



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**DIANAS TERAPÉUTICAS BASADAS EN EL
METABOLISMO MITOCONDRIAL PARA EL
TRATAMIENTO DE INFARTO DE MIOCARDIO**

Autor: Inés Turón Gómez

Tutor: Antonio Martínez Ruiz

Fecha: Julio 2020

Contenido

1. Resumen	3
2. Introducción	4
3. Objetivos	9
4. Metodología	9
5. Resultados y discusión.....	10
6. Conclusiones	16
7. Bibliografía	17

1. Resumen

Según la OMS, las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de mortalidad en todos los países del mundo, por delante del cáncer y las enfermedades infecciosas en muchos de ellos. La isquemia cardiaca que desemboca en la muerte de los cardiomiocitos es la principal consecuencia a corto plazo del infarto agudo de miocardio (IAM). Actualmente la reperfusión del miocardio isquémico es la única alternativa posible para la supervivencia de las células que se encuentran en esta situación de riesgo. Sin embargo, se ha descubierto que una parte de la muerte celular se precipita tras la reintroducción del flujo sanguíneo, y son las especies reactivas de oxígeno (ROS) mitocondriales las principales desencadenantes de la llamada lesión por isquemia-reperfusión (IR). En este trabajo se ha realizado una búsqueda bibliográfica de publicaciones científicas relacionadas con la actividad mitocondrial para estudiar los mecanismos subyacentes a la lesión por IR y las dianas terapéuticas hacia las que se dirigen los tratamientos que se están investigando. La masiva producción de ROS y la consecuente apertura de los poros de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) son el motor de la lesión por IR. Las estrategias terapéuticas van dirigidas a inhibir la oxidación de succinato en el complejo II y la reactivación del complejo I, y a estimular la apertura de los canales de K⁺ dependientes de ATP (KATP). A pesar de que son muchos los esfuerzos que se están realizando para desarrollar una terapia efectiva para prevenir la lesión derivada de la reoxigenación del miocardio, todavía no hay tratamientos disponibles en la práctica clínica estándar.

Palabras clave: isquemia miocárdica, reperfusión miocárdica, lesión por isquemia-reperfusión (IR), especies reactivas de oxígeno (ROS), poros de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP).

Abstract:

According to the WHO, cardiovascular diseases are one of the leading causes of death in all countries of the world, ahead of cancer and infectious diseases in many of them. Ischemic heart disease leading to the death of cardiomyocytes is the main short-term consequence of acute myocardial infarction (AMI). Currently, reperfusion of ischemic myocardium is the only possible alternative for cells to survive in that risky situation. However, it has been discovered that part of cell death is precipitated after the reintroduction of blood flow, and reactive oxygen species (ROS) are the main trigger of the ischemia-reperfusion injury (IR). In this paper we carried out a bibliographic search of scientific publications related to mitochondrial activity in order to study mechanisms underlying IR injury and therapeutic targets towards which treatments lead to. The massive production of ROS and the consequent opening of the mitochondrial permeability transition pores (mPTP) are the driving force behind IR injury. Therapeutic strategies lead to inhibit the oxidation of succinate and the reactivation of complex I, and stimulate the opening of ATP-sensitive potassium channel (KATP). Although many efforts are being made to develop an effective therapy to prevent IR injury from myocardial reoxygenation, there are still no treatments available in standard clinical practice.

Key words: myocardial ischemia, myocardial reperfusion, ischemia-reperfusion injury (IR), reactive oxygen species (ROS), mitochondrial permeability transition pores (mPTP).

2. Introducción

La enfermedad coronaria es una de las principales causas de muerte y de incapacidad, con predicciones epidemiológicas que apuntan a que su morbimortalidad superará en los próximos años a la del cáncer y las enfermedades infecciosas en todos los países del mundo. La muerte de los cardiomiocitos es la principal causa del impacto de la cardiopatía isquémica en la supervivencia y calidad de vida. Se produce de forma intensa durante el infarto agudo de miocardio (IAM) y la recanalización coronaria no suele ser capaz de prevenirla. El grado de extensión de la muerte celular depende no sólo de la extensión del área en riesgo, sino también de la severidad y duración de la isquemia. En los últimos años se han producido numerosos avances médicos, entre ellos el desarrollo de tratamientos capaces de restaurar el flujo sanguíneo en los pacientes con IAM, la llamada terapia de reperfusión. Sin embargo, aunque la reoxigenación es la única alternativa posible para la supervivencia de las células, una parte de la muerte celular se produce, paradójicamente, por la propia restauración del flujo sanguíneo. Este fenómeno, conocido como daño por reperfusión o lesión por isquemia-reperfusión (IR), se inicia con el daño oxidativo por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que conducen a la muerte celular (1). La disfunción mitocondrial se encuentra en el foco de la lesión por IR, no solo siendo la principal fuente de producción de ROS sino también la diana principal del daño oxidativo (2).

El metabolismo cardíaco es predominantemente aeróbico. Sin embargo, en periodos de isquemia miocárdica severa se producen alteraciones que conducen a una actividad anaeróbica. Uno de los primeros desequilibrios iónicos que se producen durante la isquemia es el aumento sostenido de la concentración intracelular de Na^+ debido al fallo de la bomba Na^+/K^+ del sarcolema, que no puede operar en ausencia de energía, y a la acidificación progresiva del citosol por la puesta en marcha de la glucólisis anaeróbica, que activa el intercambiador de membrana Na^+/H^+ . Para compensar el exceso de Na^+ , este es extruído a través del intercambiador de membrana $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que no requiere energía para funcionar. Como consecuencia, se desencadena una sobrecarga de Ca^{2+} en el citosol ya que la falta de ATP hace que la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico no pueda funcionar. De esta forma, se inicia un proceso de pérdida progresiva del control del Ca^{2+} , uno de los cationes que en condiciones fisiológicas se encuentra más estrictamente regulado en el medio intracelular (1,2).

Por otro lado, la isquemia produce la inhibición de la fosforilación oxidativa, que disminuye el potencial de membrana mitocondrial y aumenta la ratio NADH/NAD^+ . Además, tiene lugar la acumulación de metabolitos. Son tres los que más se acumulan: hipoxantina, xantina y succinato. Los dos primeros lo hacen debido a la degradación del nucleótido de purina en respuesta a la acumulación de AMP por el ciclo del nucleótido de purina (PCN). Por su parte, el succinato podría tener varias fuentes, que posteriormente serán explicadas, y parece ser que es quien más se acumula (3). La acumulación de succinato es considerado una firma universal de la isquemia y ha sido propuesto como probable fuente de electrones para la formación de ROS durante la reperfusión (4).

