc, pot generar distorsions que cal tenir en compte.

1.3.3 Mesura de la distribució de l'aigua en cor aïllat d'animal petit sotmès a perfusió salina

El model de cor aïllat sotmès a perfusió salina, descrit per Oskar Langendorff a finals del S. XIX ¹³⁸ encara avui en dia molt emprat en estudis de fisiologia i farmacologia cardíques, s'aplica en mamífers petits (p.ex. rata, ratolí, cobai, conill). S'extreu el cor de l'animal convenientment sedat i es canula a través de l'aorta al sistema de perfusió. Els tampons de perfusió es basen en una solució salina oxigenada que generalment conté glucosa, Na, K, Cl, Ca, Mg, a un pH controlat. Aquest mètode permet mantenir el cor viable i mecànicament actiu gràcies a l'automatisme cardíac. Donat que els cors es perfonen amb un tampó lliure de cèl·lules sanguínies i proteïnes, és a dir, amb menor força oncòtica, es causa edema extracel·lular ¹³⁹. Tot i així, aquest model també s'ha emprat per estudiar la distribució de l'aigua als cors aïllats, fonamentalment emprant marcadors d'espai extracel·lular (amb isòtops radioactius o amb espècies paramagnètiques)¹³⁹. El contingut d'aigua total es determina en la majoria d'experiments publicats per dessecació amb calor. El procés de dessecació suposa malmetre la mostra, de manera que cal fragmentar la mostra i destinar una porció a la mesura del contingut d'aigua total i una altre porció per quantificar el marcador d'espai extracel·lular.

A. Mesura de la distribució de l'aigua *in vivo* en models animals

De manera anàloga als experiments amb cor aïllat de d'animal petit sotmès a perfusió salina, en els models *in vivo*, s'administra el marcador per via venosa i es fa l'extracció del cor un cop s'assoleix l'estat d'equilibri. En els models *in vivo* es pot determinar no només l'espai extracel·lular sinó també l'espai intravascular (amb marcadors d'eritròcits o de plasma).

B. Aproximació clínica de la mesura de la distribució de l'aigua del miocardi

Avui en dia no hi ha una tècnica amb aplicació clínica rutinària que permeti establir la distribució de l'aigua al miocardi de forma no invasiva. Tot i així, la ressonància magnètica cardíaca permet obtenir informació indirecta sobre el contingut d'aigua del miocardi. Les seqüències potenciades en T2 permeten destacar les regions amb major contingut hídric (edema miocardiàc) ⁷ i els estudis de mapes de T1 permeten valorar l'espai extracel·lular ¹³¹. És d'esperar que en un futur pròxim, un perfeccionament d'aquestes seqüències o el desenvolupament de noves seqüències permetin precisar la distribució de l'aigua al miocardi més acuradament.

1.4 Fonaments de l'adquisició d'imatges mitjançant ressonància magnètica

1.4.1 El fenomen de la ressonància magnètica nuclear aplicat a l'adquisició d'imatges

Alguns nuclis atòmics tenen propietats magnètiques, com ara l'spin. Entre ells destaquem el ¹H, ¹³C i el ³¹P per la seva rellevància en estudis biomèdics.

L' **spin** és el **moment angular intrínsec de cada nucli magnètic (I)**: és un vector que, en condicions basals pot adoptar qualsevol orientació (totes d'energia igual). En un conjunt d'àtoms el moment magnètic global serà zero perquè els vectors s'anul·len entre ells.

En canvi, quan un nucli magnètic se sotmet a un camp magnètic, el nombre d'orientacions permeses del moment magnètic queda molt restringit (si $I = \frac{1}{2}$, les possibles orientacions són 2, ja que el nombre d'orientacions permeses és $= 2I + 1$). A més, cadascuna de les orientacions possibles té un nivell energètic diferent, de manera que, preferentment, els nuclis s'orienten en la posició de menor energia [Figura 11].

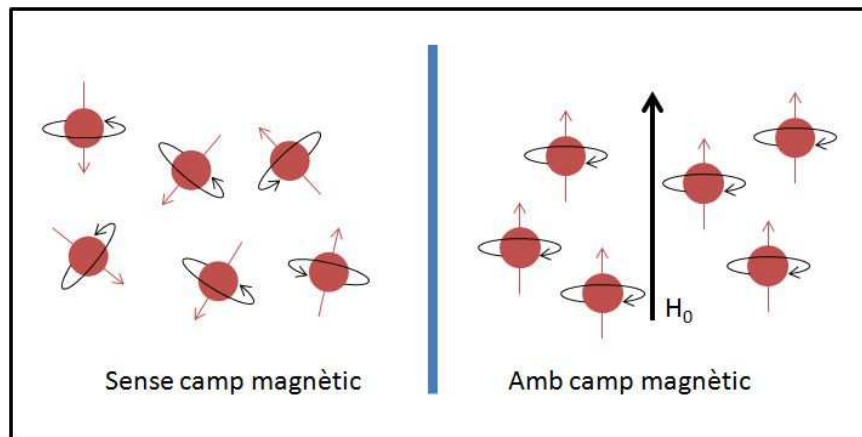


Figura 11. Comportament dels spins nuclears: en absència de camp magnètic estan aleatòriament orientats. En presència de camp magnètic (H_0) els spins prenen l'alineació de menor energia d'acord amb la orientació del camp magnètic.

Aquests dos estats estan separats per un nivell d'energia (ΔE) que depèn de la força d'interacció entre el nucli i el camp magnètic, és a dir, entre la força del camp magnètic (B_0) i la magnitud del moment nuclear magnètic [Figura 12].

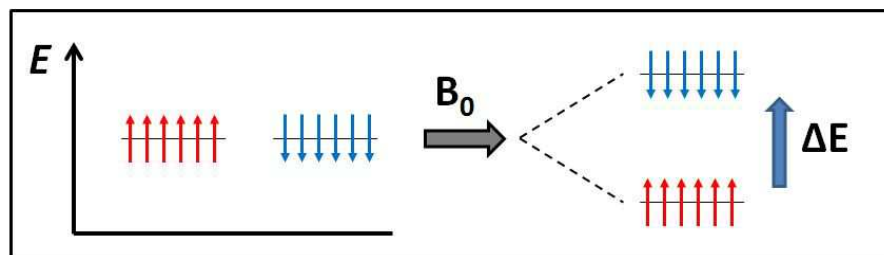


Figura 12. Sense camp magnètic tots els estats d'spin tenen la mateixa energia (E). En sotmetre els nuclis a un camp magnètic (B_0) els diferents estats tenen nivells energètics diferents.

El moment nuclear magnètic (μ) depèn de la magnitud del moment angular de l'spin (és a dir, del número quàntic) i de la raó giromagnètica (γ) que és específica de cada nucli. Per tant, el moment magnètic és diferent per cada espècie nuclear.

Respecte les ones electromagnètiques, cal recordar la relació entre longitud d'ona (o el seu invers, la freqüència) i l'energia (constant de Planck):

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \lambda^{-1}$$

Les ones electromagnètiques es caracteritzen per la longitud d'ona [λ] (o la seva inversa, la freqüència). En el cas que ens ocupa: la freqüència de les ones electromagnètiques

necessàries per fer passar un nucli magnètic d'un moment magnètic a un altre de superior són de l'ordre de les ones de radiofreqüència (λ de l'ordre de $0.1-10^3$ m) [Figura 13].

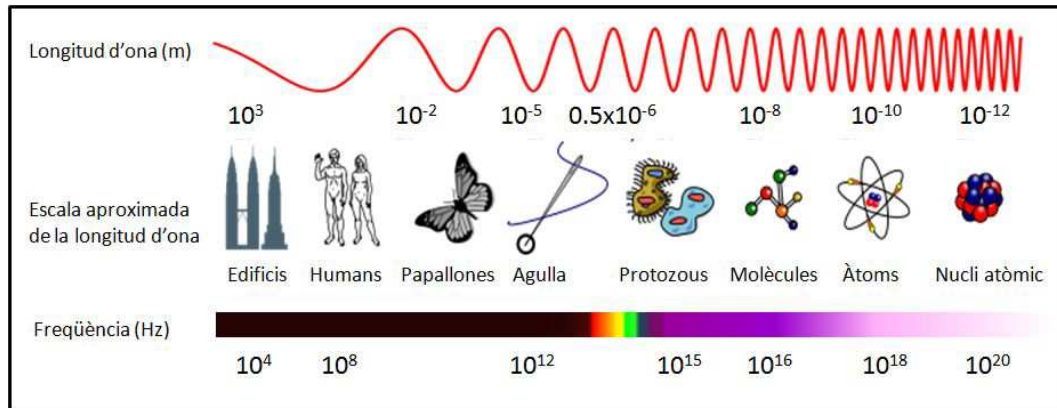


Figura 13. Ones electromagnètiques. L'espectre visible suposa únicament les ones electromagnètiques amb λ compreses entre 400-750nm. Les ones de major longitud constitueixen l'infraroig (inclou les microones i les ones de ràdio) i les de menor longitud, l'ultraviolat (inclouent els raigs X i els raigs gamma)

Cal remarcar que la freqüència (ν) no només depèn de la naturalesa del nucli (donada per la raó giromagnètica) sinó també de la intensitat del camp magnètic. És a dir que ν no és específica d'un nucli sinó directament proporcional a la intensitat del camp magnètic [Figura 14].

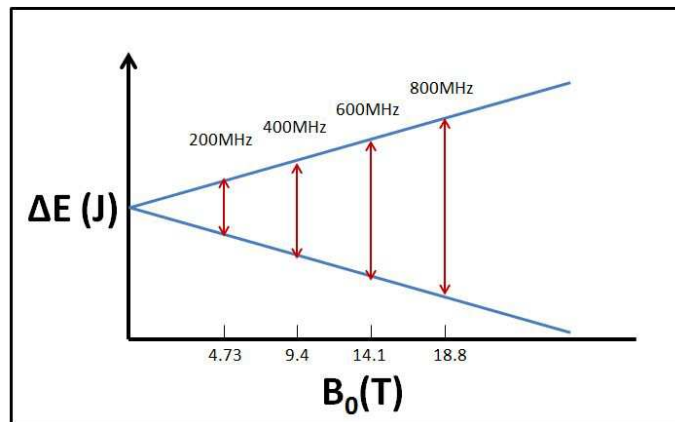


Figura 14. Com major és la intensitat del camp magnètic [B_0], major és la diferència d'energia entre els estats de l'spin: és a dir, l'ona electromagnètica que s'emet amb el canvi d'estat de major a menor energia serà de major freqüència.

Els ΔE entre les transicions dels diferents estats magnètics quan el camp magnètic és de 9.4T són de l'ordre de l'energia de les ones de radio: en el cas de ^1H , aproximadament 400MHz (λ 75cm).

Quan els nuclis magnètics se sotmeten a un camp magnètic es distribueixen entre els possibles nivells d'energia (en el cas de ^1H , dos possibles nivells: $+1/2$, $-1/2$) segons la

distribució de Boltzmann. Com que la diferència entre ambdós nivells d'energia és molt petita, la temperatura ambient (300K) fa que els nuclis es distribueixin quasi per igual entre ambdós nivells (només presenten una molt discreta tendència a que una petita proporció major estigui en l'estat de menor energia, al voltant d'una raó A/B ~1.000003).

És per això que per tal de poder estudiar les molècules per RMN cal emprar camps magnètics d'elevada intensitat i mirar nuclis abundants i amb raons giromagnètiques grans (com és el cas de ^1H , tan abundant als éssers vius, compostos fonamentalment per aigua (H_2O)).

