

Efecto del Manitol sobre el Curso Temporal de las Concentraciones de Óxido Nítrico Plasmático, en Pacientes Pediátricos sometidos a Corrección Quirúrgica de sus Cardiopatías.

Dr. Juan Vargas Mancilla¹, Dr. Ramón Risco Delgado², Perf. Sebastián López Sánchez³, Dr. Marco A. Juárez-Oropeza⁴, Dr. Juan C. Díaz-Zagoya⁵.

¹Hospital Gineco-Pediatría Centro Médico Nacional del Bajío León Gto. (IMSS), México. Enfermedades Cardiovasculares, Fundación Carolina, España, ²Grupo CryoBio Tech, Universidad de Sevilla, España, ³Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, España, ⁴Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, ⁵Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de Tabasco, México.

Correspondencia: Juan C. Díaz-Zagoya. Facultad de Medicina UNAM, Circuito escolar s/n, Ciudad Universitaria, D.F.; P.O. 70-159, Ciudad Universitaria 04510, México, DF. Correo electrónico: zagoya@servidor.unam.mx

ABSTRACT

Objetivo: To evaluate the behavior of plasma nitric oxide (NO) and its modifications during myocardial ischemia-reperfusion, in cardiopaties of pediatric patients subjected to corrective surgical procedures, after the administration of mannitol.

Study desing: Thirty patients were distributed in three groups of ten each. Five samples of arterial blood were obtained from each patient: 1) at the moment of anesthesia induction, 2) ten min after the onset of cardiopulmonary bypass (CPB), 3) immediately after myocardial reperfusion, 4) fifteen min prior CPB termination and 5) upon patient arrival to the intensive pediatric care unit. Group I (control) did not receive mannitol. Group II received 0.5 g/Kg mannitol at the initial filling up of the artificial oxygenator of the CPB machine. Group III received 0.5 g/Kg of mannitol at the initial filling up the artificial oxygenator of the CBP machine, plus 0.5 g/Kg of mannitol five min prior to unclamping the aorta. NO was assayed by diazotization reaction (Griess reaction)

Results: Plasma NO levels showed a definite tendency to be higher during the whole surgery in group I. However, in groups II and III the administration of mannitol maintained lower plasma levels of NO during surgery, specially when mannitol was administered at the initial filling up of the artificial oxigenator of the CPB machine and five minutes prior to unclamping the aorta.

Conclusion: The participation of the NO in the myocardial damage due to ischemia-reperfusion constitutes an additional element in the oxidative stress of pediatric patients recieving corrective surgical treatment. Mannitol administration reduced plasma NO levels; therefore, it should be useful in pediatric patients undergoing myocardial corrective surgery.

Key words: Nitric oxide, Cardiopulmonary bypass, Ischemia-reperfusion, Oxygen free radicals.

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el efecto del manitol sobre el curso temporal de las concentraciones de óxido nítrico, en pacientes pediátricos sometidos a corrección quirúrgica de su cardiopatía.

Métodos: Se estudiaron 30 pacientes que se distribuyeron en 3 grupos de 10. Se obtuvieron 5 muestras de sangre arterial de cada paciente: 1) en el momento de la inducción anestésica, 2) diez minutos después de iniciar la derivación cardiopulmonar (DCP), 3) inmediatamente después de la reperusión miocárdica, 4) quince minutos antes de terminar la DCP y 5) después de que el paciente llegó a la unidad de terapia intensiva pediátrica. Grupo I (control) no recibieron manitol. Grupo II recibieron 0.5 g/Kg de peso corporal de manitol en el llenado del oxigenador de la máquina de DCP. Grupo III, recibieron 0.5 g/kg de peso corporal de manitol en el llenado del oxigenador más 0.5 g/Kg de peso corporal 5 minutos antes de despinzar la aorta. Se determinó el NO por ensayo de diazotización (Reacción de Greiss).

Resultados: Los niveles de NO en plasma, aumentaron durante la cirugía en el grupo I. Sin embargo en los grupos II y III, la administración de manitol disminuyó los niveles plasmáticos de NO y éstos se mantuvieron bajos durante toda la cirugía, en especial en el grupo III que recibió el manitol en el momento que se llenó el oxigenador de la máquina de DCP y otra dosis cinco minutos antes de despinzar la aorta.