En condiciones fisiológicas, los electrones derivados de la oxidación del NADH y FADH_2 producidos durante la oxidación de ácidos grasos y el ciclo del ácido cítrico entran en la cadena transportadora de electrones mitocondrial por los complejos I (NADH -ubiquinona oxidorreductasa) y II (succinato deshidrogenasa), respectivamente. Durante la oxidación del NADH por el complejo I, los electrones se transfieren desde el receptor de electrones primario, el flavin mononucleótido (FMN), a través de una cadena de grupos FeS hasta la ubiquinona (CoQ), portador de electrones hidrófobo de la membrana mitocondrial interna que se reduce a ubiquinol (QH_2) (5). Por otro lado, durante la oxidación del FADH_2 los electrones son

transferidos desde el complejo II también al CoQ. Destacar que este complejo cataliza la oxidación de succinato a fumarato por la acción de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH), mientras que los electrones derivados se transfieren al FAD que se reduce a FADH₂. A continuación, desde el CoQ los electrones se transfieren al complejo III (citocromo *c* ubiquinol oxidorreductasa) hasta alcanzar el complejo IV (citocromo *c* oxidasa) donde se ceden al oxígeno para formar H₂O. Esta transferencia de electrones está acoplada al bombeo de protones en los complejos I, III y IV hacia el espacio intermembrana, generando un gradiente electroquímico en la membrana mitocondrial interna. Finalmente, se generará ATP por la afluencia de estos protones de vuelta a la matriz mitocondrial a través del complejo V (F₀F₁-ATPasa) (6).

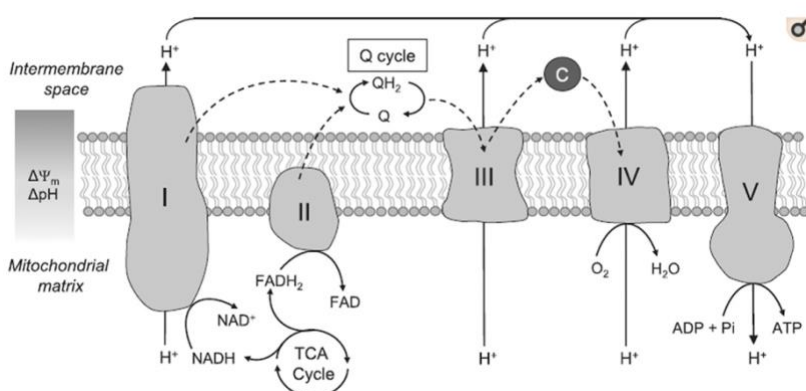


Figura 1. Cadena transportadora de electrones. Figura tomada de (2).

Una característica del complejo I es la capacidad de adoptar dos estados distintos: el llamado catalíticamente activo (A) y el estado inactivo (D). Se ha propuesto que, durante la isquemia, el complejo I sufre un cambio conformacional que altera su estado de actividad, fenómeno conocido como transición activo/inactivo (A/D) (3). Esta teoría defiende que el complejo I sufre una desactivación transitoria durante la isquemia, mientras que es rápidamente activado de nuevo con la restauración del flujo sanguíneo durante la reperfusión, lo que permite la producción de ROS.

En condiciones hipóxicas, los componentes redox mitocondriales que generalmente se oxidan sufren una reducción completa debido a la desaceleración de la actividad de la citocromo *c* oxidasa. Como consecuencia, se produce una acumulación de QH₂ que inhibe la actividad oxidorreductasa fisiológica del complejo I. En tales circunstancias el equilibrio en estado estacionario de la reacción A \leftrightarrow D se desplaza hacia la derecha y el complejo I se convierte en pocos minutos en la forma inactiva. El resultado de la desactivación es el bloqueo de la transferencia de electrones desde el complejo I al CoQ.

Los mecanismos y la fuerza impulsora detrás de la transición A/D todavía no están claros, pero se cree que un cambio conformacional del complejo I podría ser el responsable de la transición. Se observó que el cambio conformacional permitió que ciertas regiones de la subunidad ND3 del complejo I fuesen expuestas, en concreto la cisteína 39, que en condiciones normóxicas se encuentra ocluída. Tampoco está clara qué proporción del complejo I es desactivada: un experimento demostró que tras una incubación prolongada de la enzima inactiva a diferentes temperaturas, solo el 10% de la enzima permaneció en la forma A. El flujo lento de electrones a partir del NADH acumulado podría mantener la enzima parcialmente en el estado A, de modo que una pequeña parte del centro activo seguiría en funcionamiento (5,7).

La acumulación de succinato es un fenómeno muy característico de la isquemia. Sin embargo, el ciclo del ácido cítrico (CAC), la vía convencional de producción de succinato en condiciones normóxicas, parece no contribuir a la acumulación de succinato durante la isquemia. Algunos modelos experimentales han especulado que en condiciones anaeróbicas la SDH podría actuar en modo inverso, reduciendo el fumarato a succinato. Queda mucho por explorar sobre cómo se produce el suministro de fumarato a la SDH, pero la evidencia actual sugiere que el fumarato tendría principalmente dos fuentes de producción que serían activadas durante la isquemia, ambas extra-glucolíticas: el ciclo de nucleótido de purina (PNC) y la lanzadera de malato/aspartato (MAS).

En el PNC se produce la degradación del AMP acumulado durante la isquemia para generar adenilosuccinato, que es convertido a fumarato por la adenilosuccinato liasa (ASL). Su movimiento hacia la matriz mitocondrial ocurre indirectamente porque no hay un transportador específico de fumarato en la membrana mitocondrial interna. Para ello, el fumarato es convertido en malato por la fumarato hidratasa (FH) citosólica y tiene lugar un intercambio entre este y el succinato por el transportador dicarboxilato (DIC). Una vez en la matriz, el malato es convertido de nuevo en fumarato por la FH mitocondrial.

Por otro lado, a través de la MAS el aspartato es transaminado a oxalacetato (OAA), que posteriormente será reducido a malato. Esta reacción de reducción está catalizada por la malato deshidrogenasa (MDH) citosólica e impulsada por la acumulación de NADH. El malato fruto de esta reacción puede ser intercambiado por el DIC con el succinato y convertido a fumarato en el interior de la matriz (8).