Les propietats magnètiques del ^1H s'aprofiten per obtenir imatges o bé per identificar estructures moleculars. Això s'aconsegueix tot sotmeten les mostres a un camp magnètic i a polsos d'ones electromagnètiques d'una freqüència i intensitat controlades. Dins el camp magnètic el vector de magnetització resultant es col·loca en l'orientació de mínima energia; aquest vector de magnetització es pertorba amb ones de radiofreqüència i, un cop deixen d'aplicar-se, els spins nuclears tornen a l'estat d'equilibri en el procés de relaxació. L'energia alliberada en forma de radiofreqüència durant la relaxació es detecta i és el que permet obtenir informació estructural i morfològica de la mostra que s'estudia. Durant el procés de relaxació el vector de magnetització va variant d'intensitat. L'espectroscòpia permet identificar estructures moleculars basant-se en l'emissió d'ones electromagnètiques en el procés de relaxació dels spins: en funció de l'entorn químic immediat, els nuclis d'un mateix element (^1H) presenten nivells d'energia discretament diferents tot generant un espectre de pics al llarg d'un interval de freqüències específic de cada nucli; la freqüència de cada pic (normalitzada segons la intensitat del camp magnètic i expressada en ppm) és específica de grups químics concrets i permet identificar molècules. Per altra banda, l'àrea sota la corba del pic és proporcional a la concentració de nuclis presents a la mostra.

Per a l'adquisició d'imatges, es codifica espacialment cada punt de la mostra gràcies a la presència de gradients de camp magnètic. Les imatges de RMN permeten obtenir gran contrast entre diferents teixits ja que els spins dels hidrògens de l'aigua relaxen amb característiques diferents depenent de les propietats físico-químiques específiques de l'entorn. Els mecanismes de relaxació són principalment dos: relaxació spin - entorn (T_1 , vector de relaxació longitudinal) i relaxació spin - spin (T_2 , vector de relaxació transversal). En el procés de relaxació de l'spin, el vector longitudinal (T_1) retorna al seu màxim basal mentre que el vector transversal va perdent intensitat fins arribar a zero; ambdós processos s'ajusten a una

funció exponencial en què la variable que defineix el comportament magnètic de cada protó és el temps (T_1 i T_2) [Figura 15]. La utilitat de la ressonància magnètica en biomedicina se centra en l'espectroscòpia per a identificar molècules o l'adquisició d'imatges en estudis de radiodiagnòstic.

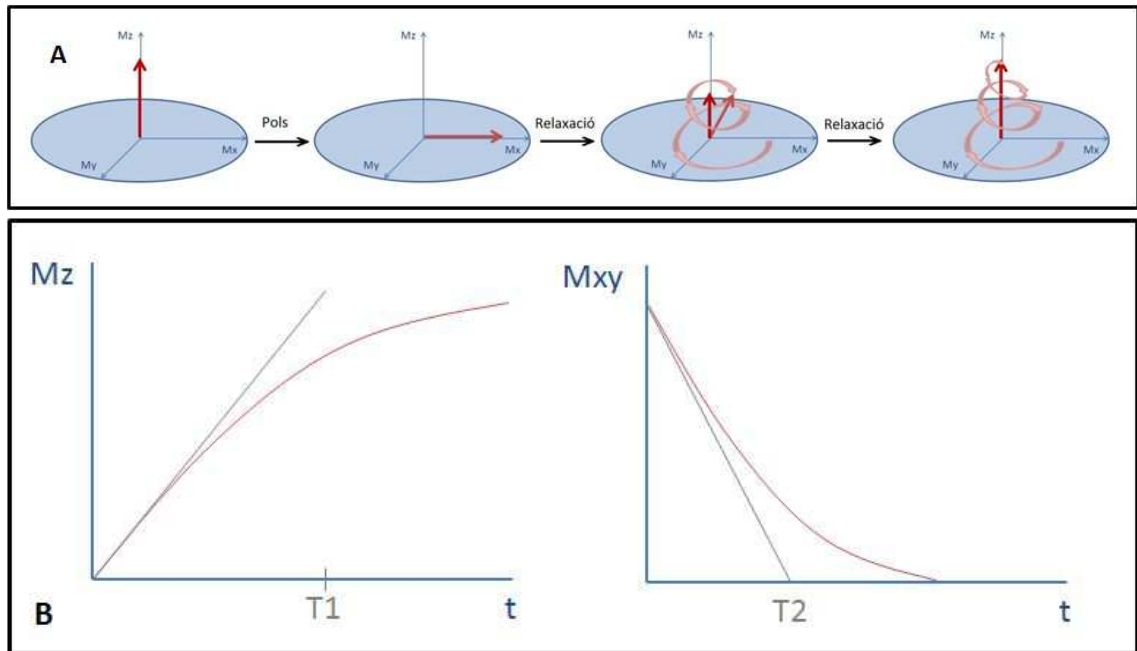


Figura 15. A. Procés de relaxació de l'spin: després de ser excitat amb un pols de radiofreqüència, l'spin torna al seu estat de menor energia mitjançant el procés de relaxació; la relaxació transversal (Pla XY) comporta una pèrdua de senyal al llarg del temps i es quantifica com T_2 ; la relaxació longitudinal es produeix en l'eix Z i es quantifica com T_1 .
 Figura 15.B. Ambdós processos de relaxació s'ajusten a una corba exponencial.

1.4.2 Els macro complexos de gadolini com agents de contrast en els estudis de ressonància magnètica

Per tal d'optimitzar les característiques de les imatges de RM, s'empren agents de contrast (habitualment compostos rics en gadolini i, en menor mesura, de ferro). Els agents de contrast estan basats en la presència de nuclis amb moments magnètics elevats que alteren el camp magnètic proper tot escurçant els temps de relaxació. Els elements amb moments magnètics elevats amb potencial utilitat són els metalls de transició i les terres rares: manganès, ferro, cobalt, níquel, coure, crom i gadolini. De tots ells, el més emprat actualment és el gadolini, que presenta un perfil de seguretat superior i es pot formular de múltiples maneres per tal de contrastar diferents espais. Els macrocomplexos de gadolini són quelats amb DTPA (àcid dietilèntriaminpentacètic) o DOTA (àcid tetraazaciclododecatetracètic) i són agents de contrastos

d'espais extracel·lulars ¹⁴⁰ generalment emprats per valorar tant estructures vasculars com la perfusió dels òrgans i teixits. La retenció tardana de gadolini en un teixit necròtic permet identificar-lo en imatges adquirides tardanament després de la injecció de l'agent de contrast.

1.4.3 Ressonància magnètica cardíaca

L'estudi del cor mitjançant ressonància magnètica té una complexitat afegida si es compara amb estudis d'altres òrgans sòlids, de sistema nerviós central o sistema musculoesquelètic. El fet que el cor estigui en continu moviment degut al cicle cardíac, juntament amb el moviment respiratori de la caixa toràcica, l'elevat contingut en ferro de la sang intracavitària i l'entorn aeri dels pulmons dificulten l'adquisició dels estudis cardíacs. Per aquest motiu el desenvolupament i la implementació de la ressonància magnètica cardíaca ha estat més tardana que en altres camps mèdics. Les millores tecnològiques han permès poder sincronitzar l'adquisició d'imatges (*gating*) amb el cicle cardíac i la respiració així com pal·liar els efectes de l'aire i el ferro causants d'artefactes en les imatges. Avui en dia els estudis de ressonància magnètica cardíaca són una eina d'indiscutible valor que aporten informació addicional (morfològica, funcional, tissular i de perfusió) rellevant en la presa de decisions per a molts pacients. També, per la seva fiabilitat, és una eina molt emprada en assaigs clínics, per valorar acuradament l'efecte dels tractaments cardiològics en base a variables subrogades (fracció d'ejecció, volums ventriculars, l'extensió de l'infart, miocardi salvat, extensió de la fibrosi, etc.) relacionades amb l'evolució clínica.

Segons les dades de la literatura científica, tant l'infart agut de miocardi amb elevació de l'ST com la discinèsia apical transitòria es caracteritzen per presentar important augment del senyal potenciat en T2 al miocardi isquèmic o discinètic. Aquest augment de senyal de T2 s'ha atribuït a la presència d'edema miocardiàc ⁷³. En el cas de l'infart agut de miocardi, l'edema s'acompanya de necrosi miocàrdica identificada com regions amb retenció tardana de gadolini. En canvi, els pacients amb discinèsia apical transitòria, no solen presentar necrosi miocàrdica significativa ^{96,141}. Per tant, ens trobem amb dos models clínics d'edema miocardiàc important però diferenciats per la presència o absència de necrosi. A priori aquest tret diferencial fa pensar en la possibilitat d'obtenir troballes característiques en l'estudi de l'edema miocardiàc per ressonància magnètica.

Hi ha seqüències molt diverses que es poden aplicar a l'estudi del cor. Cadascuna d'elles està optimitzada per avaluar algun aspecte concret: detecció de necrosi, estudi de fibrosi, volums ventriculars, contractilitat, greix, trombus, obstrucció microrvascular, fluxos intracavitaris, etc. En cada pacient es fan unes o altres seqüències en funció de la indicació clínica de l'estudi¹⁴¹. Les seqüències més emprades en els estudis de RM cardíaca són:

- Seqüències de cine: volums ventriculars, morfologia i funció contràctil.
- *Steady state free precession* (SSFP) en moviment per valorar funció ventricular.
- Estudis de primer pas: imatges de saturació-recuperació amb gradient eco-eco planar (GRE-EPI) híbrid, GRE o SSFP.
- Estudis de perfusió en estrès (amb fàrmacs: agonistes de l'adenosina o dobutamina): per detectar isquèmia.
- *Velocity-encoded imaging* per estudi hemodinàmic i funció valvular.
- Imatges potenciades en T2: *fast spin-echo imaging (double inversion recovery)*: per valorar processos inflamatoris aguts: miocarditis i edema miocardiàc agut (en el context d'infart o discinèsia apical transitòria).
- Seqüència d'inversió recuperació GRE (potenciada en T1) adquirida 10-15 minuts després de la injecció de l'agent de contrast de gadolini. Permet quantificar l'extensió de l'infart (necrosi), valorar viabilitat, identificar trombus i cicatrius no isquèmiques. Per obstrucció microvascular: adquisició precoç (1-3 min) després de l'administració de contrast.

2 Hipòtesi i objectius

Hipòtesi: L'edema associat a la isquèmia reperfusió contribueix a la necrosi del miocardi. Per tant, intervencions que redueixin l'edema també reduiran la mort cel·lular associada a la isquèmia reperfusió.

Objectius:

L'objectiu principal d'aquesta tesi és analitzar en quina mesura l'edema miocardiàc contribueix a la necrosi del miocardi durant la reperfusió.

Per tal d'arribar a aquest objectiu principal s'han plantejat els objectius secundaris següents:

- Posar a punt un mètode experimental per determinar els espais intra i extracel·lular tant *in vivo* com *ex vivo* (cor aïllat sotmès a perfusió salina).
- Utilitzar el mètode prèviament posat a punt per investigar la possibilitat de determinar la distribució de l'aigua al miocardi mitjançant seqüències d'imatge de ressonància magnètica aplicables clínicament.
- Caracteritzar la magnitud i la distribució de l'edema miocardiàc en el context del dany per isquèmia reperfusió.

- Investigar si la modificació controlada de l'edema miocardiàc durant la reperfusió pot reduir l'extensió de l'infart.

3 Materials i mètodes

3.1 Determinació de la distribució de l'edema en models *in vivo* i *ex vivo* de cor de rata

3.1.1 Determinació *in vivo* i *in situ* de l'espai extracel·lular tot emprant Gadobutrol com marcador d'espai extracel·lular

Els estudis en animals van ser aprovats pel Comitè Ètica d'Experimentació Animal (CEEA) de l'Institut de Recerca de la Vall D'Hebron. En tots els experiments (*ex vivo* i *in vivo*) es van emprar rates mascles Sprague-Dawley amb un pes comprès entre 300-350g, mantingudes en règim d'estabulació consistent en cicles de llum-fosc de 12 hores i accés a menjar i aigua no restringit fins el dia de la seva utilització.

Als experiments *ex vivo* els cors eren perfosos durant 5 minuts amb tampó amb gadolini 1mM en forma de quelat. Als experiments *in vivo* s'administrava Gd-quelat en perfusió contínua durant cinc minuts a una velocitat de 0.35µL/min/g. En ambdós casos es mesurava la [Gd] al tampó de perfusió (efluent de la cànula de perfusió) o en sèrum en el moment del sacrifici. Es va assumir que la [Gd] a l'espai extracel·lular era la mateixa que al tampó de perfusió o al sèrum respectivament de cara a poder calcular el volum d'espai extracel·lular.