Conclusión: La participación del NO en el mecanismo de daño celular, en la isquemia-reperusión miocárdica, constituye un elemento más en el estrés oxidativo. La administración de manitol disminuye los niveles de NO, por lo que su administración puede ser benéfica para los pacientes que son expuestos a isquemia-reperusión miocárdica durante la corrección quirúrgica de su cardiopatía.

Palabras clave: Óxido Nítrico, Derivación Cardiopulmonar, Isquemia-reperusión, Radicales libres de oxígeno.

ABREVIATURAS

DCP: Derivación Cardiopulmonar
 NO: Óxido Nítrico
 ATP: trifosfato de adenosina
 NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
 NAD⁺: dinucleótido
 NOO⁻: nitrito.
 ONOO⁻: peroxinitrito
 NOS: óxido nítrico sintasa
 AMP: monofosfato de adenosina

ABBREVIATIONS.

DCP: Cardiopulmonary Bypass
 NO: Nitric Oxide
 ATP: Adenosin triphosphate
 NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
 NAD⁺: Dinucleotide
 NOO⁻: Nitrite.
 ONOO⁻: Peroxynitrite
 NOS: nitric oxide sintase
 AMP: adenosine monophosphate

En condiciones aeróbicas, las dos vías metabólicas principales del cardiomiocito son la beta oxidación de ácidos grasos, que aporta 2/3 del trifosfato de adenosina (ATP) y la oxidación de la glucosa, que representa 1/3 del ATP producido en la célula¹.

En los procesos de isquemia se altera el balance entre la producción y el consumo de ATP, cambiando gradualmente de un metabolismo aeróbico a una glucólisis anaeróbica, en un intento por mantener los niveles de ATP miocárdico.

Al presentarse una actividad mitocondrial disminuida, se acumulan intermediarios glucolíticos, así como óxido nítrico (NO). Para esto, en un primer paso el nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) aporta dos electrones y un nitrógeno del grupo guanidino de la arginina sufre oxidación al aportar dos electrones y, en un segundo paso el NADPH aporta un electrón y la N^ω-hidroxiarginina sufre una oxidación al perder tres electrones² para formar citrulina y nitrito (NOO⁻).

Para regenerar las reservas limitadas de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺), que aseguren la continuidad de la glucólisis, el piruvato es transformado a lactato, desarrollándose progresivamente una acidosis intracelular³.

Al declinar la concentración de ATP se desencadena una cascada de fenómenos, como: el aumento de difosfato de adenosina (ADP), monofosfato de adenosina (AMP) y pirofosfato; la bomba de Na⁺/K⁺ se afecta, aumentando la concentración intracelular de Na⁺/Ca²⁺. El exceso de calcio intracelular interfiere con la capacidad de las mitocondrias de generar ATP¹.

En el proceso de isquemia-reperfusión al aumentar los niveles de óxido nítrico (NO) se puede favorecer el fenómeno de aturdimiento miocárdico, el que se ha asociado a una producción elevada de peroxinitrito (ONOO⁻) El mecanismo propuesto para la generación de ONOO⁻ en los procesos de isquemia-reperfusión, consiste en una producción inicialmente aumentada de NO durante la isquemia, que de prolongarse, la óxido nítrico sintasa (NOS) puede reducir el O₂ para formar O₂^{·-}, que reaccionará con NO para formar ONOO⁻. Esta molécula a su vez genera radicales de dióxido de nitrógeno e hidroxilo⁴, oxidantes muy nocivos^{5,6,7}. El ONOO⁻ tiene actividad inflamatoria importante, estimula la ciclooxigenasa e in-

hibe la prostaciclina sintasa⁴. Estos fenómenos podrían ser de menor cuantía al aumentar la disponibilidad del sustrato de la NOS (L-Arginina). Sin embargo, una producción excesiva de NO, que es susceptible de provenir de una síntesis no enzimática⁸, se ha descrito en situaciones de estrés oxidativo, con valores de pH bajos y gran capacidad reductora⁹.

El objetivo de esta investigación fue determinar, en pacientes pediátricos sometidos a corrección quirúrgica de su cardiopatía, las modificaciones del NO plasmático durante la fase de reperfusión miocárdica luego de la aplicación de manitol al finalizar la isquemia inducida por el pinzamiento de la aorta.

PACIENTES Y MÉTODOS.

Este estudio se llevó a cabo en 30 pacientes, con un intervalo de edades entre 5 días y 5 años, todos ellos con diagnóstico de cardiopatía congénita tipo cianógena.