La gran acumulación de succinato sugiere que este metabolito no puede procesarse más durante la isquemia. Una vez que el succinato ha sido formado en la matriz, este no puede ser convertido a succinil-CoA porque esta reacción es termodinámicamente desfavorable en esas condiciones, ya que la succinil-CoA sintasa, enzima que cataliza la conversión de succinil-CoA a succinato en el CAC, en modo inverso necesita GTP y CoA, y ambos están agotados en la isquemia. También se observó que el succinato del citosol junto con la alta concentración de ROS pueden estabilizar los factores inducibles por hipoxia (HIF) inhibiendo la degradación de su subunidad α , lo que conduce a la activación de una respuesta pseudohipóxica. Los HIF tienen como función incrementar la transcripción de genes cuyos productos son proteínas que participan en la angiogénesis, la eritropoyesis, la proliferación celular, la remodelación vascular y el metabolismo energético, permitiendo a la célula adaptarse a estas condiciones tan adversas. Además, el succinato extracelular puede activar el receptor GPR91 acoplado a proteínas G, que podría ser un sensor relevante que responde al succinato liberado en el espacio extracelular por muerte celular o lisis tras la isquemia (3,9).

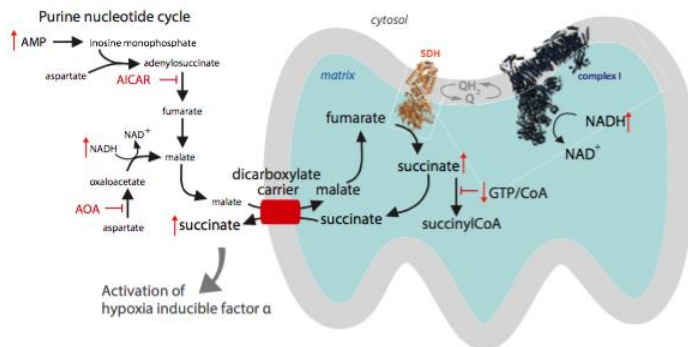


Figura 2. Mecanismos de acumulación de succinato durante la isquemia. Figura tomada de (4).

La actividad inversa de la SDH durante la isquemia se vería impulsada por el NADH isquémico acumulado, que cede sus electrones a través del complejo I al CoQ, ya que la parte del centro activo del complejo I que no ha sido desactivado permitiría el flujo lento de electrones a través de este complejo (3). El CoQ en estado reducido será oxidado por el complejo II, que opera en modo inverso a través de un proceso conocido como transporte inverso de electrones (RET). Durante el RET, los electrones derivados de la oxidación del QH₂ son aceptados por el fumarato, que se reduce a succinato (2). Como será explicado más adelante, el succinato isquémico será oxidado rápidamente por la SDH durante la reperfusión, actuando como fuente de electrones que permitirá la masiva formación de ROS, iniciando así la lesión por IR.

La reperfusión y la consecuente reenergización de las células que se encuentran en esta situación de riesgo tras haber sufrido un periodo de isquemia puede desencadenar un empeoramiento repentino del control catiónico, principalmente por la puesta en marcha de mecanismos dirigidos a corregir la acidosis intracelular, que acaban por empeorar aún más la sobrecarga citosólica de Na⁺. Con la llegada del flujo sanguíneo, se produce un lavado de los catabolitos del medio extracelular, fundamentalmente de H⁺, originándose un gradiente entre las células y su entorno que activa los mecanismos de corrección de acidosis intracelular, principalmente a través del intercambiador de membrana Na⁺/H⁺. Esta respuesta empeora todavía más la sobrecarga citosólica de Na⁺ que, de nuevo, es corregida por la célula activando el modo inverso del intercambiador Na⁺/Ca²⁺, expulsando Na⁺ y produciendo un influjo adicional de Ca²⁺. Como consecuencia de estos mecanismos de corrección, la célula reoxigenada acumula una gran cantidad de Ca²⁺, comprometiendo su propia supervivencia. La célula responde a estos desequilibrios iónicos a través de un mecanismo llamado hipercontractura, donde se produce la rotura de membranas celulares y la liberación del contenido celular al medio extracelular, principalmente de enzimas citosólicas, produciendo la muerte celular (1).

Aunque la hipercontractura por sí sola puede producir la rotura del sarcolema, existen otros mecanismos que también pueden contribuir al daño por reperfusión y a la consecuente muerte celular. Uno de los mecanismos que se ha propuesto recientemente es la pérdida de la integridad de las mitocondrias por un cambio brusco en la permeabilidad de sus membranas, fenómeno conocido como transición de permeabilidad mitocondrial (1). La reoxigenación de la célula durante la reperfusión y la rápida restauración del potencial de membrana resultan en un elevado flujo de calcio a la mitocondria, que junto con la gran producción de ROS y la normalización del pH, producen un cambio brusco en la permeabilidad de la membrana por la apertura de los poros de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) (4). Los mPTP son complejos multiproteicos ubicados en una membrana muy impermeable, la membrana mitocondrial, que tiene gradientes muy altos de iones entre ambos lados. Su función es conectar la matriz mitocondrial con el citosol y, aunque todavía no está clara la naturaleza del poro, estudios recientes sugieren que la F₀-F₁-ATPasa podría ser su mayor componente. La apertura prolongada de estos poros produce el colapso del potencial de membrana mitocondrial, la liberación del citocromo *c*, el agotamiento de las reservas de ATP y, finalmente, la muerte celular. Por ello, la apertura de los mPTP es un componente crítico en la patología por IR (2).

En condiciones normóxicas, once sitios mitocondriales distintos asociados con la oxidación de sustratos y la fosforilación oxidativa han sido propuestos como potenciales fuentes de ROS, cediendo electrones al oxígeno para formar superóxido o peróxido de hidrógeno. De ellos, los complejos I y III parecen ser las principales fuentes de síntesis (10,11). Las ROS bajo condiciones fisiológicas son producidas como un subproducto de la respiración mitocondrial y actúan como mediadores celulares esenciales en una gran variedad de procesos biológicos,

incluyendo la regulación del sistema inmune y la autofagia. No ocurre lo mismo durante la reperfusión del miocardio isquémico, donde la rápida reintroducción de oxígeno en las células conduce a una masiva generación de ROS, incapaz de ser neutralizada por los mecanismos antioxidantes endógenos. La gran producción de ROS induce la apertura de los mPTP, que conducen a los procesos apoptóticos y necróticos de muerte celular. Sin embargo, las ROS no solo son dañinas por su acción sobre los mPTP, sino que también producen daño oxidativo directo en componentes celulares, como lípidos, proteínas y DNA (2).