3.1.2 Model de rata *in vivo*

Els animals s'anestesiaven amb isofluorà inhalat (5% per a la inducció i 2% de manteniment) i monitoritzats un cop anestesiats i durant tot l'experiment: ritme cardíac de forma no invasiva (3 electrodes d'electrocardiografia a les extremitats), saturació d'oxigen perifèrica i temperatura amb sonda rectal. Un cop l'animal estava anestesiats, es canalitzava una via arterial carotídia per a l'obtenció de mostra arterial i una via venosa jugular per a la perfusió contínua del quelat de gadolini (Gd-DOTA 1M), a 0.35µL/min/g durant 5 minuts amb bomba d'infusió. Aquest ritme de perfusió es va calcular en base al cabal cardíac estimat pel pes de l'animal (assumint l'aproximació de 121mL/kg·min, un volum sanguini de 50-70mL/kg i un volum de distribució en estat d'equilibri de 0.20L/kg). En els darrers 30 segons d'infusió s'obtenia la mostra de sang arterial i tot seguit es procedia a toracotomia subxifoïdal i exèresi del cor (secció de vasos principals: artèria aorta, artèria pulmonar, venes pulmonars i venes cava). Es netejava el cor en sèrum NaCl 0.9% fred a 4°C per eliminar les restes de sang. El processat posterior del cor era comú als experiments realitzats amb cor aïllat sotmès a perfusió salina i està descrit al punt 3.1.4 d'aquesta secció.

3.1.3 Model de cor aïllat de rata sotmès a perfusió salina

Els animals s'anestesiaven amb injecció intraperitoneal de pentobarbital (50mg). Un cop assolida l'anestèsia profunda es procedia a l'exèresi del cor a nivell de grans vasos per via subxifoïdal. El cor eren rentats en sèrum fisiològic fred a 4°C i tot seguit calçats l'aorta ascendent a la cànula de perfusió del sistema Langendorff [Figura 16]. S'introduïa un baló al ventricle esquerre connectat al sistema de transmissió de pressió. La velocitat de perfusió s'ajustava per assolir pressions de perfusió de 45-60mmHg.

Al llarg de tot l'experiment es mantenia registre continu de la pressió de perfusió, i la pressió intracavitària (que proporciona la pressió telediastòlica, la pressió sistòlica màxima exercida pel ventricle esquerre i la freqüència cardíaca). Els cors que presentaven desviacions extremes respecte aquests paràmetres eren exclosos de l'anàlisi per l'alta sospita que haguessin pogut patir un dany que podria interferir en el resultat. En funció de l'experiment variava tant el temps de perfusió (amb període d'isquèmia si s'escau) com el tampó amb què es perfonia el cor.



Figura 16. Sistema de perfusió salina. El cor era connectat a la cànula de perfusió a través de l'aorta ascendent. Per tal de mantenir la temperatura de l'òrgan es protegia amb un vas atemperat gràcies a un circuit d'aigua a temperatura controlada.

A. Models de perfusió contínua

Per tal d'induir diferents graus d'edema i amb patró de distribució entre l'espai intracel·lular i extracel·lular diferenciats, es van emprar tampons de perfusió de diferent composició i osmolaritat, aprofitant el fenomen fisiològic de difusió passiva de l'aigua a favor del gradient osmòtic que tendeix a igualar l'osmolaritat a les dues bandes de la membrana plasmàtica.

Els cors control eren perfosos amb tampó isosmòtic (Normosmòtic-Henselheit). Per tal d'incrementar l'edema intracel·lular es va emprar un tampó hiposmòtic i per reduir-lo un tampó hiperosmòtic. Els cors eren perfosos amb tampó durant 40 minuts. Els darrers 5 minuts de perfusió eren perfosos amb el mateix tampó però enriquit amb Gd-DOTA 1mM. La Figura 17 mostra esquemàticament els protocols de perfusió. La taula 2 mostra la composició dels tampons de perfusió emprats en aquests experiments:

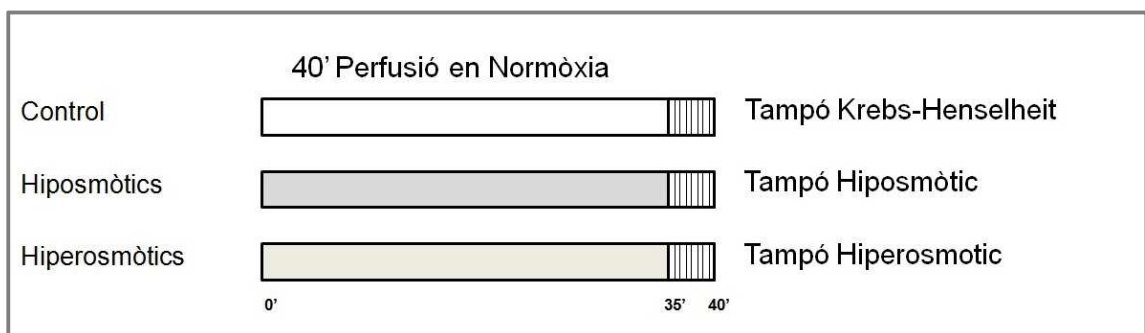


Figura 17. Esquema dels protocols de perfusió.

Taula 2. Composició dels tampons emprats als experiments de cor aïllat de rata sotmès a perfusió salina. Concentracions expressades en mmol/L. Osmolaritat teòrica expressada en mOsm/L.

	Tampó Isotònic	Tampó Hiposmòtic	Tampó Hiperosmòtic
NaCl	118	88	118
KCl	4.7	4.7	4.7
MgSO₄	1.2	1.2	1.2
CaCl₂	1.8	1.8	1.8
NaHCO₃	25	25	25
KH₂PO₄	1.2	1.2	1.2
Glucosa	11	11	11
Manitol	-	-	101
pH	7.4	7.4	7.4
Osmolaritat	308	248	409

B. Models d'isquèmia reperfusió

Els cors sotmesos a dany per isquèmia reperfusió eren perfosos durant 30 min en condicions de normòxia, per tal de consolidar l'equilibri del cor al sistema de perfusió abans d'iniciar la isquèmia. Posteriorment s'iniciava la isquèmia tot interrompent la perfusió salina. Durant el temps d'isquèmia els cors eren protegits amb sèrum fisiològic a 38°C per tal d'evitar dessecació i hipotèrmia. Passat el temps d'isquèmia (40 min) es restablia la perfusió salina, iniciant d'aquesta manera el període de reperfusió. Durant la reperfusió es prenia mostres d'efluent per tal de mesurar l'alliberament de Lactat Deshidrogenasa [LDH] per al càlcul de l'extensió de l'infart, ja que aquest és un dels enzims intracel·lulars que s'alliberen al medi extracel·lular en produir-se la ruptura del sarcolem (és a dir, la mort cel·lular) ^{142,143} i que permet quantificar l'extensió de l'infart. Altres enzims, com les troponines o la creatin cinasa (fracció MB) són més específics del miocardi però als experiments amb cor aïllat aquesta especificitat no és rellevant. El mètode posat a punt al nostre laboratori per quantificar està basat en la determinació de LDH i per aquest motiu hem emprat aquesta tècnica de quantificació de l'infart. Durant els darrers cinc minuts de l'experiment (és a dir, al final de la

reperfusió) els cors eren perfosos amb el mateix tampó que rebien durant l'experiment però amb Gd-DOTA 1mM.

Es va treballar amb tres protocols d'isquèmia reperfusió: tots ells sotmesos a 40 minuts d'isquèmia i 30 minuts de reperfusió. El protocol de referència, I40R30 sense cap més intervenció. Els altres dos protocols incorporaven tractaments dirigits a reduir l'extensió de l'infart i l'edema: l'administració de blebbistatina en els primers 3 minuts de la reperfusió [I40R30-Blebbistatina] o bé la perfusió amb tampó hiperosmòtic enriquit amb manitol [I40R30-Manitol]. Els protocols d'isquèmia reperfusió estan representats esquemàticament a la Figura 18.

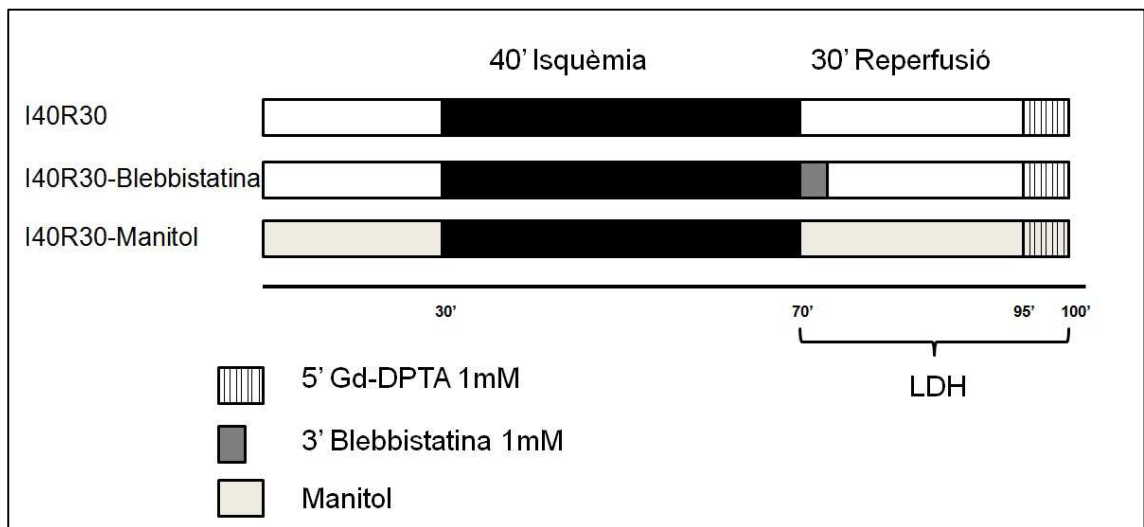


Figura 18. Protocols d'isquèmia reperfusió en cor aïllat de rata sotmès a perfusió salina.

3.1.4 Quantificació de l'extensió de l'infart

Per tal de quantificar la mort cel·lular es va mesurar l'alliberament de l'enzim LDH durant la reperfusió. Les mostres emprades per quantificar LDH provenien de 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'àrea sota la corba de l'alliberament de LDH (valor acumulat). La mesura de l'activitat de LDH es va realitzar per espectrofotometria. [Espectrofotòmetre: Multiskan FC, Thermo Scientific®].

Un cop recollides totes les mostres, es prenia un volum exacte i igual de cada mostra (40 µL) i es dipositava en un pou d'una placa de lectura per a espectrofotometria. A continuació s'afegien 160 µL de tampó fosfat enriquit amb NADH (310 µM) i piruvat sòdic (1mM) i es mesurava l'activitat de LDH. La composició del tampó fosfat emprat, expressat en mM és la següent: K₂HPO₄·3H₂O 61.4, K₂HPO₄ 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 catalitzada per aquest enzim, que és la conversió de piruvat en lactat i de NADH en NAD⁺, representada a la Figura 19. 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).