El consentimiento informado para la participación de estos pacientes en el estudio, fue firmado por sus padres, autorizando la obtención de 5 muestras de sangre arterial, en diferentes etapas del acto quirúrgico. Este estudio fue aprobado por el comité de ética del hospital pediátrico del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, donde se desarrolló, respetando las recomendaciones internacionales sobre investigación clínica (Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial). Todos los pacientes se sometieron a corrección quirúrgica de su cardiopatía con la utilización de derivación cardiopulmonar (DCP), provocando en ellos isquemia miocárdica por pinzamiento de la aorta, por un tiempo mínimo de 30 min. Se tomaron 5 muestras de sangre arterial por cada paciente. La primera muestra se tomó después de la inducción anestésica de la arteria radial, la segunda muestra diez minutos después de iniciar la DCP; ésta y la cuarta muestra fueron tomadas directamente de la línea arterial del oxigenador artificial de la DCP. La tercera muestra fue tomada directamente de la raíz de la aorta inmediatamente después de despinzar ésta, en el momento de la reperfusión miocárdica; la cuarta muestra se tomó quince minutos antes de terminar la DCP y finalmente, la quinta muestra se tomó de la arteria radial, justo después de que el paciente llegó a la unidad de terapia intensiva pediátrica.

Grupo		Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
		(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
I Control	X	4.64	4.9	5.34	5.24	5.15
	DS	1.98	2.05	2.10	1.91	1.94
	Mediana	5.17	5.34	2.96	5.77	5.52
II Manitol 1	X	3.47	3.09 *	3.39 *	3.16 **	3.36 **
	DS	2.487	1.92	2.10	1.41	1.17
	Mediana	2.89	2.48	2.96	2.73	2.99
III Manitol 2	X	4.62	3.55	3.81	3.80 +	3.52 *
	DS	2.31	1.65	1.22	1.394	0.75
	Mediana	5.15	3.25	3.98	3.65	3.31

Tabla 1: Los valores se expresaron en μM de NO en las muestras. Las diferencias significativas se contrastan con el grupo control, mediante la prueba LSD. $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ + $P = 0,053$. Efecto del manitol sobre el curso temporal de la concentración plasmática del NO.

Los pacientes fueron distribuidos en tres grupos de diez, el grupo I, el control, no recibió manitol en ningún momento de la cirugía. El grupo II recibió 0.5 g/Kg de peso corporal de manitol al 20% en el purgado inicial del oxigenador artificial de la DCP. El grupo III recibió 0.5 g/Kg de peso corporal de manitol en el purgado inicial del oxigenador artificial y otra vez 0.5 g/Kg de peso corporal de manitol cinco minutos antes de despinzar la aorta.

El NO se determinó en el plasma a través de su producto de degradación, los nitritos, por medio del ensayo de diazotización (Reacción de Greiss) previa reducción de los nitratos, utilizando gránulos de cadmio 20 mesh, activados en sulfato de cobre al 5%. (Kit for Nitrite determination G-7921, Molecular Probes) ¹⁰

Las determinaciones se realizaron por espectrofotometría a 548 nm, contra estándar.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La distribución de los resultados fue evaluada por las pruebas de asimetría y Kurtosis utilizando el paquete estadístico SPSS v 10.0. Las diferencias entre los grupos fueron evaluadas por análisis de varianza (ANOVA) de una vía, utilizando la prueba LSD como análisis post Hoc. Las diferencias con valores de $p \leq 0,05$ fueron consideradas como estadísticamente significativas.

RESULTADOS

En la determinación de NO, los valores basales del NO en plasma, de todos los pacientes, se encontraron en el intervalo entre 1.19 y 9.70 mM, con una media de 4.25 mM.

En el grupo control (I), sin manitol, se observó una tendencia a aumentar el NO, durante todo el acto quirúrgico, alcanzando su valor máximo en el momento de la reperfusión miocárdica. En el grupo II (Manitol-1), que recibió una sola administración de manitol, se observó una disminución de los valores del NO con respecto al valor basal, presentando un leve aumento en el momento de la reperfusión, pero sin llegar a alcanzar el valor basal, habiendo una clara tendencia a la disminución hasta el momento de que los pacientes llegaron a la unidad de terapia intensiva. Los valores de todas las muestras de este grupo fueron significativamente menores que los del grupo control I ($p < 0.05$) (Tabla 1).