Recientemente se ha descubierto una forma de muerte celular dependiente de hierro, la ferroptosis. Durante la isquemia/reperfusión se produce una acumulación de hierro mitocondrial libre debido a su rápida conversión desde el grupo hemo, y el alto potencial oxidante del hierro produce la peroxidación lipídica de la membrana mitocondrial, que desencadena la acumulación de peróxidos lipídicos a niveles letales. Los mecanismos subyacentes a la acumulación de hierro y su toxicidad son todavía poco conocidos, pero se ha demostrado que la administración de quelantes de hierro podría disminuir su sobrecarga, reduciendo así el daño oxidativo (12). Actualmente son varias las vías de inhibición de la ferroptosis las que están siendo objeto de estudio, pero en este trabajo no nos centraremos en ellas.

La producción de ROS en la reperfusión surge de forma abrupta en forma de superóxido, quien puede por sí mismo causar daños, pero también actúa a través de la formación de peróxido de hidrógeno y otras especies reactivas. A pesar de que algunas líneas de investigación han ido dirigidas a caracterizar los mecanismos de generación de las especies reactivas de oxígeno durante la reperfusión, los mecanismos subyacentes son imprecisos y todavía no están claros. Se postula que el complejo I de la cadena transportadora de electrones es la principal fuente de superóxido en estas circunstancias a través del RET, por la reducción de los sitios de CoQ y FMN (3). Esta nueva actividad del complejo I que permite la producción de ROS se debe a que, tras la reintroducción del flujo sanguíneo, el complejo I sufre de nuevo un cambio conformacional que permite su transición de estado inactivo a activo. El centro activo de la enzima vuelve a estar libre, de modo que reanuda su actividad y permite el flujo de electrones (7).

La rápida oxidación del succinato acumulado durante la isquemia genera mucho QH₂, y en presencia de ubiquinona muy reducida (alta ratio QH₂/CoQ) y un gradiente alto de protones a través de los complejos III y IV, los electrones son forzados a volver desde el QH₂ al complejo I, reduciendo el NAD⁺ a NADH, ya que el citocromo *c* no es capaz de consumir todos los electrones suministrados desde el succinato isquémico. Para que el CoQ esté continuamente recibiendo electrones durante la reperfusión, se han tenido que sintetizar gran cantidad de equivalentes reducidos durante la isquemia. Por eso, se necesita que la duración de la isquemia sea suficiente para producir ROS en la reperfusión (3).

Hay otras vías de producción de superóxido no mitocondriales que podrían contribuir también, como la monoamino oxidasa, la xantina oxidasa, la NADPH oxidasa y la óxido nítrico sintasa. Sin embargo, la activación de estos procesos parece ocurrir después de la producción inicial de las ROS mitocondriales, y su papel en la patología por reperfusión no parece estar claro, lo que sugiere que las ROS producidas en el exterior de la mitocondria contribuyen al daño tisular secundario y a la subsiguiente inflamación (3).

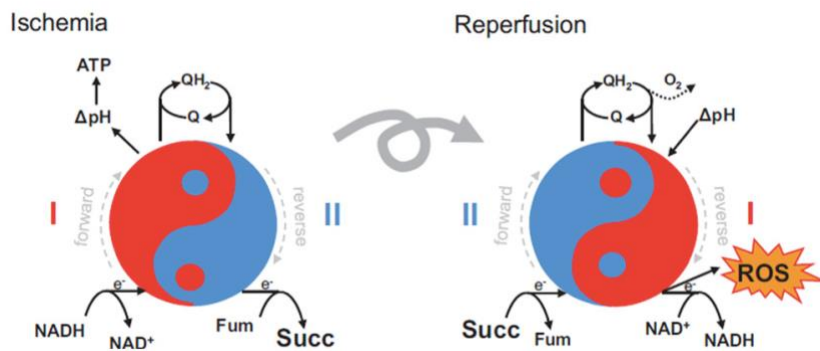


Figura 3. Complejos I y II en isquemia y reperfusión. Figura tomada de (2).

En este trabajo nos centraremos en estudiar la inhibición de dos de los principales motores desencadenantes del daño por reperfusión en el IAM: la producción masiva de ROS y la apertura de los mPTP. Inhibir por un lado el complejo II para evitar la oxidación del succinato y, por otro, la reactivación del complejo I para evitar directamente la formación de ROS son dos posibles estrategias terapéuticas que se están investigando. Además, estudiaremos la inhibición de la apertura de los mPTP por medio de la activación de los canales de K^+ dependientes de ATP (KATP), que en última instancia conducen a la muerte de los cardiomiocitos por necrosis y apoptosis. Como complemento a las terapias farmacológicas, explicaremos una estrategia mecánica: la inducción de una leve hipotermia al inicio de la reperfusión.

3. Objetivos

Conocer con detalle las dianas terapéuticas hacia las que se dirigen los posibles tratamientos de la lesión por IR en el IAM. Los estudios que se están realizando actualmente ubican a la mitocondria en el foco de la lesión por IR, siendo la oxidación del succinato por el complejo II, la reactivación del complejo I y la apertura de los mPTP durante la reperfusión las dianas terapéuticas que se van a estudiar en este trabajo. Se desarrollarán las distintas estrategias terapéuticas en las que los investigadores centran sus trabajos, basadas en evitar la producción de ROS mitocondriales y la apertura de los mPTP durante la reperfusión miocárdica a través de la inhibición de los complejos I y II y de la apertura de los mPTP.

4. Metodología

Para la realización del trabajo se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica de publicaciones científicas relacionadas con la actividad mitocondrial en el curso del IAM, así como con la subsiguiente lesión por IR y sus dianas terapéuticas, ya que su estudio es el objetivo de este trabajo. Se han utilizado fuentes de datos tales como PubMed (NCBI) y Google Académico, además de consultar revistas médicas como la Revista Española de Cardiología y realizar búsqueda de patentes y ensayos clínicos en Espacenet y clinicaltrials.gov, respectivamente. Las palabras clave utilizadas en la búsqueda han sido: “ischemia-reperfusion injury”, “reactive oxygen species”, “succinate accumulation”, “succinate oxidation”, “SDH inhibitors”, “S-nitrosation”, “A/D transition of mitochondrial complex I”, “KATP channel activators”, “hypothermic ischemia”.