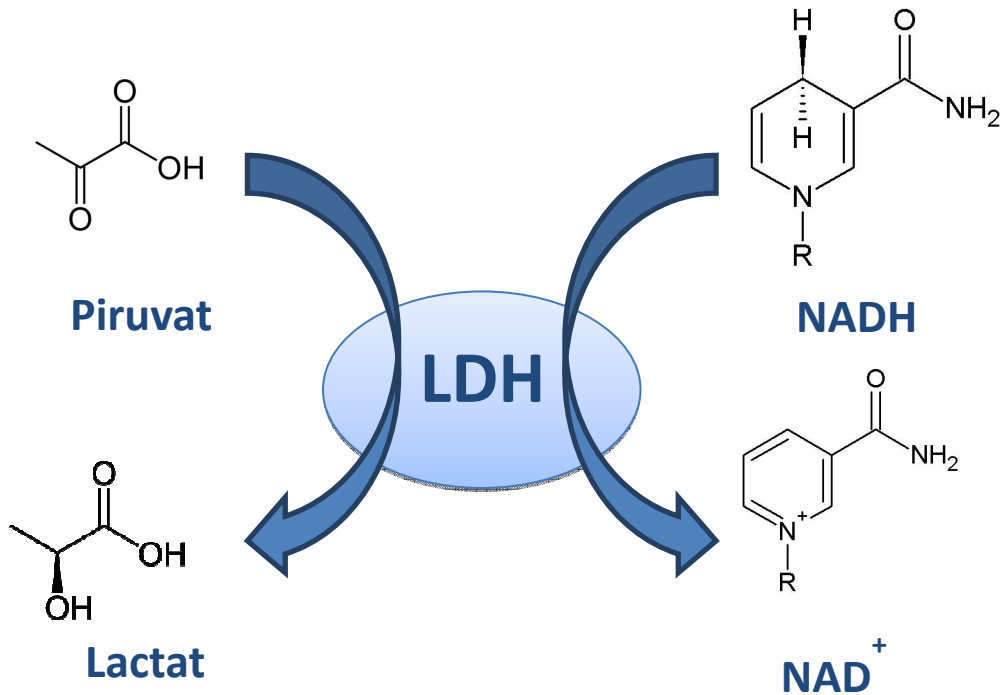


Figura 19. Reacció catalitzada per LDH (Lactat Deshidrogenasa): LDH catalitza la transformació del piruvat en lactat amb el cofactor NADH que s'oxida a NAD⁺.

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), fet que s'exemplifica a la Figura 20.

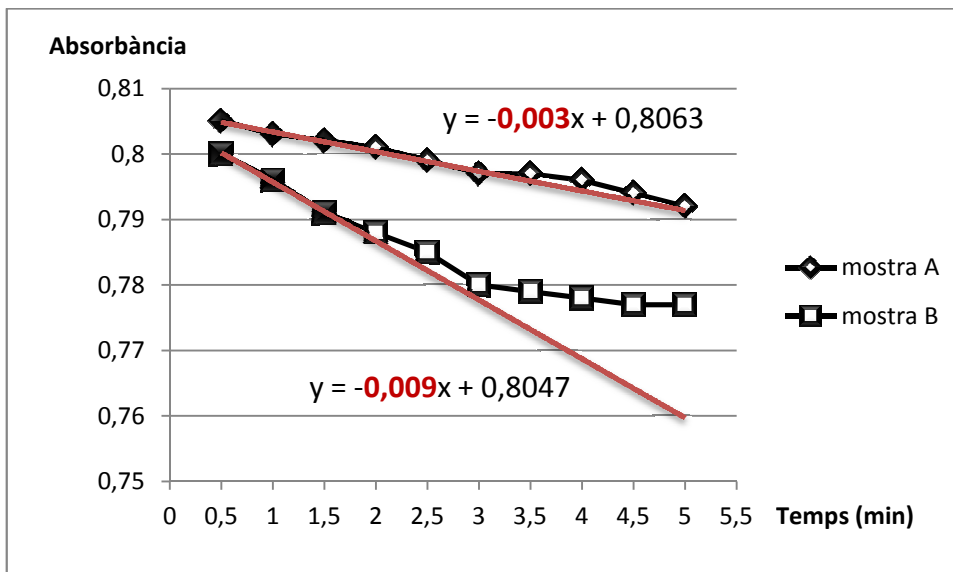


Figura 20. Representació de la disminució en el temps de l'absorbància a 340nm (reflecteix la $[NADH^+]$) de 2 mostres diferents. El pendent de la recta en el primer minut de la reacció determina l'activitat de LDH

Els resultats eren ajustats 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 és expressat en Unitats d'activitat de LDH per gram de pes sec del cor i temps. El càlcul de l'àrea sota la corba s'ha realitzat amb el programa SigmaPlot®, Systat Software Inc, 2006.

3.1.5 Quantificació de l'aigua total

A. Pes de la mostra fresca i seca

Tant els cors obtinguts d'experiments *in vivo* com *in vitro* van ser processats d'igual manera. Els cors retirats del sistema de perfusió salina retrògrada eren manipulats sobre una safata de plàstic en un entorn de fred (damunt de gel). Els cors procedents dels experiments *in vivo* es rentaven primer en sèrum fred a 4°C i posteriorment eren manipulats igual que els cors procedents de perfusió salina, sobre una safata de plàstic i en entorn fred. Els cors eren seccionats tot exclouent el pla valvular i obtenint tres talls: àpex i dues seccions simètriques dels dos terços mig i basal (procurant agafar la mateixa proporció de ventricle dret i ventricle esquerre a cada tall) [Figura 21].

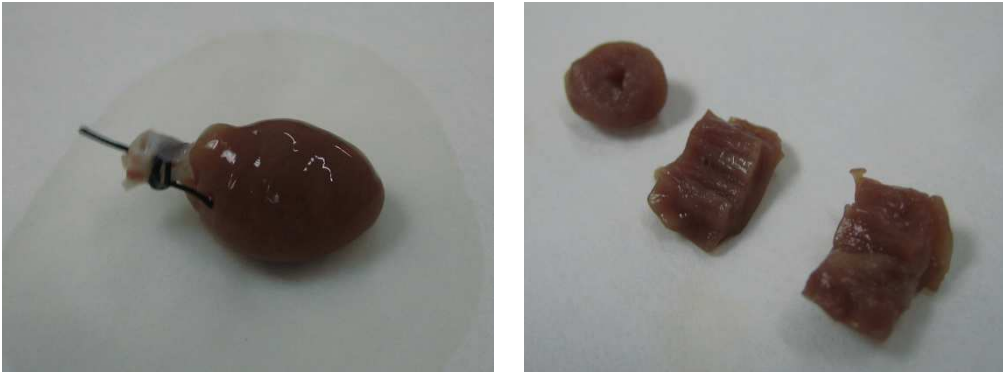


Fig 21. Cor acabat de retirar del sistema de perfusió retrògrada. El cor era seccionat en tres parts: àpex i dues parts simètriques de la porció mitja i basal. A la foto del cor sencer es pot observar un halo de sèrum. Si es treballa sobre paper de laboratori es produeix pèrdua de contingut d'aigua de forma no controlada pel fenomen de capil·laritat sobre en paper. Per evitar aquesta possible interferència, es va treballar sobre safates de plàstic i no sobre paper.

Cada tall era col·locat sobre una malla de niló amb porus de $180\mu\text{m}$ de diàmetre, fixada a la part superior d'un tub Falcon de 50mL i sotmès a una centrifugació a baixes revolucions (2.000g durant 5 minuts a temperatura ambient) que tenia per objecte eliminar l'aigua que no pertany al teixit. Posteriorment cada tall es pesava per separat per obtenir el pes fresc; el pes total del cor era la suma dels pesos dels tres talls. Les pesades es van realitzar en una balança de precisió 0.1mg. Un cop deshidratades les mostres es tornava a realitzar la pesada de cada tall tot obtenint el pes sec de cada mostra. La diferència entre pes fresc i pes sec proporcionava el contingut d'aigua de cada tall, expressat en relació al pes sec (en mL per cada 100 grams de teixit sec).

B. Liofilització

El procés de deshidratació es va dur a terme per liofilització de les mostres. Es va optar per aquesta tècnica perquè la liofilització no degrada la mostra i permet la seva manipulació posterior. D'aquesta manera es va poder fer l'anàlisi del contingut de gadolini en la mateixa mostra dessecada, enlloc de recórrer a mostres diferents procedents del mateix experiment per obtenir tot l'espectre de dades. Cada tall era introduït en un tub d'assaig de vidre, immersos en nitrogen líquid per a ultracongelar i posteriorment sotmesos a liofilització (LT-105 Christ®) durant 24h. Als estudis preliminars s'havia realitzat el procés de deshidratació amb calor a 95° . La liofilització ha estat validada com a procediment de dessecació¹⁴⁴ i té l'avantatge de permetre el posterior processat de la mostra. La dessecació en canvi, no ho permet i calia dedicar unes mostres a establir el contingut d'aigua total i unes altres a quantificar el contingut d'aigua extracel·lular. Utilitzant la liofilització com a mètode de deshidratació es va poder

quantificar el contingut d'aigua total i el contingut d'aigua extracel·lular en una mateixa mostra. Va ser possible destinar els tres talls obtinguts de cada cor a liofilització i posterior quantificació d'aigua extracel·lular.

3.1.6 Quantificació del contingut de gadolini a la mostra i determinació de l'espai extracel·lular

A. Extracció del gadolini de les mostres

Per tal de recuperar el gadolini present a les mostres cardíaques, en primer lloc es realitzava una micronització de la mostra deshidratada, tot triturant-la amb una espàtula dins del mateix tub d'assaig on va ser ultracongelada i liofilitzada. En segon lloc s'afegia 1mL d'aigua miliQ, es remenava al vòrtex i es deixava incubar a temperatura ambient durant 10 minuts. A continuació se centrifugava a 2.000g, durant 5 minuts a temperatura ambient. Aquesta tècnica permetia recuperar 750µL de sobrenedant que constitueixen el primer extracte. Es van obtenir fins 5 extractes ulteriors per valorar si la recuperació de gadolini millorava amb extractes addicionals. Per a obtenir extractes addicionals, s'afegia 1mL d'aigua miliQ al pellet i es repetien els passos de remenat al vòrtex, incubació, centrifugació i recuperació de sobrenedant (1mL a partir del segon extracte). Aquest procés està representat gràficament a la Figura 22.

B. Quantificació del gadolini mitjançant ressonància magnètica

Els extractes aquosos de les mostres eren analitzats mitjançant imatge obtinguda per ressonància magnètica. L'estudi d'imatge es realitzava concomitantment amb 7 mostres i una corba de calibració de gadolini (aigua miliQ amb [Gd]: 0-0.5-0.6-0.8-1mM). Les imatges eren obtingudes a l'iman vertical de 9.4T acoblat a una consola Bruker® Advance. Detalls de la seqüència: Temps de eco (ET): 4ms, Temps de Repetició (RT) x 9 [6.000 – 4.000 – 3.000 – 2.000 – 1.000 – 500 – 250 – 125 - 62,5]ms, matriu de 256*256 pixels en una finestra de 30*30mm i talls de 1,0mm de gruix. Es va definir la regió d'interès al centre de cada tub, on es mesurava la intensitat del senyal. El valor de T1 era proporcionat pel software de Bruker® tot ajustant a una funció exponencial el senyal obtingut als diferents RT.

Es mesurava el valor de T1 a cadascuna de les mostres i cada tub de la corba de calibració. El gadolini escurça T1 de forma proporcional a la [Gd]¹³⁵, de manera que la mesura de T1 permet calcular el contingut de Gd de la mostra.

La Figura 23 mostra un exemple d'imatge de ressonància magnètica amb els diferents tubs analitzats (corba de calibració i mostres).