El grupo III (Manitol-2), que recibió 0.5 g/Kg de peso corporal de manitol en el purgado inicial del oxigenador artificial de la DCP, y luego una vez más 0.5 g/Kg de peso corporal cinco minutos antes de despinzar la aorta, mostró niveles plasmáticos de NO por abajo del nivel basal, con una tendencia a mantener niveles bajos en forma sostenida, comparativamente con los valores del grupo control; sin embargo, sólo en la muestra 5 hubo una diferencia significativa ($P \leq 0.014$) y en la muestra 4 una diferencia marginal ($P \leq 0.053$) (Tabla 1).

DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue evaluar las modificaciones del NO del plasma, al aplicar manitol durante el proceso de isquemia-reperfusión miocárdica, causado por el pinzamiento de la aorta, en pacientes pediátricos que recibieron tratamiento quirúrgico de su cardiopatía. Datos en la literatura indican que en el proceso de isquemia-reperfusión, en adultos, se induce una alta generación de radicales li-

bres de oxígeno¹¹. Estas especies incluyen: anión superóxido, radical hidroxilo y peróxido de hidrógeno, que interactúan con los componentes lipídicos de la membrana celular siendo indicativos de cambios intra y extracelulares de Na^+ y K^+ , permitiendo un incremento en la entrada de Ca^{2+} en el sarcolema, que conlleva a un descontrol en la homeostasis del Ca^{2+} mitocondrial^{12,13}. Se produce daño funcional y ultraestructural en la mitocondria durante el curso de la isquemia^{14,15,16} en periodos entre 10 y 15 min, decreciendo la actividad del complejo I de la cadena respiratoria¹⁶. La demanda del aparato de fosforilación incluye el complejo V¹⁶, y la translocación de nucleótidos de adenina ocurre durante la isquemia¹⁷. Sin embargo, el rol oxidativo mitocondrial y la función de contracción cardiaca se recupera después de los periodos cortos de isquemia¹⁸. Si este proceso se prolonga entre 30 y 45 min, la lesión del miocito es irreversible¹⁴.

En los procesos de isquemia ocurre lesión de los tejidos, se produce un infiltrado de neutrófilos, los cuales poseen ONS inducible, se generan cantidades elevadas de NO, lo que puede provocar citotoxicidad, en lugar de citoprotección por una inhibición de las ferrosulfoproteínas de la cadena respiratoria¹⁹. Todo esto hace disminuir aun más la ya limitada cantidad de energía de los cardiomiocitos y como consecuencia la función contráctil del corazón²⁰.

En el miocardio las células se encuentran conectadas entre sí, las uniones por canales intracelulares favorecen el paso de iones y metabolitos que juegan un papel clave en el que la hipercontractura celular puede propagarse de célula a célula produciendo necrosis en los procesos de isquemia-reperfusión²¹.

Los resultados del grupo control muestran una elevación progresiva en la producción de NO, con respecto a su valor basal, durante toda la cirugía y hasta el momento en que el paciente llega a la unidad de cuidados intensivos. Es posible que este efecto se dé como respuesta del miocardio al estrés oxidativo, por la liberación de especies reactivas del oxígeno, y a los efectos de hipercontractura generada por los canales intracelulares que favorecen el paso de iones y metabolitos. Al elevarse la producción de NO, como respuesta compensatoria se produce vasodilatación y así limita la lesión por hipercontractura, mejorando la perfusión y el aporte de oxígeno al miocardio sometido a daño por isquemia-reperfusión y estrés quirúrgico.

La necrosis por hipercontractura afecta a grupos celulares que tienen su estructura muy dañada y rotura del sarcolema, esto da lugar al patrón histopatológico denominado necrosis en bandas de contracción^{21,22}. El bloqueo selectivo de los canales intracelulares en modelos experimentales de perfusión miocárdica, resultó una maniobra con efectos muy favorables para evitar la propagación de la necrosis²³.

Powell, et al., reportaron que el manitol reduce los requerimientos de oxígeno en corazones isquémicos, produciendo una dilatación colateral de los vasos, aumentando el flujo de sangre a través de la región miocárdica isquémica. Bajo condiciones de isquemia inducida por reducción prolongada de perfusión coronaria, el manitol atenúa la resistencia vascular progresiva²⁴.