La metodología del trabajo está basada en la estructura clásica del artículo científico siguiendo las directrices pautadas por la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

5. Resultados y discusión

Dado que la reperfusión del miocárdico isquémico es la única alternativa posible hasta la fecha para mantener con vida a los cardiomiocitos tras un periodo de isquemia, reducir el daño derivado de la reoxigenación es un factor clave para preservar la función cardiaca en los pacientes que han sufrido un IAM. Hoy en día son múltiples las líneas de investigación que se dirigen a encontrar objetivos terapéuticos y posibles tratamientos. A continuación, se estudiarán con detalle cuatro estrategias terapéuticas objeto de estudio en los últimos años y las dianas terapéuticas hacia las que se dirige cada una de ellas en la batalla por mitigar los daños derivados de la reperfusión miocárdica.

• INHIBICIÓN REVERSIBLE DEL COMPLEJO II

La prevención de la acumulación u oxidación de succinato se ha sugerido como un nuevo objetivo terapéutico contra la lesión por reperfusión miocárdica. El succinato se acumula en los tejidos isquémicos debido a la rápida conversión de fumarato por la actividad inversa de la SDH y recupera sus niveles en pocos minutos durante la reperfusión. En esta fase, la reanudación de la actividad convencional de la SDH oxida el succinato acumulado e induce una producción masiva de ROS por el RET desde el complejo mitocondrial II al I (14). Por ello se están investigando inhibidores de la succinato deshidrogenasa (SDHi) para su uso tanto en la prevención como en el tratamiento de la lesión por IR que inhiban la acumulación u oxidación de succinato. Se exige que sean inhibidores reversibles y permeables a las células. La reversibilidad del SDHi es importante ya que permite que el inhibidor tenga un efecto transitorio. Su unión al complejo II se encuentra en el sitio de unión al succinato, siendo esta una inhibición competitiva. Por otro lado, la permeabilidad permite que el compuesto ingrese en la célula y se acumule. Se han estudiado varios inhibidores del complejo II, incluyendo la 2-tenoiltrifluoroacetina (TITA), el 3-nitropropionato, la atpenina A5 y el malonato. De ellos, la TITA, el 3-nitropropionato y la atpenina A5 son irreversibles y el malonato no es permeable a las células. Para solucionar el problema de la permeabilidad se recurre al uso de profármacos, compuestos de malonato permeables a las células como el dimetilmalonato que se hidrolizan *in vivo* a malonato. El dimetilmalonato es muy ventajoso, ya que tiene una toxicidad muy baja; una DL50 de 5g/kg cuando se administra por vía oral (15).

Dadas las propiedades beneficiosas del malonato, este ha sido objeto de estudios experimentales en animales para probar su eficacia y seguridad en la prevención y tratamiento de la lesión por reperfusión. Se ha demostrado que el pretratamiento con malonato antes de la isquemia atenúa la acumulación de succinato durante la fase isquémica, mientras que la administración al inicio de la reperfusión inhibe su reoxidación a fumarato durante esta fase y aumenta su concentración en los tejidos (16). Sin embargo, la administración de malonato antes de la isquemia no sería clínicamente apropiada en el caso de un IAM, ya que es un evento impredecible. Sí que se podría plantear la posibilidad de utilizar el malonato como tratamiento profiláctico crónico, pero su administración podría verse limitada por el efecto del malonato sobre otros órganos. Además, la acumulación de succinato solo se vuelve patológica tras su rápida oxidación durante los primeros minutos de la reperfusión, donde impulsa la producción de ROS por el RET a través del Complejo I. Es por ello que los investigadores hayan atribuido la cardioprotección a la inhibición de la oxidación del succinato en la reperfusión (17).

Un estudio realizado demostró que tras la administración de malonato al inicio de la reperfusión se producían cambios en el perfil metabólico de los corazones tratados: una mayor acumulación de succinato en esta fase, una función mitocondrial preservada, una reducción en la producción de ROS y una mayor retención de calceína en mitocondrias aisladas, lo que inhibe la apertura de los mPTP. Sabiendo que la cadena respiratoria mitocondrial es la fuente principal de ROS mitocondriales y que la apertura de los mPTP es impulsada por estas especies durante la reperfusión, la administración de malonato podría ser de importancia en la cardioprotección mediada por la atenuación de la apertura de los mPTP. Respecto a las variables hemodinámicas, el malonato no produjo variaciones significativas ni en los valores de frecuencia cardíaca ni en los de la presión desarrollada en el ventrículo izquierdo (LVdevP), por lo que es poco probable que los efectos del malonato atiendan a estas variables (16).

Sin embargo, si se administra malonato de forma sistémica al inicio de la reperfusión, este podría interferir en la respiración mitocondrial no solo en el miocardio isquémico sino también en otras células del cuerpo. De hecho, se ha demostrado que el malonato ejerce efectos nocivos pudiendo ocasionar incluso la muerte celular cuando se administra de forma sistémica. Para evitar posibles efectos tóxicos, el malonato se aplica selectivamente en el área de riesgo vía intracoronaria. Los resultados experimentales de la infusión intracoronaria de malonato a la dosis que se considera efectiva fueron positivos: el malonato confirió protección frente a la lesión por IR y no se produjeron concentraciones detectables de este compuesto ni en el miocardio distante ni en plasma, por lo que podría ser una estrategia terapéutica atractiva.

No obstante, el efecto beneficioso de este tratamiento cardioprotector sobre el tamaño del infarto no garantiza su aplicabilidad clínica a los pacientes (14). El malonato tiene la ventaja sobre otros compuestos probados de que es un metabolito natural que aparece en los tejidos animales cuyos efectos son reversibles y que su principal limitación, sus posibles efectos tóxicos en otros tejidos, podrían resolverse mediante la vía de administración intracoronaria (15).

- **INHIBICIÓN REVERSIBLE DEL COMPLEJO I**

Tras la reactivación del complejo I en la reperfusión por la reintroducción del flujo sanguíneo, las especies reactivas de oxígeno (ROS) mitocondriales producidas en este complejo junto con la sobrecarga de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial y la normalización del pH inducen la apertura de los mPTP, lo que conduce al daño celular. Además, las ROS van a causar daño oxidativo directo al unirse a componentes celulares.

Reducir la producción de ROS durante la reperfusión mediante la inhibición de la reactivación del complejo I es una posible estrategia terapéutica que está siendo objeto de estudio para disminuir el daño por IR. Entre los agentes que podrían inhibir la reactivación del complejo I encontramos el óxido nítrico (NO) y sus metabolitos, que ejercen cardioprotección a través de una reacción conocida como S-nitrosación o S-nitrosilación (18). Se identificó que la protección se debe a la S-nitrosación reversible de una cisteína funcional crítica, la Cys39 de la subunidad ND3 del complejo I, que solo es susceptible a modificarse en condiciones isquémicas. Esta modificación transitoria inhibiría la rápida reactivación del complejo I durante los primeros minutos de la reperfusión, previniendo así la producción masiva de ROS, el daño oxidativo y la necrosis tisular. El bloqueo del complejo I evitaría que los equivalentes reductores como NADH generados en el CAC ingresen a la cadena de transporte de electrones por el complejo I, mientras que la oxidación de FADH₂ por el complejo II podría continuar (19).