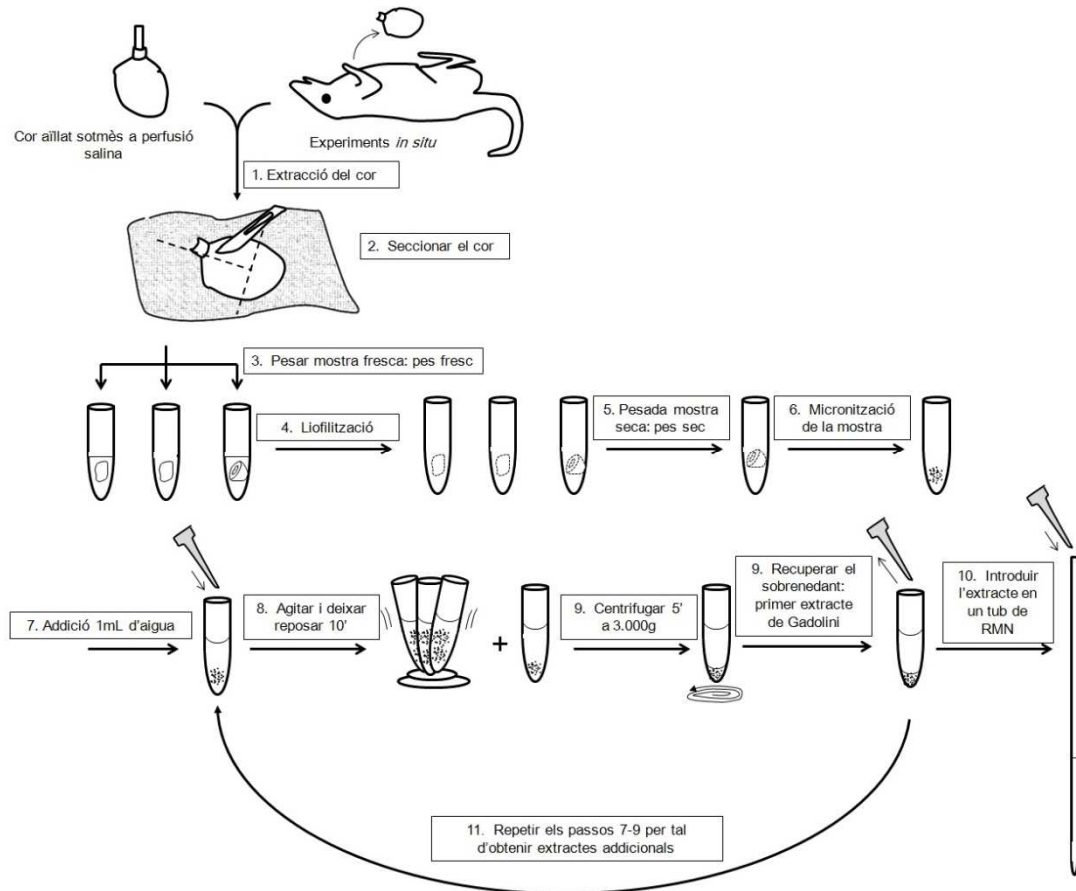


Figura 22. Esquema del procés d'extracció del gadolini de les mostres de teixit cardíac.

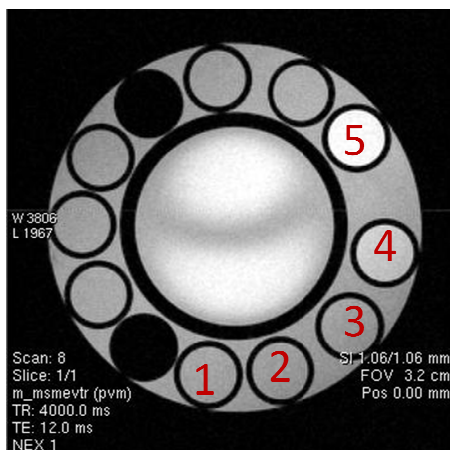


Figura 23. Imatge de ressonància magnètica potenciada en T1. El cercle central es correspon amb un tub de goma emprat per mantenir els tubs amb mostra en posició estable. Els cercles petits externs es corresponen amb el tall transversal dels tubs dedicats a ressonància que contenen la mostra. Els de color negre són tubs de referència i contenen aire: es col·loquen per poder identificar els tubs amb mostra. Els tubs de la corba de calibració són els numerats de l'u al cinc: es pot apreciar com generen una escala de grisos degut al fet que la major concentració de gadolini genera major intensitat de senyal (tub 5).

C. Càlcul del contingut d'aigua extracel·lular

El contingut d'aigua extracel·lular és proporcional al contingut de gadolini. Com que no és possible recuperar tot el volum d'aigua afegida a la mostra per obtenir el primer extracte, cal tenir-ho en compte alhora de realitzar els càlculs de contingut de gadolini si s'analitza més d'un extracte. Generalment és possible recuperar 750µL dels 1.000µL afegits. Com que es mesura la [Gd] a l'extracte, no suposa cap dificultat quan s'analitza un únic extracte: per calcular el contingut de gadolini de la mostra, es considera la [Gd] calculada i el volum total de 1.000µL. Quan es fan extractes ulteriors, s'afegeix 1.000µL addicionals per cada extracte i se'n recuperen 1.000 a partir del segon extracte; cal considerar que el volum total és de 1.250 µL, ja que queda el romanent de 250µL que no es poden recuperar en el primer extracte. Els extractes entremitjos es van considerar en un volum de 1.000µL i, el darrer, en un volum de 1.250µL.

$$[(\text{[Gd]}_{\text{primer extracte}} * 0.75) + (\text{[Gd]}_{\text{segon extracte}}) + (\text{[Gd]}_{\text{tercer extracte}} * 1.25)] / \text{[Gd]}_{\text{tampó}} = \text{Volum EC}$$

Si només es fa servir un extracte, la fórmula queda reduïda a:

$$\text{[Gd]}_{\text{primer extracte}} / \text{[Gd]}_{\text{tampó}} = \text{Volum EC}$$

La fórmula emprada per calcular el Volum EC per gram de teixit sec va ser:

$$\text{Volum EC} / \text{massa de teixit sec} * 100 = \text{Volum d'aigua EC en mL per 100g de teixit sec}$$

D. Controls de qualitat del mètode

- Linearitat de la relació entre [Gd] i T1⁻¹: Tot i que la relació entre [Gd] i T1 està descrita a la literatura ¹³⁵, es va comprovar al nostre imàn i amb el contrast emprat en els experiments realitzats. En total, al llarg de l'estudi, es van realitzar 55 corbes de calibració de gadolini (una per cada mesura realitzada) i la relació matemàtica amb T1 (tant T1⁻¹ com logT1) per a concentracions de Gd < 0.005M ha estat estudiada.
- Verificació de possibles interferències en la mesura de T1 degudes a restes fèrriques de l'extracte: Per tal de valorar la possible interferència de les restes fèrriques procedents de la mioglobina que poguessin quedar als extractes, es va analitzar també mostres de cors perfosos sense gadolini, processats d'igual manera el mètode descrit, com a controls de qualitat del mètode.

3.1.7 Determinació de l'aigua intracel·lular

L'aigua intracel·lular és una mesura indirecta i prové de restar el volum d'aigua extracel·lular al volum d'aigua total. El volum d'aigua total prové de diferència de pes fresc i pes sec de la mostra. El volum d'aigua extracel·lular va ser mesurat mitjançant la quantificació de gadolini, assumint que la [Gd] a l'espai extracel·lular era igual a la [Gd] al sèrum o al tampó de perfusió en el moment de finalitzar l'experiment (estat d'equilibri).

3.1.8 Estudi de les seqüències d'imatge per ressonància magnètica amb possible utilitat per determinar la distribució de l'aigua al miocardi.

Els estudis de cor aïllat de rata sotmès a perfusió salina amb tampons de perfusió amb diferent osmolaritat es van duplicar per tal de realitzar l'estudi d'imatge per ressonància magnètica als cors íntegres. Es van analitzar 2 cors intactes (no perfosos) i 4 cors de cada grup sotmès a perfusió salina (isotònic, hiposmòtic i hiperosmòtic). L'única diferència era que els cors destinats a l'adquisició d'imatges no van ser perfosos amb gadolini. En retirar el cor del sistema de perfusió, era col·locat dins d'un tub Falcon de 50mL amb sèrum fisiològic fred a 4°C, fixat amb fil de sutura per evitar desplaçament del cor durant l'adquisició d'imatges. En el cas dels cors intactes, un cop extret el cor de l'animal es rentava en sèrum fisiològic fred per retirar les restes de sang abans de col·locar-lo al tub Falcon. El tub Falcon s'introduïa a l'interior de l'iman per tal de poder adquirir imatges potenciades en T2, en difusió i imatges amb RT llargs destinades a estimar la densitat protònica.

- Seqüència de T2: Per tal de mesurar T2 es va adquirir una seqüència d'spin-echo amb un RT = 6000ms amb 16 ecos de 4ms.
- Seqüència de Difusió: L'estudi de difusió es va adquirir amb una seqüència de polsos DtiEPI amb ET = 25ms, RT = 3000ms, que permet obtenir 7 valors "b" entre 4 i 755s/mm². El valor emprat en l'anàlisi és el coeficient de difusió aparent (ADC) expressat en mm²/s.
- Seqüència per estimar la densitat protònica: Per mesurar densitat protònica es va adquirir la imatge amb una seqüència de pols-eco amb un RT significativament superior, de 10.000ms i el mínim ET que permetia la seqüència (4ms). El valor de densitat protònica s'ha definit com la relació d'intensitat de senyal a la imatge del primer eco entre el teixit miocardiàc i l'aigua lliure (és a dir, es prenia com densitat protònica màxima de referència la de l'aigua lliure). Per cada cor, s'adquirien un promig de 10 mesures de densitat protònica: és a dir, es definien 10 regions d'interès (ROI: *region of interest*) en el tall del miocardi estudiat. La intensitat de senyal del ROI correspon al promig de senyal en el *voxel* seleccionat.

3.1.9 Anàlisi estadística

Pel que fa a la distribució de l'aigua, es va comparar el grup de cor intacte i tots els grups de cors sotmesos a perfusió salina. Per altra banda es va comparar el grup de perfusió salina isosmòtic amb els grups d'isquèmia reperfusió. Es va aplicar el test ANOVA i el test post-hoc de Tukey mitjançant el Software de SPSS versió 15 per Windows.

Els test de correlació lineal es va fer amb el coeficient de Pearson en el software de SigmaPlot, ajustant a l'equació $y = a + bx$.

Es va considerar que una diferència era estadísticament significativa quan la $p < 0.05$. Els resultats s'expressen com promig \pm desviació estàndard.

3.2 Determinació clínica de la distribució de l'edema miocardiàc

3.2.1 Mostra de pacients: infart agut de miocardi i discinèsia apical transitòria

Per tal de valorar la possible utilitat i translació clínica de les dades obtingudes experimentalment, es va realitzar estudi d'imatge per ressonància magnètica incloent seqüències potenciades en T2, estudi de difusió (ADC) i seqüència potenciada en T1 adquirida 10 minuts després de l'administració de contrast de gadolini (per identificar les zones de necrosi definides com la retenció tardana de contrast o *late gadolinium enhancement* [LGE]). Les característiques tècniques de l'iman de ressonància magnètica clínica de què disposem no permeten realitzar estudi de densitat protònica cardíaca en humans.

Es va realitzar l'estudi a dos pacients amb infart agut de miocardi amb elevació de l'ST i quatre pacients amb discinèsia apical transitòria, reclutats entre els anys 2011 i el 2013, durant l'ingrés a la Unitat Coronària. També es va intentar adquirir una seqüència optimitzada per mesurar densitat protònica en un únic pacient Els pacients van donar el seu consentiment informat per al protocol d'estudi prèviament acceptat pel Comitè d'Ètica d'Investigacions Clíniques de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron amb data 29 de juliol del 2011, consistent en afegir les seqüències experimentals a l'estudi habitual de ressonància magnètica cardíaca. Els criteris d'inclusió van ser pacients ingressats a la unitat coronaria de l'hospital Vall d'Hebron diagnosticats de IAM amb elevació de l'ST o de discinèsia apical transitòria, que per decisió facultativa es realitzaven un estudi de ressonància magnètica cardíaca, amb capacitat

per mantenir apnees prolongades i que signessin en consentiment informat després d'haver rebut la informació adient sobre l'estudi.

3.2.2 Estudi mitjançant ressonància magnètica cardíaca

L'estudi complert habitual de ressonància magnètica cardíaca en el context de l'infart agut de miocardi (IAM) i la discinèsia apical transitòria consisteix en seqüències funcionals de cines, imatges potenciades en T2 i estudi de retenció tardana de gadolini adquirit 10 minuts després de l'administració de contrast. A aquest estudi basal s'afegeix la seqüència de difusió. Les característiques tècniques de l'iman de ressonància magnètica clínica de què disposem no han permès realitzar estudi de densitat protònica cardíaca en pacients.

Les característiques de l'iman clínic emprat són: 1.5T model Magnetom Avanto, Siemens Healthcare (Germany), equipat amb sistema *fast-gradient* caracteritzat per un pic d'amplitud de gradient de 40 G/m i una raó de gir màxima de 200T/m/s.; antena acoblada a quatre elements. Totes les seqüències es van adquirir amb sincronització electrocardiogràfica i apnea respiratòria. En primer lloc s'adquirien les seqüències funcionals de cine-RM segmentades (TrueFISP, TE, 1.4 ms, TR: 55 ms, angle d'inclinació: 52°; amplada de banda, 977 Hz/pixel; matriu, 256 x 212; gruix de tall de 6 mm) en plans d'eix curt des de la base fins l'àpex del ventricle esquerre, 2 càmeres i 4 càmeres.