El comportamiento del NO en el grupo III, que recibió 0.5 g/Kg de peso corporal de manitol en el purgado inicial del oxigenador artificial de la DCP, así como otros 0.5g/Kg de peso corporal 5 min antes de despinzar la aorta, muestra niveles plasmáticos de NO por abajo del valor basal, con ligero incremento en el periodo de reperfusión, pero manteniéndose bajos hasta el momento en que el paciente llega a la unidad de cuidados intensivos. Sin embargo sólo en los dos tiempos finales las diferencias son significativas con respecto al grupo control (I).

Los resultados de este estudio nos indican que el comportamiento del NO plasmático, durante el proceso quirúrgico y en especial en el periodo de reperfusión miocárdica, se ve influenciado por el efecto vasodilatador que tiene el manitol, el cual atenúa las resistencias vascular y miocárdica en forma constante, contribuyendo a que la generación del NO sea menor y se mantenga por abajo del valor promedio inicial, con la posible disminución en forma importante del fenómeno de hipercontractura, que conlleva a necrosis celular. En esta forma mejora la reperfusión miocárdica y disminuye el daño causado por los radicales libres de oxígeno.

Durante el periodo de isquemia previo a la reperfusión, se produce la acumulación de metabolitos derivados del metabolismo anaeróbico. El intercambio de Na^+ - H^+ incrementa la carga de Na^+ intracelular²⁵. En el proceso de reperfusión al ser barridos los metabolitos del espacio extracelular y el exceso de Na^+ del espacio intracelular, se establece un gradiente favorable al paso del agua al espacio intracelular, favoreciendo el desarrollo de edema²⁶. Aunque por este efecto no produzca necrosis, sí provoca un estrés añadido a las estructuras celulares que se ven debilitadas por la isquemia precedente²⁷. Observaciones hechas en cardiomiocitos aislados, muestran que el efecto del estrés osmótico condiciona la disrupción del sarcolema en las células que participan en la hipercontractura, que se han sometido previamente a disminución energética prolongada²⁷. Los reportes de estudios en los que la reperfusión se llevó a cabo en presencia de soluciones hiperosmóticas muestran que se ha conseguido limitar la muerte celular^{26,28}.

En conclusión, los valores plasmáticos de NO al aplicar 0.5 g/Kg de peso corporal de manitol (2.72 mmol/Kg) sobre todo en el purgado inicial del oxigenador de la DCP y 0.5 g/Kg de peso corporal 5 min antes de despinzar la aorta, en pacientes pediátricos sometidos a corrección

quirúrgica de su cardiopatía, contribuye a disminuir el daño provocado por reperfusión miocárdica, manteniendo niveles bajos de NO plasmático, incrementando el flujo coronario y disminuyendo el edema miocárdico por tratarse de una solución hiperosmolar.