El óxido nítrico ejerce una señalización ubicua a través de la modificación postraduccional de los residuos de cisteína, mediante la reacción de S-nitrosación. Esta reacción consiste en la adición covalente de un grupo NO al resto tiol de un residuo de cisteína (anión tiolado, RS-) para formar S-nitrosotioles. El NO bioactivo puede ingresar en las mitocondrias como compuestos SNO de bajo peso molecular, como cisteinil-NO (CSNO) o nitrosoglutatión (GSNO), o como proteínas nitrosiladas (20). Mediante esta reacción solamente son nitrosados el complejo I de la cadena respiratoria y la F0F1-ATP sintasa, pero la actividad de esta última no se ve afectada. Del complejo I, las subunidades que son S-nitrosiladas son tres: 75kDa, B8 y ND3. En concreto, lo hacen dos cisteínas de la subunidad 75kDa y una de B8 y ND3. La cisteína de la ND3 susceptible a S-nitrosación, la Cys39, solamente está expuesta bajo condiciones hipóxicas. Durante la actividad normal del complejo I la Cys39 está ocluida, pero durante la isquemia se produce un cambio conformacional del complejo I que hace que esta cisteína sea expuesta. Los experimentos realizados demuestran que el tratamiento de S-nitrosación no inhibió el complejo I en condiciones normóxicas, ya que la Cys39 está ocluida. Solo lo hizo en condiciones de hipoxia, cuando la respiración mitocondrial se ve comprometida y conduce al cambio conformacional que expone a esta cisteína.

La Cys39 es localizada en la región bisagra del complejo I que se orienta hacia la matriz mitocondrial. Esta cisteína es adyacente al canal de una de las cuatro vías de translocación de protones del complejo I y está cerca del bolsillo de unión de ubiquinona, donde la ubiquinona recibe los electrones del centro de iones azufre N2. La localización de la ND3 en una región clave del complejo I y la posición de la Cys39 en la región lazo de la ND3 propician la actividad dependiente de exposición y la reactividad de la cisteína. Mientras que la S-nitrosación de la Cys39 de la subunidad ND3 es insignificante en condiciones de alta actividad y se incrementa de una forma marcada cuando la actividad es reducida, la S-nitrosación del resto de cisteínas no se ve afectada por los cambios en la actividad del complejo I. De hecho, la S-nitrosación de las cisteínas de la subunidad 75kDa fue similar en condiciones normóxicas e hipóxicas (19).

En los experimentos que se han llevado a cabo para demostrar que el óxido nítrico y sus metabolitos confieren cardioprotección se utiliza un agente nitrosante que actúa selectivamente en la mitocondria, el MitoSNO. Este contiene un resto S-nitrosante unido a un catión trietilfosfonio lipofílico que permite su rápida y extensa absorción al interior de las mitocondrias de forma selectiva. Concretamente, su absorción tiene lugar a la matriz mitocondrial, donde se acumula a los pocos minutos de su administración. El MitoSNO es administrado de forma intravenosa durante los primeros minutos de la reperfusión y es rápidamente absorbido por las mitocondrias de los cardiomiocitos sin afectar a tejidos no isquémicos, evitando así los efectos adversos que se pudiesen desencadenar. Al ser absorbido de forma eficaz por las mitocondrias, este compuesto reacciona con los tioles intramitocondriales de la Cys39 de la subunidad ND3 del complejo I bloqueando la enzima en su forma desactivada, por lo que se evita así la excesiva producción de ROS (21).

Los experimentos realizados también han revelado que el MitoSNO solo es cardioprotector cuando se administra al inicio de la reperfusión, siendo su acción inhibitoria reversible. Pasados 30 minutos de su administración, la S-nitrosación de la Cys39 se perdió, lo cual indica que la inhibición de la reactivación es transitoria. Esta reactivación del complejo I está mediada por mecanismos redox endógenos: por la S-nitrosoglutatión reductasa mitocondrial y los sistemas de tiorredoxina. Además, agentes reductores exógenos como el cobre y el ascorbato también demostraron normalizar la actividad de complejo I mediante la reducción de los grupos tiol que habían sufrido nitrosilación, los S-nitrosotioles.

Por otro lado, se demostró que la S-nitrosación de la Cys39 de la subunidad ND3 no afecta a la interacción del NADH con el FMN, ni tampoco lo hace la nitrosilación de otros residuos

del complejo I. La forma en la que la S-nitrosilación inhibe la actividad del complejo I es mediante la interrupción de la interacción entre la ubiquinona y el complejo I (19).

Una preocupación en cuanto al uso de fármacos basados en NO es el hecho de que puedan modificar la presión sanguínea o producir alteraciones hemodinámicas que puedan descartar su uso clínico. Sin embargo, como se ha mencionado antes, el MitoSNO tiene una alta selectividad por las mitocondrias, donde transfiere un resto nitroso directamente a los tioles mitocondriales, con una liberación insignificante de NO libre al torrente sanguíneo. Además, hay evidencias de que el MitoSNO actúa independientemente de las vías no mitocondriales de GMPc, y que una dosis aguda no tiene efectos en la hemodinámica de un corazón cuyas mitocondrias se encuentran habitualmente en condiciones normóxicas. Para demostrar que su infusión continua durante la reperfusión no altera los parámetros hemodinámicos, se han llevado a cabo estudios de medidas de la presión sanguínea y de la función cardíaca. Se observó que no había diferencias significativas en ninguno de los parámetros, de modo que el MitoSNO puede ser administrado de una forma segura a los niveles cardioprotectores sin afectar a los parámetros hemodinámicos. De esta forma se evita la mayor limitación que restringe el uso de agentes donadores de NO (18).

Una consecuencia común del daño por IR en infarto de miocardio es el desarrollo de disfunciones cardíacas a largo plazo. Se ha demostrado que el MitoSNO, que en un principio parecía actuar solamente durante la reperfusión, tiene también impacto en las secuelas posteriores. Pasados 28 días desde la infusión de MitoSNO, se observó una mejora significativa en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo así como una disminución del contenido de colágeno en la remodelación fibrótica tisular (18). Por lo tanto, la administración aguda de MitoSNO al inicio de la reperfusión no solo disminuye el daño agudo del tejido cardíaco sino que también le confiere protección a largo plazo, mitigando así las secuelas que el infarto agudo de miocardio podría desencadenar.