Les imatges de sang negra potenciades en T2 es van adquirir amb una seqüència estàndard de triple inversió – recuperació amb un ET = 47ms, RT = 2 intervals RR, angle de 180°, amplada de banda de 310Hz/pixel, Temps d'inversió de 18ms, Factor d'acceleració per a la imatge paral·lela de 2, matriu de 108*256mm i voxel de 2.0*1.3*8mm³.

Les imatges de difusió es van adquirir amb una seqüència EPI en condicions de respiració lliure i amb sincronització amb ECG. Valors b potenciats en difusió de 0,400 i 800 s/mm², ET= 91 ms, RT= 3 R-R, amplada de banda =1302 Hz/pixel, Factor d'acceleració per a la imatge paral·lela de 2, matriu de 192x192mm i voxel 1.5x1.5 x 4 mm³.

Finalment, als 10 minuts de l'administració de contrast (0.15 mmol/kg de gadolini), s'adquirien les imatges tardanes mitjançant una seqüència segmentada amb pre pols d'inversió recuperació (TurboFlash, TE: 1.2 ms, TR: 450 ms, angle d'inclinació 50°; amplada de banda 1180Hz/pixel; matriu, 192 x 128; gruix de tall de 8 mm), tot escollint el temps d'inversió més adient per tal d'anul·lar correctament la senyal del miocardi sa.

4 Resultats

4.1 El mètode

4.1.1 Linearitat de la relació entre [Gd] i T1⁻¹

El valor de T1 es correlaciona directament amb la [Gd] i permet, per tant, mesurar la concentració de Gd en la mostra. T1⁻¹ i la [Gd] presenten una molt bona correlació lineal per a [Gd] < 5mM [Figures 24.A i 24.B] (amb [Gd] superiors es perd la linearitat de la relació). La força de la relació s'ha valorat amb el coeficient de correlació lineal r^2 en 55 corbes de calibració realitzades durant els experiments. El rang de valors de r^2 ha estat: 0.9778-0.9999, amb un valor promig de 0.9967 i desviació estàndard de 0.0042.

La correlació entre LogT1 i la [Gd] és bona per a [Gd] < 0.1mM [Figura 24.C], però es perd amb [Gd] superiors [Figura 24.D]. El rang de valors de r^2 ha estat de 0.9574-0.9965, amb un valor promig de 0.9792 i desviació estàndard de 0.007 (analitzat en els mateixos 55 experiments).

Donat que la correlació entre T1⁻¹ i [Gd] té validesa en un rang de [Gd] més ampli i demostra major fortalesa, s'ha emprat el valor de T1⁻¹ per calcular la [Gd] dels extractes.

Quan la [Gd] a l'extracte és superior a 0.1mM cal diluir l'extracte amb aigua miliQ per tal de fixar la [Gd] de la mostra analitzada a la RM entre 0.05-0.1mM (dintre del rang òptim de correlació lineal entre T1⁻¹ i [Gd]).

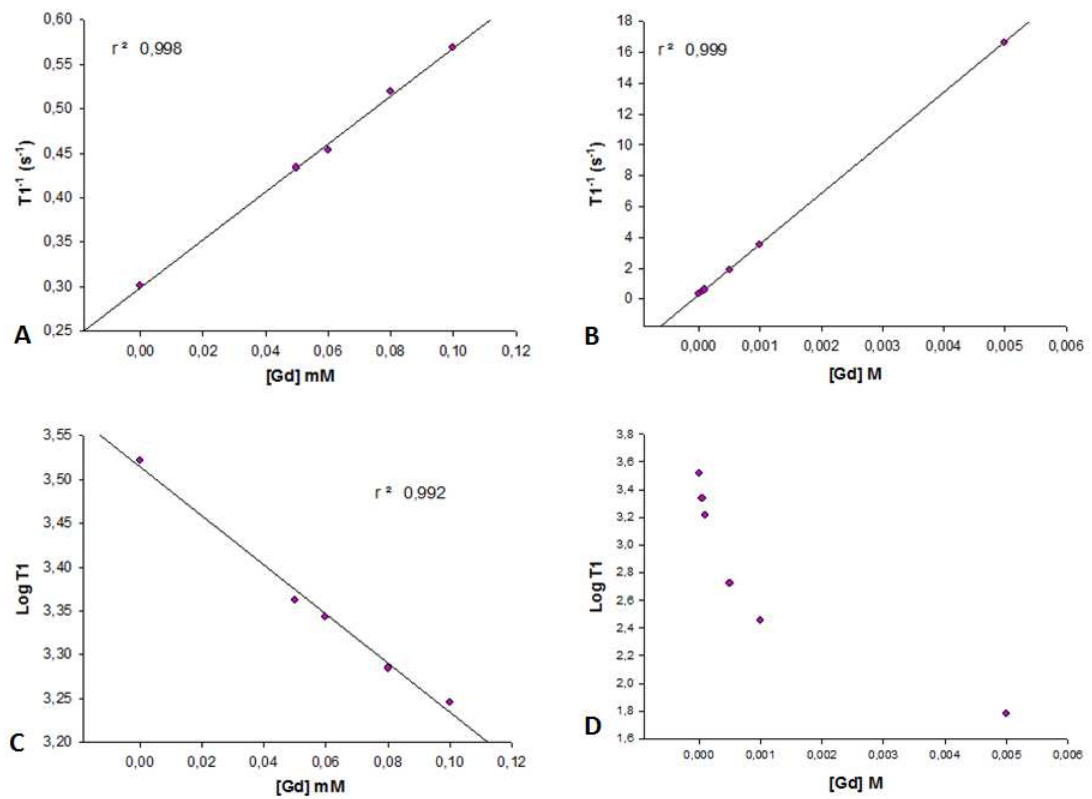


Figura 24. Relació entre la [Gd] i T1: les gràfiques A i B mostren la relació amb $T1^{-1}$: es manté una relació lineal, inversament proporcional i la linealitat es manté amb [Gd] elevades superiors a 0.1mM. Les gràfiques C i D mostren la relació entre [Gd] i LogT1: en aquest cas, a [Gd] baixes hi ha relació lineal, però aquesta es perd amb [Gd] > 0.1mM.

4.1.2 Verificació de possibles interferències en la mesura de T1 degudes a restes fèrriques de l'extracte

Les restes biològiques amb possible contingut fèrric presents als extractes analitzats no tenen cap efecte sobre la mesura de T1. Es comprova com els extractes sense gadolini no modifiquen el valor de T1 respecte l'aigua miliQ sense gadolini [Figura 25]. Per tant, es pot concloure que les restes tissulars presents a l'extracte no alteren el valor de T1.

Valoració de la possible interferència de les restes fèrriques als extractes en el valor de T1

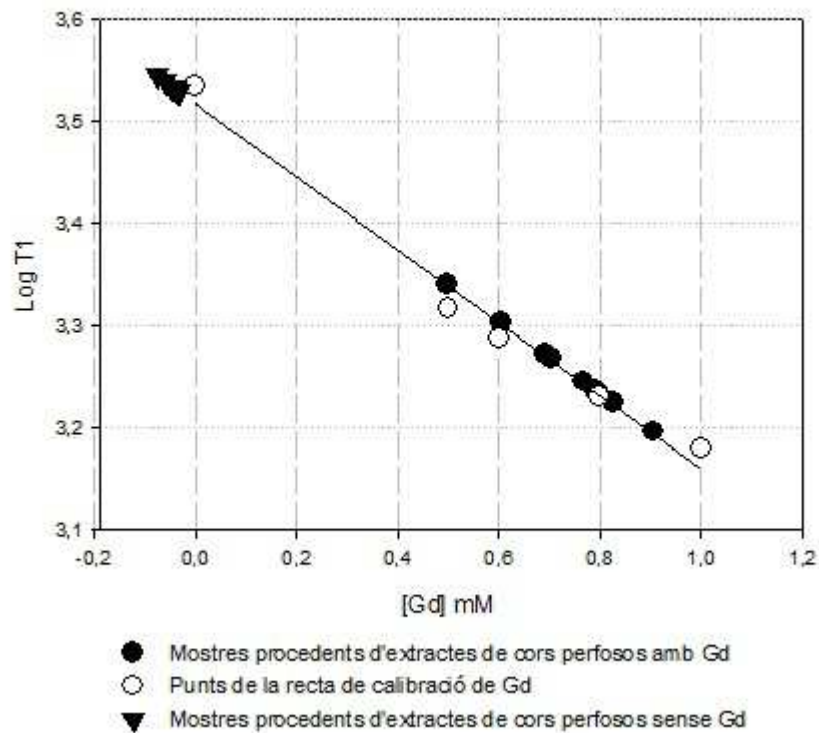


Figura 25. Gràfica on es representen els valors de T1 d'extractes de cor perfosos amb i sense gadolini així com la corba de calibració de Gd en aigua. Els cercles negres són mostres d'extractes procedents de cors perfosos amb gadolini. Els triangles negres corresponen a extractes procedents de cors que han estat perfosos sense gadolini. Els cercles blancs mostren els punts de la corba de calibració. Es comprova com els extractes sense gadolini no modifiquen el valor de T1 respecte l'aigua miliQ sense gadolini.

4.1.3 Comprovació del nombre d'extractes necessaris per quantificar adientment el gadolini

Per tal de determinar quants extractes de la mostra calia fer per obtenir la màxima recuperació de gadolini es van realitzar tres extractes a les mostres procedents de cors perfosos amb [Gd] 1mM [Figura 26.A]. Es va comprovar que en el primer extracte ja s'obté el 100% del contingut de Gd i que la quantificació no es modifica afegint la informació d'extractes ulteriors.

Es van realitzar experiments pilot amb cors perfosos amb [Gd] 10mM, és a dir, una [Gd] 10 vegades superior als experiments habituals. En aquests casos, el primer extracte permetia recuperar el 87% del Gd, l'addició de dues extraccions més proporcionava el 98.5%, del Gd i el

quart extracte, el 99.5% [Figura 26.B]. És a dir, quan el contingut de gadolini de la mostra és elevat, pot ser necessari realitzar més d'un extracte per obtenir la recuperació completa de gadolini.

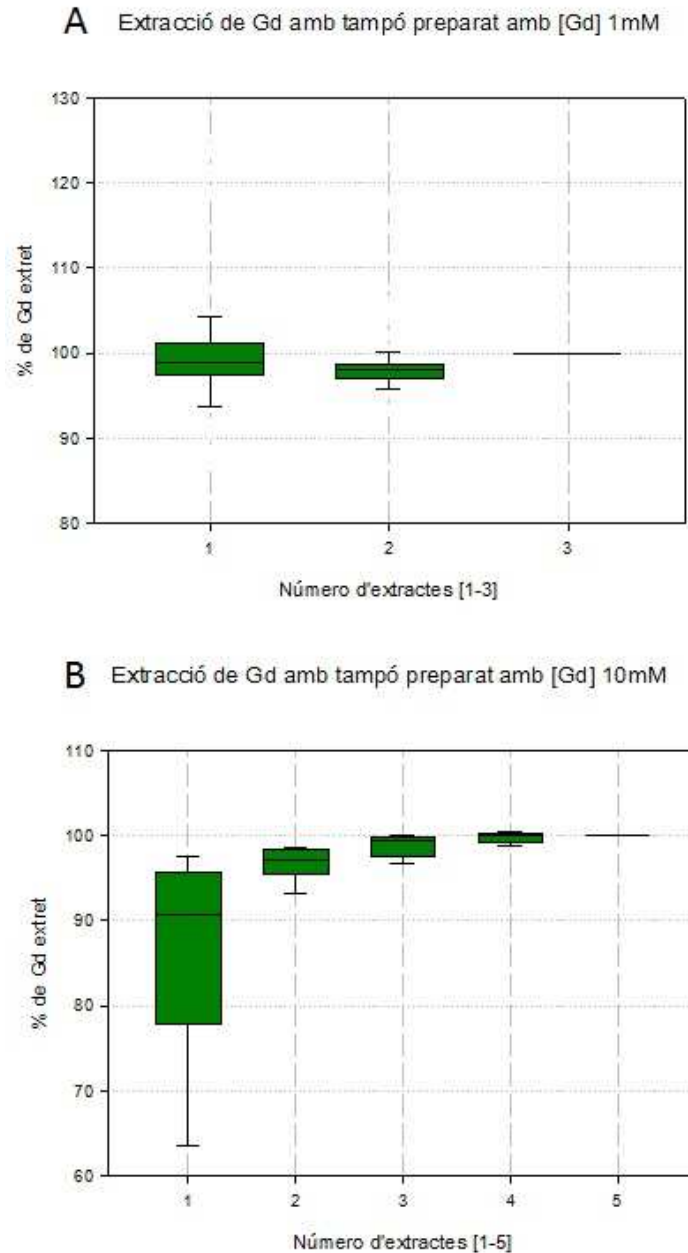


Figura 26. Box plot on es representa la quantitat de Gd recuperada segons el nombre d'extraccions que es realitza sobre la mateixa mostra. La gràfica A representa el promig i desviació estàndard del primer, segon i tercer extractes procedents de 72 experiments de cors perfosos amb Gd 1mM. La gràfica B representa el promig i desviació estàndard del primer, segon, tercer, quart i cinquè extractes procedents de 13 experiments de cors perfosos amb Gd 10mM.