REFERENCIAS

- 1.- Iliana Cabrera Rojo. Cardioprotección: un triunfo de la biomedicina del siglo XX. Rev Cubana Invest Biomed 1999;18(2):146-150.
- 2.- Mascher D, Paredes Carvajal MA. Óxido nítrico: propiedades bioquímicas y efectos biológicos, Capítulo 40. En: Díaz Zagoya JC y Juárez Oropeza MA, Bioquímica, 3ª. Edic. McGraw Hill Interamericana, México D.F, 2006 (en prensa)
- 3.- Opie L H, Owen P, Thomas M, Samson R. Coronary sinus lactate measurements in assessment of myocardial ischemia comparison with changes in lactate-pyruvate and beta-hydroxybutyrate-acetoacetate ratios and with release of hydrogen, phosphate and potassium ions from the heart. Am J Cardiol 1973;32: 295-305.
- 4.- Beckman J S. \cdot OONO: rebounding from nitric oxide. Circ Res 2001;89:295-297
- 5.- Huk I, Nanobashvili J, Neumayer C, Punza, Mueller M A. L-Arginine treatment alters the kinetics of nitric oxide and superoxide release and reduces ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. Circulation 1997;96:667-675
- 6.- Cooke J P, Dzau V J. Derangements of the nitric oxide synthase pathway, L-Arginine, and cardiovascular diseases. Circulation 1997;379-382
- 7.- Lipton S A. Distinctive chemistries of non- related species. Neurochem Int 1996;29(2):111-114
- 8.- Casino P R, Kilcoyne C M, Quyyumi A A, Hoeg J M, Panza J A. Investigation of decreased availability of nitric oxide precursor as the mechanism responsible for impaired endothelium-dependent vasodilatation in hypercholesterolemic patients. J Am Coll Cardiol 1994;23(4):844-850
- 9.- Chowienzyk P, Ritter J. Arginine: NO more than a simple aminoacid? Lancet 1997;350:901-902
- 10.- Green L-C, Wagner D-A, Glogowski J, Skipper P.L, Wishnok J-S, Tannen Baum S-R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. Anal Biochem 1982;126:131-138
- 11.-Larsen M, Webb G, Kenington S, Kelleher N, Sheppard J, Unsworth White J. Mannitol in cardioplegia as an oxygen free radical scavenger measured by malondialdehyde. Perfusion 2002;17:51-55
- 12.- Hearse D J, Yamamoto F, Shattock M J. Calcium antagonists and hypothermia: the temperature dependency of the negative inotropic and anti-ischemic properties of verapamil in the isolated rat heart. Circulation 1984;70:154-164
- 13.- Fleckenstein A, Frey M, Fleckenstein Grun G. Consequences of uncontrolled calcium entry and its prevention with calcium antagonist. Eur Heart J 1983;4 SupplH:43-50
- 14.- Lesnefsky E J, Tandler B, Ye J, Slabe T J, Turkaly J, Hoppel C L. Myocardial ischemia decreases oxidative phosphorylation through cytochrome oxidase in subsarcolemmal mitochondria. Am J Physiol 1997;273:H1544 – H1554.
- 15.- Piper H M, Sezer O, Schleyer M, Schwartz P, Hutter J F, Spieckermann P G, Development of ischemia-induced damage in defined mitochondrial subpopulations. J Mol Cell Cardiol 1985;17:885-896.
- 16.- Rouslin W. Mitochondrial complexes I, II, III, IV and V in myocardial ischemia and autolysis. Am J Physiol 1983; 244: H743–H748.
- 17.- Asimakis G K, Conti V R. Myocardial ischemia: correlation of mitochondrial adenine nucleotide and respiratory function. J Mol Cell Cardiol 1984;16:439-447.
- 18.- Flameng W, Andres J, Ferninande P, Mattheussen M, Van Belle H. Mitochondrial function in myocardial stunning J Mol Cell Cardiol 1991;23:1-11
- 19.- Mohri M, Egashira K, Tagawa T, Kuga T, Tagawa H, Harasawa Y, Shimokawa H, Takeshita A.. Basal release of nitric oxide is decreased in the coronary circulation in patients with heart failure. Hypertension 1997;30:50-56
- 20.- Dusting G J. Nitric Oxide in coronary artery disease: roles in atherosclerosis myocardial reperfusion and heart failure. EXS 1996;76:33-55
- 21.- Ganote C E. Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury. J Mol Cell Cardiol 1983;15:67-73.
- 22.- Solares J, García Dorado D, Oliveras J, Gonzalez M A, Ruiz Meana M, Barrabes J A, Gonzalez Bravo C, Soler Soler J: Contraction band necrosis at the lateral borders of the area at risk in reperfused infarcts. Observations in a pig model of in situ coronary occlusion. Virchows Arch 1995;426:393-399
- 23.- García Dorado D, Inserte J, Ruiz Meana M, Gonzalez M A, Solares J, Julia M, Barrabes J A, Soler Soler J. Gap Junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion. Circulation 1997;96:3579-3586
- 24.- Powell W J Jr, DiBona D R, Flores J, Frega N, Leaf A. Effects of hyperosmotic mannitol in reducing ischemic cell swelling and minimizing myocardial necrosis. Circulation 1976;53(Suppl 3):145-149
- 25.- Inserte J, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Solares J, Soler J. The role of $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ exchange occurring during hypoxia in the genesis of reoxygenation – induced myocardial oedema. J Mol Cell Cardiol 1997;29:1167-1175
- 26.- García-Dorado D, Oliveras J. Myocardial edema: a preventable cause of reperfusion injury? Cardiovasc Res 1993;27: 1555-1563

27.- Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Gonzalez M A, Barrabes J A, Soler-Soler J. *Effect of osmotic stress on sarcolemmal integrity of isolated cardiomyocytes following transient metabolic inhibition. Cardiovasc Res* 1995;30:64-69

28.- García-Dorado D, Theroux P, Muñoz R, Alonso J, Elizaga J, Fernández Aviles, Botas J, Solares J, Soriano J, Duran J M. *Favorable effects of hyperosmotic reperfusion on myocardial edema and infarct size Am J Physiol* 1992;262:H17-H22