- **ACTIVADORES DE LOS CANALES DE K⁺ DEPENDIENTES DE ATP**

Los mPTP son unos poros que se localizan en la membrana mitocondrial cuya apertura provoca un cambio de la permeabilidad mitocondrial que desemboca en la muerte celular. Su apertura permite que el agua y los solutos entren en las mitocondrias, aumentando el volumen de la matriz y rompiendo la membrana mitocondrial externa, lo que lleva a la liberación del citocromo c, que a su vez inicia la apoptosis. Además, su apertura conduce a la hidrólisis de ATP y al colapso del potencial de membrana mitocondrial.

Se ha demostrado que los mPTP permanecen cerrados durante la isquemia y se abren en los primeros minutos de la reperfusión, cuando están presentes factores como la sobrecarga de Ca²⁺, el estrés oxidativo (ROS), el agotamiento del ATP y la normalización del pH. Al ser estos poros mediadores de la lesión por IR, la inhibición de su apertura durante la reperfusión podría ser clave para conferir protección al miocardio (22).

Recientemente se ha descubierto que la apertura de los mPTP podría estar, en parte, influenciada por los canales de K⁺ dependientes de ATP (KATP). Estos canales actúan como sensores del metabolismo celular que acoplan la excitabilidad de la membrana al estado metabólico de la célula. Se ubican en las membranas plasmáticas, también en las intracelulares, como las mitocondriales (mitoKATP), donde median la absorción de potasio, impulsada por el potencial negativo de la membrana mitocondrial (23). En la hipoxia, debido a la restricción del flujo sanguíneo, el K⁺ se acumula en el espacio extracelular, ya que la bomba de Na⁺/K⁺ no puede operar en ausencia de energía, lo que a su vez provoca la despolarización de la membrana

y el acortamiento del potencial de acción. Una característica de los canales KATP es que su apertura disminuye en presencia de ATP, por lo que un factor contribuyente para abrir el canal podría ser la rápida disminución de ATP durante los primeros minutos de la isquemia (24). El canal puede también ser bloqueado por análogos de ATP no hidrolizables o en ausencia del cofactor Mg^{2+} , lo que demuestra que la hidrólisis de ATP no es necesaria para el bloqueo del canal. Se demostró que el MgADP estimula la apertura del canal, y que los efectos estimulantes del ADP dependen del Mg^{2+} . En ausencia de Mg^{2+} , el ADP ejerce un efecto inhibitorio similar al ATP sobre los canales de KATP. Debido a que la conductancia de estos canales es inactivada reversiblemente por ATP y acoplan el metabolismo miocárdico con la actividad eléctrica, durante la hipoxia estos canales podrían servir como un mecanismo endógeno de cardioprotección, al acortar la duración del potencial de acción y limitar la entrada de calcio a las células cardiacas. La limitación de la entrada de calcio evitaría la apertura de los mPTP y la consecuente muerte celular. Los activadores de los canales mitoKATP podrían proteger durante la reperfusión post-isquémica, sin alterar la actividad de los canales KATP de la membrana plasmática (22,25).

Se ha demostrado que la apertura de los canales mitocondriales de KATP es la base del preacondicionamiento isquémico, una técnica que consiste en someter al miocardio isquémico a breves periodos de isquemia no letal para proteger al corazón frente a un ataque isquémico posterior (24). Estudios realizados revelaron que los efectos del preacondicionamiento se podían reproducir de forma farmacológica, con fármacos activadores de los canales KATP. Sin embargo, el hecho de que la intervención se debe aplicar antes del evento isquémico no lo hace viable como posible tratamiento en los síndromes coronarios agudos, como un IAM. Para solventar la limitación del preacondicionamiento isquémico en el IAM surge el postacondicionamiento isquémico, que consiste en la aplicación de periodos breves de isquemia esta vez al inicio del periodo de reperfusión. Del mismo modo, estos efectos se pueden conseguir mediante fármacos activadores de los canales KATP. Uno de los fármacos que se ha probado ha sido el diazóxido (22,26). El diazóxido resultó ser efectivo para preservar la función posisquémica en múltiples modelos animales y en miocitos humanos, teniendo una potencia 2000 veces más alta sobre los canales mitocondriales que sobre los del sarcolema, cuya actividad no se vio afectada. Un estudio confirma que el diazóxido redujo significativamente la hipercontractura durante la reperfusión: reguló el volumen mitocondrial y preservó la contractilidad de los miocitos en respuesta al estrés (27). El efecto estimulador del diazóxido requiere de la presencia de Mg^{2+} y de nucleótidos hidrolizables. Puede abrir los canales de KATP en presencia de ATP, mientras que la ausencia de Mg^{2+} suprime su habilidad de estimular el canal (28).

Otra variante de acondicionamiento que ha sido propuesta para conferir protección frente a la lesión por IR en el infarto de miocardio es el posacondicionamiento isquémico remoto. Estudios experimentales probaron la capacidad de reducir el tamaño del infarto cuando las isquemia sucesivas eran aplicadas en un lugar distante al corazón, como en el riñón o en el brazo, obteniendo resultados satisfactorios (26).

Destacar que se ha sugerido una superposición farmacológica entre la actividad de la SDH y los moduladores del canal KATP. Un mecanismo cardioprotector independiente del canal KATP que se ha propuesto, regulando la homeostasis del volumen, es la inhibición de la SDH por diazóxido. Se ha sugerido que la SDH podría formar parte del canal mitoKATP o ser moduladora de su actividad. Del mismo modo, se ha visto que inhibidores del complejo II como el malonato o la atpenina A5 pueden activar los canales KATP, pero todavía no está claro si afectan a la función de estos canales durante la lesión por IR (29,17).

Sin embargo, a pesar de que varios estudios han ido dirigidos a caracterizar las bases fisiológicas del postcondicionamiento isquémico, todavía se requiere más información para conocer los mecanismos que subyacen a la activación de los canales mitocondriales KATP. La inhibición de los mPTP parece ser un paso final de señalización del postcondicionamiento isquémico, y aunque se ha demostrado que los activadores de estos canales, como el diazóxido, confieren cardioprotección cuando son administrados antes de la reperfusión, muchos son los aspectos que todavía quedan por elucidar en este campo (30).