4.1.4 Cinètica d'arribada del gadolini a l'efluent

S'ha estudiat la cinètica d'arribada del gadolini a l'efluent en el sistema de perfusió salina. En les nostres condicions experimentals s'ha comprovat que la [Gd] a l'efluent s'estabilitza passats 3,5 minuts des de l'addició de tampó amb gadolini a l'inici del circuit. La figura 27 mostra la cinètica d'arribada de gadolini a l'efluent en les condicions experimentals emprades. Aquest temps depèn de la longitud del circuit de perfusió, de la velocitat de perfusió i del volum de tampó contingut a la càmera prèvia a la sortida de l'efluent (trampa de bombolles), que ha estat constant al llarg de tots els experiments. En tots els experiments s'ha obtingut una mostra d'efluent per comprovar la [Gd] amb què s'estava perforant el cor en el moment de finalitzar l'experiment.

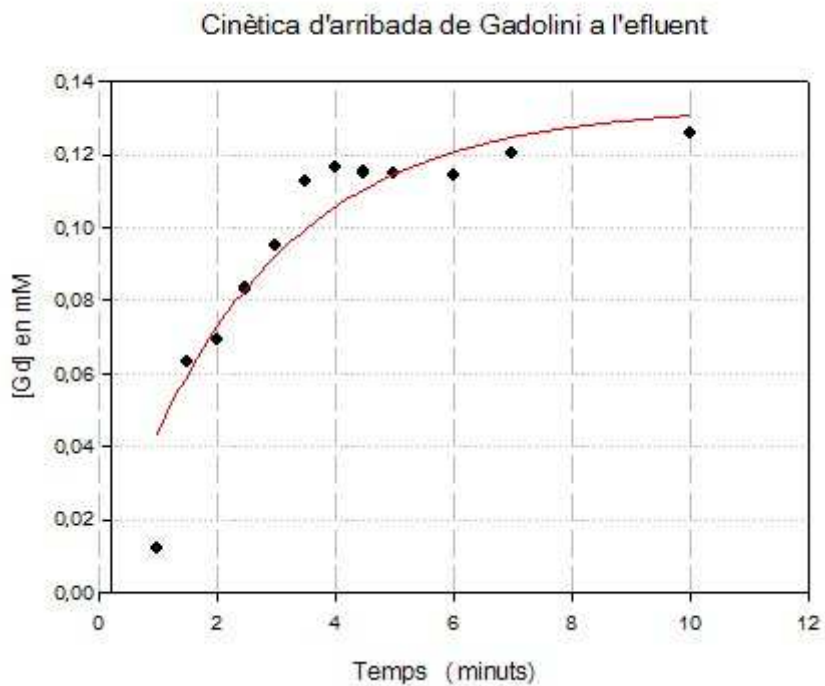


Figura 27. Concentració de Gadolini a l'efluent al llarg del temps. La corva mostra un ajust exponencial realitzat amb el Software Sigma Plot®. Es pot apreciar com a partir del minut 4 s'estabilitza la [Gd] a l'efluent.

4.2 Experiments amb cor de rata aïllat sotmès a perfusió salina

4.2.1 Experiments en normòxia

Els cors sotmesos a perfusió salina normosmòtica durant 40 minuts van presentar una pressió de perfusió de 49.5 ± 6.4 mmHg i pressió sistòlica màxima de 84.3 ± 26.1 mmHg. Els cors del grup de perfusió hiperosmòtica van presentar una pressió de perfusió de 56.5 ± 8.3 mmHg i pressió sistòlica màxima de 81.4 ± 25 mmHg. Els cors del grup de perfusió hiposmòtica van presentar una pressió de perfusió de 46.9 ± 5.7 mmHg i pressió sistòlica màxima de 56.8 ± 10.8 mmHg [Figura 28.A, 28.B, 28.C; Figura 29].

4.2.2 Experiments amb isquèmia reperfusió

Els cors sotmesos a isquèmia reperfusió van presentar una pressió de perfusió durant l'equilibrat de 54.5 ± 12.1 mmHg i pressió sistòlica màxima de 75.5 ± 16.9 mmHg. Els cors del grup d'isquèmia reperfusió protegits amb blebbistatina van presentar una pressió de perfusió de 44.8 ± 2.8 mmHg i pressió sistòlica màxima de 85.3 ± 24.7 mmHg. Els cors del grup d'isquèmia reperfusió protegits amb manitol van presentar una pressió de perfusió de 46.8 ± 6.4 mmHg i pressió sistòlica màxima de 102.5 ± 36.9 mmHg [Figura 28.D, 28.E, 28.F; Figura 29].

Paper de l'edema miocàrdiac en el dany per isquèmia – reperfusió. Estudi de la distribució de l'edema mitjançant ressonància magnètica

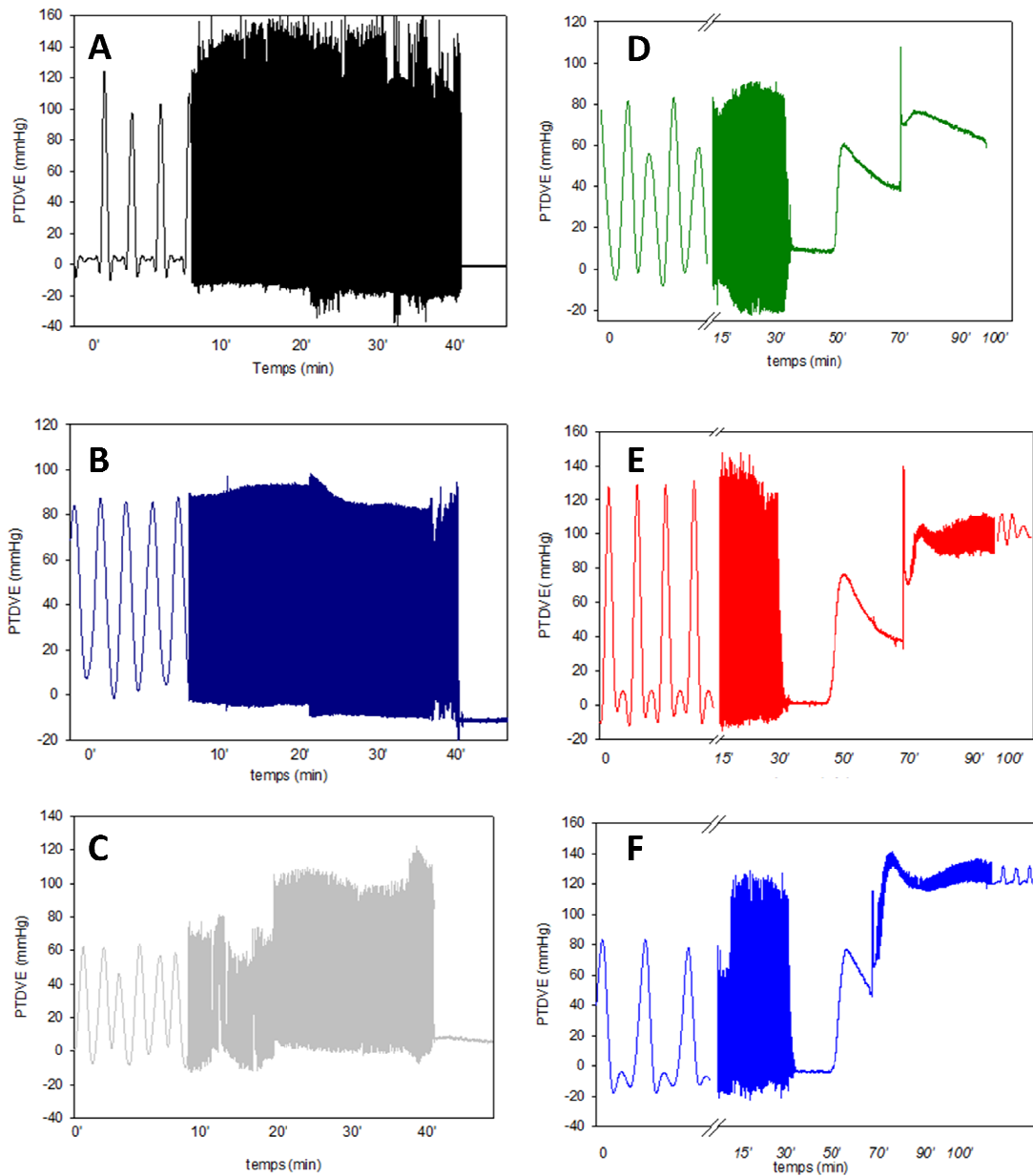


Figura 28. Registres de pressió exercida pel ventricle esquerre al llarg de l'experiment de perfusió slaina. A. Exemple del registre de la pressió exercida pel ventricle esquerre d'un cor perfós durant 40 minuts amb tampó Normosmòtic-Henselheit (isosmòtic). B Exemple del registre de la pressió exercida pel ventricle esquerre d'un cor perfós durant 40 minuts amb tampó hipoosmòtic. C. Exemple del registre de la pressió exercida pel ventricle esquerre d'un cor perfós durant 40 minuts amb tampó hiperosmòtic (enriquit amb manitol). D. Exemple del registre de la pressió exercida pel ventricle esquerre d'un cor perfós durant 30 minuts en condicions de normòxia i sotmès a I40R30. E. Exemple del registre de la pressió exercida pel ventricle esquerre d'un cor perfós durant 30 minuts en condicions de normòxia, sotmès a I40R30 i protegit amb blebbistatina.F. Exemple del registre de la pressió exercida

pel ventricle esquerre d'un cor perfós durant 30 minuts en condicions de normòxia i sotmès a I40R30 i reperfós amb tampó hiperosmòtic.

La Figura 29.A. representa els promitjos, el rang i la dispersió de la pressió sistòlica màxima exercida pel ventricle esquerre en els diferents protocols de perfusió salina. La Figura 29.B. representa els promitjos, el rang i la dispersió de la pressió de perfusió en els diferents protocols de perfusió salina.

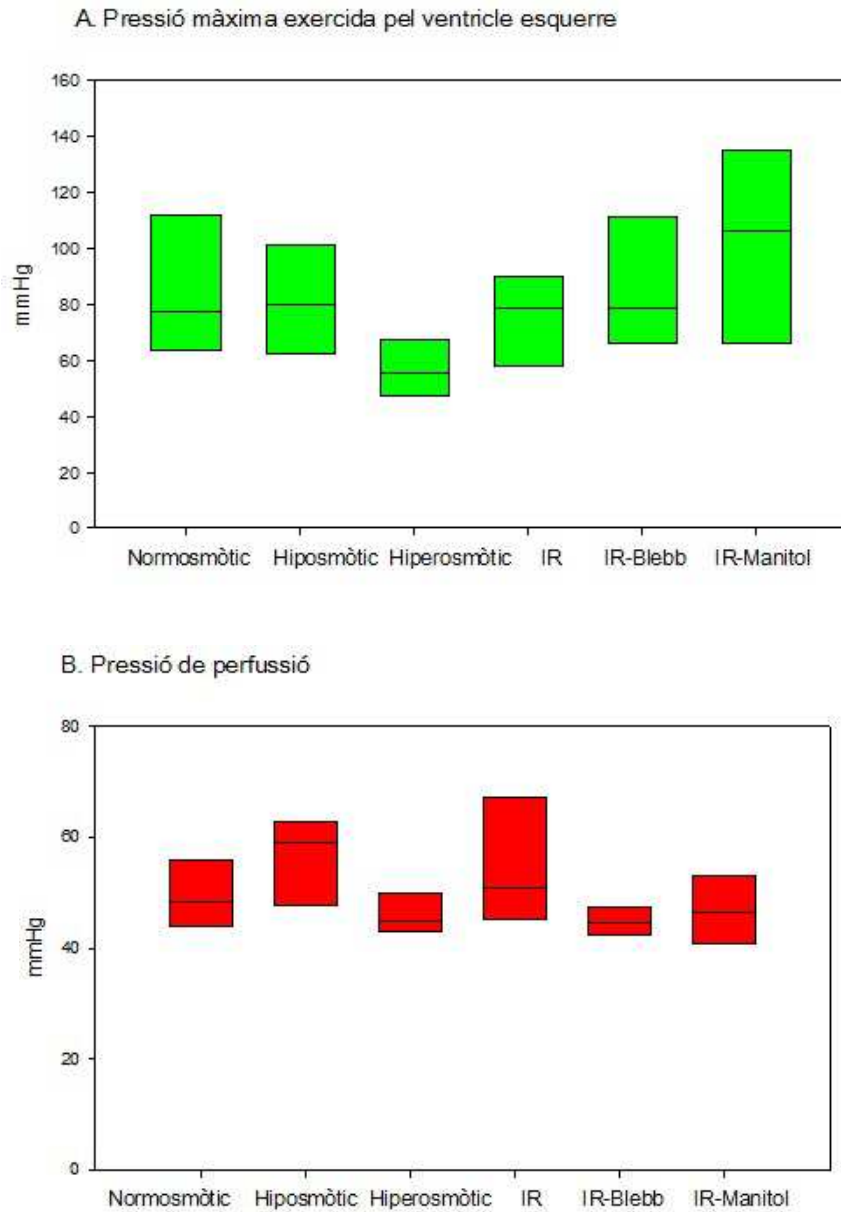


Figura 29.A. Pressió màxima exercida pel ventricle esquerre (mmHg) en els diferents protocols experimentals: Normosmòtic; Hiposmòtic; Hiperosmòtic; IR (Isquèmia 40- Reperfusió 30); IR Blebb (Isquèmia 40 – Reperfusió 30 protegits amb Blebbistatina; IR Manitol (Isquèmia 40- Reperfusió 30 protegits amb perfusió hiperosmòtica). Els Blots expressen el promig i dispersió (rang).

Figura 29.B. Pressió de perfusió administrada (mmHg) en els diferents protocols experimentals: Normosmòtic; Hiposmòtic; Hiperosmòtic; IR (Isquèmia 40- Reperfusió 30); IR Blebb (Isquèmia 40 – Reperfusió 30 protegits amb Blebbistatina; IR Manitol (Isquèmia 40- Reperfusió 30 protegits amb perfusió hiperosmòtica). Els Blots expressen el promig i dispersió (rang).

4.3 Experiments en cor de rata *in vivo*

Els quatre cors procedents d'estudis *in vivo*, de les rates a qui s'havia administrat una perfusió de gadolini per via intravenosa, van poder ser utilitzats per l'anàlisi. Cap dels animals va presentar arítmies cardíques, alteracions electrocardiogràfiques ni problemes relacionats a l'administració de Gd. El contingut d'aigua dels cors *in vivo* ha estat (expressat en mL/100g de teixit sec): aigua total: 335 ± 5.3 , aigua extracel·lular 79 ± 10 , aigua intracel·lular: 257 ± 8.4 [Taula 3, Figura 30].

4.4 Distribució de l'aigua al model de cor de rata

Als cors sotmesos a perfusió salina amb tampons amb diferent osmolaritat s'observa un increment notable del contingut d'aigua total respecte el cor intacte (406 vs 336, $p < 0.001$, mL/100g de teixit sec). Aquest increment d'aigua era a expenses del compartiment extracel·lular (152 vs 79, $p < 0.01$, mL/100g de teixit sec) [Taula 3, Figura 30].

Aquest augment en el contingut d'aigua extracel·lular és similar en els tres grups de perfusió salina, respecte el cor intacte, independentment de la osmolaritat del tampó de perfusió (152 – 144 – 172 mL/100g de teixit sec, $p=ns$) [Taula 3 i Figura 30]

Els cors perfosos amb sèrum hiposmòtic, amb baix contingut de clorur de sodi s'observa un increment addicional de l'aigua total (406 vs 444, $p < 0.01$, mL/100g de teixit sec) a expenses del compartiment intracel·lular (254 vs 300, $p < 0.01$, mL/100g de teixit sec) [Taula 3, Figura 30].

Contràriament, perfondre els cors amb sèrum hiperosmòtic enriquit amb manitol, causa una reducció molt significativa de l'edema total (406 vs 361, $p < 0.01$, mL/100g de teixit sec) a expenses del compartiment intracel·lular (254 vs 189, $p < 0.01$, mL/100g de teixit sec) i malgrat un lleu increment del compartiment de l'extracel·lular (152 vs 172, $p = n.s.$, mL/100g de teixit

sec) [Taula 3, Figura 30], de manera que el contingut d'aigua total dels cors perfosos amb tampó hiperosmòtic tendeix al del cor intacte.

Taula 3. Distribució de l'aigua en el cor perfós segons les condicions del tampó de perfusió (promitjos ± error estàndard).

	Aigua total	Aigua extracel·lular	Aigua intracel·lular
Cor intacte	336 ± 5.3	79 ± 10	257 ± 8.4
Normosmòtic 40'	406 ± 6.5	152 ± 5.6	254 ± 13.1
Hiposmòtic 40'	444 ± 2.1	144 ± 5.7	300 ± 7.9
Hiperosmòtic 40'	361 ± 4.0	172 ± 6.6	189 ± 5.3

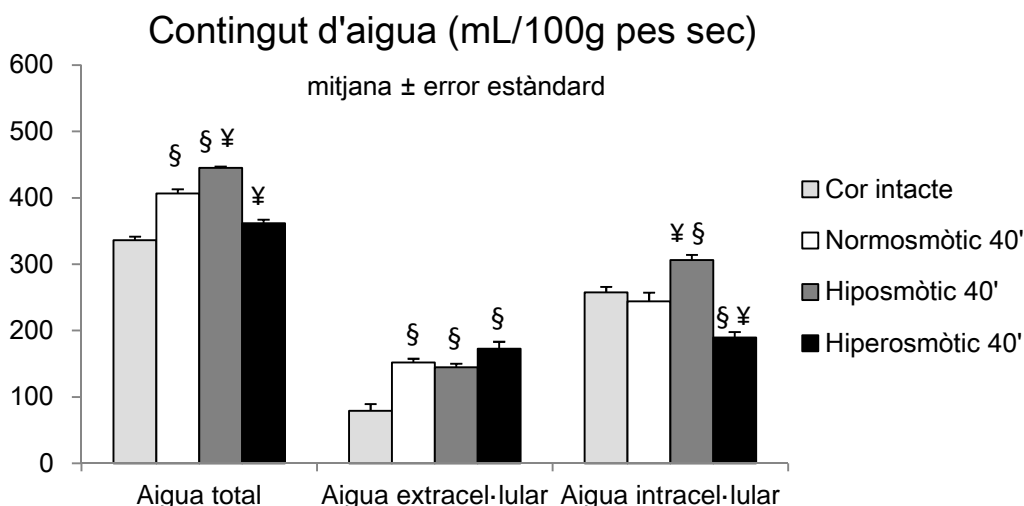


Figura 30. Gràfica on es representa el contingut d'aigua del cor i la seva distribució entre els compartiments intra i extra-cel·lulars (promitjos ± error estàndard).

Els cors sotmesos a isquèmia-reperfusió presenten un increment molt notable del contingut total d'aigua respecte els cors perfosos en normòxia (539 vs 406mL/100g de teixit sec, $p < 0.05$). Aquest increment en el contingut hídic és a expenses de l'expansió de l'espai accessible al gadolini, definit com aigua extracel·lular (353 vs 152 mL/100g de teixit sec, $p < 0.001$) [Taula 4 i Figura 31]. Els cors protegits del dany per isquèmia reperfusió mitjançant la inhibició de la hipercontractura amb blebbistatina presenten un contingut i distribució de l'aigua molt semblant als cors "control" (cors perfosos durant 40 minuts amb tampó isosmòtic): Aigua

total: 414 vs 406mL/100g de teixit sec (p: n.s.), Aigua extracel·lular: 142 vs 152mL/100g de teixit sec, Aigua intracel·lular 272 vs 254mL/100g de teixit sec) [Taula 4, Figura 31]. Així mateix, els cors protegits del dany per isquèmia reperfusió mitjançant la prevenció de l'edema intracel·lular amb tampó hiperosmòtic mostren una distribució d'aigua preservada respecte els cors perfosos amb manitol no sotmesos a isquèmia reperfusió (374 vs 361; 159 vs 172 ; 214 vs 189, p= n.s.); aquests cors, comparats amb els sotmesos a isquèmia reperfusió sense mesures de protecció, presenten menor contingut d'aigua total (374 vs 539, p< 0.001) a expenses de l'espai accessible al gadolini definit com espai extracel·lular (159 vs 353, p < 0.001) [Taula 4, Figura 31].

Taula 4. Distribució de l'aigua en el cor perfós: control (Normosmòtic 40 minuts) i els diferents protocols d'IR (promitjos± error estàndard).

	Aigua total	Aigua extracel·lular	Aigua intracel·lular
Normosmòtic 40'	406 ± 6.5	152 ± 5.6	254 ± 13.1
IR	539 ± 19.0	353 ± 32.5	191 ± 16.8
IR-blebbistatina	414 ± 3.6	142 ± 9.6	272 ± 7.2
IR-manitol	374 ± 9.9	159 ± 8.9	214 ± 8.9

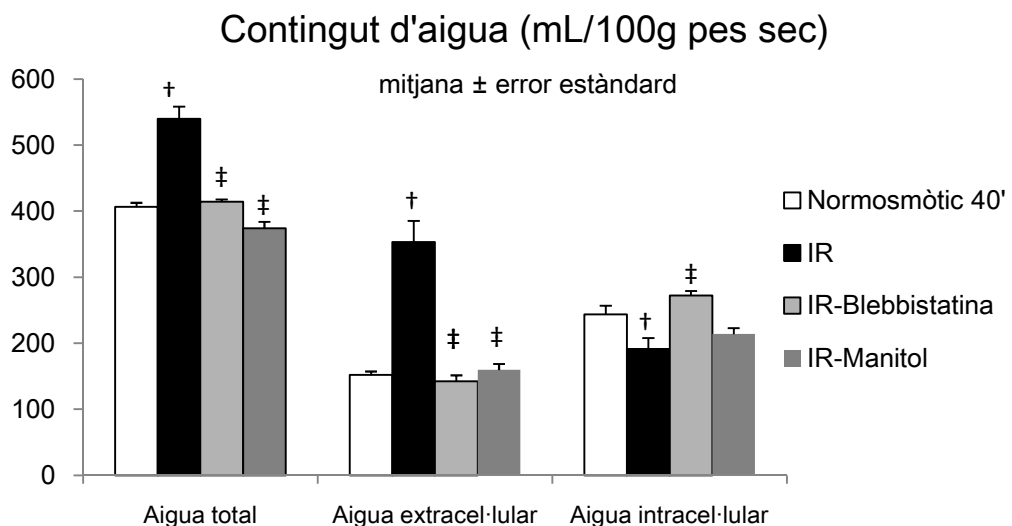


Fig 31. Gràfica on es representa el contingut d'aigua del cor i la seva distribució entre els compartiments intra i extra-cel·lulars (promitjos± error estàndard).