- **INDUCCIÓN DE UNA HIPOTERMIA LEVE TARDÍA**

Una estrategia reciente que se está estudiando para mitigar el daño por reperfusión en miocitos humanos es la inducción de una hipotermia leve al inicio de la isquemia. La inducción de una hipotermia leve a 32-24°C al inicio de la isquemia ha demostrado ser cardioprotectora en modelos experimentales frente al daño por reperfusión. El enfriamiento durante la isquemia es suficiente para disminuir la lesión por IR, aunque el enfriamiento durante isquemia y reperfusión confiere mayor protección que el enfriamiento solo durante la isquemia. La hipotermia aplicada solo durante la reperfusión demostró no ser protectora, tanto en estudios experimentales como clínicos, lo que sugiere que la hipotermia debe instaurarse durante la isquemia (31). Sin embargo, la estrategia de enfriar el miocardio al inicio de la isquemia no es clínicamente factible debido al retraso inherente asociado con la búsqueda de atención médica en el IAM, así como las posibles complicaciones y el tiempo requerido para alcanzar temperaturas tan bajas (32).

Estudios recientes en animales afirman que el efecto protector de la hipotermia en el IAM solo se observó cuando esta fue aplicada antes de la reperfusión. Sin embargo, los estudios en humanos no han podido confirmar este efecto, posiblemente debido al hecho de que la temperatura terapéutica no pudo alcanzarse en la mayoría de los pacientes, debido a la dificultad técnica de enfriar a un paciente. Hasta ahora, los intentos de conseguir una hipotermia miocárdica terapéutica en humanos con infarto de miocardio han estado limitados por la incapacidad para enfriar el miocardio antes de la reperfusión de forma rápida y selectiva, y por la imposibilidad de que la disminución de la temperatura sea lo suficientemente grande (33).

Para solventar esta imposibilidad técnica, se han realizado estudios experimentales con un compuesto que ha demostrado producir una hipotermia reversible en animales que han sufrido un IAM. Este compuesto es el monofosfato de 5'-adenosina (5'-AMP). Los ratones que recibieron una dosis alta de 5'-AMP vía intraperitoneal antes de la reperfusión ingresaron en un estado hipometabólico que permitió una disminución relativamente rápida de la temperatura corporal de manera segura a 16-17°C cuando se mantienen a una temperatura ambiente de 15°C (34). De igual modo, las ratas a las que se les administró el agente tetratiomolibdato (TTM), experimentaron una reducción del metabolismo que se reflejó por una disminución del consumo de oxígeno y de la producción de dióxido de carbono (35). Sin embargo, el mecanismo por el cual la hipotermia leve limita la lesión miocárdica todavía no está claro, aunque probablemente sea multifactorial.

Se ha observado una preservación de la integridad microvascular, una menor activación de la apoptosis, una disminución de la activación del complemento y una reducción en la desgranulación de neutrófilos (32). Por otro lado, se observó una preservación de la relación ATP/ADP, lo que aumenta las reservas de energía en el miocardio isquémico, así como un descenso de la acumulación de xantina, debido a una menor descomposición de nucleótidos de adenina durante la hipotermia (31). También se ha demostrado que la hipotermia puede reducir la producción de ROS y el estrés oxidativo, que se ha relacionado con una disminución de la

afinidad por el oxígeno de los eritrocitos y no con la interferencia en la cadena de transporte de electrones. La menor afinidad del oxígeno por los eritrocitos se debe al aumento de los niveles de 2,3-bisfosfoglicerato para mejorar los de desoxihemoglobina. La disminución de los niveles de oxígeno durante la hipotermia disminuyó la acumulación de ROS que causan daño celular adicional tras la reperfusión (34). Además, la hipotermia tiene efecto inhibitorio directo sobre la actividad de la ciclofilina D, proteína mitocondrial con actividad enzimática, en la inducción del poro de permeabilidad de transición mitocondrial. De este modo se impide su apertura y las consecuencias que conlleva, protegiendo al miocardio del estrés posterior.

Por otro lado, se ha observado un curioso efecto sinérgico al combinar el malonato de dimetilo, inhibidor de la SDH, con la inducción de una hipotermia leve tardía. No se encontraron cambios en los niveles de succinato tras la isquemia ni tampoco en la velocidad de oxidación durante la reperfusión, por lo que la hipotermia no previene la acumulación de succinato durante la isquemia ni su rápida oxidación durante la reperfusión, lo que implica mecanismos de acción independientes (31), como ya hemos visto.

Actualmente se está llevando a cabo un ensayo clínico que combina procedimientos físicos y farmacológicos para conseguir una hipotermia intracoronaria selectiva. Los complejos tratamientos físicos aplicados en la arteria ocluida permiten la infusión de una solución salina fría a 4°C de forma selectiva en el miocardio (33).

Aunque las vías mecanicistas que contribuyen a la cardioprotección hipotérmica no están completamente aclaradas, la combinación de distintas estrategias terapéuticas farmacológicas y mecánicas podría ser ventajoso, ya que las terapias farmacológicas dirigidas a una única vía mecanicista han sido ineficaces en ensayos clínicos. La capacidad de suprimir simultáneamente múltiples vías patológicas sin consecuencias adversas significativas hace que la hipotermia tardía leve sea un complemento muy atractivo para la terapia de reperfusión en el IAM (31,32).

6. Conclusiones

Son varias las estrategias terapéuticas que se están desarrollando para evitar el daño derivado de la reperfusión miocárdica, entre ellas la inhibición del complejo II por inhibidores de la SDH, como el dimetilmalonato, y la reactivación del complejo I por la S-nitrosación de la Cys39. El dimetilmalonato inhibe la oxidación de succinato a fumarato catalizada por la SDH, mientras que la S-nitrosación inhibe la rápida reactivación del complejo I al inicio de la reperfusión. La inhibición de la apertura de los mPTP por activadores de los canales KATP como el diazóxido es otra de las estrategias farmacológicas objeto de estudio. Los mPTP permanecen cerrados durante la isquemia y se abren en los primeros minutos de la reperfusión, cuando se encuentran presentes factores como la sobrecarga de Ca²⁺, el estrés oxidativo (ROS), el agotamiento del ATP y la normalización del pH. Recientemente se ha descubierto que los mitoKATP se encuentran detrás de los efectos beneficiosos del posacondicionamiento isquémico, al inhibir la apertura de estos poros durante la reperfusión.

Además de las estrategias farmacológicas dirigidas a evitar la lesión por IR, se está estudiando una estrategia mecánica, la inducción de una hipotermia leve al inicio de la reperfusión. La inducción de un estado hipometabólico con fármacos como el 5'-AMP podría reducir la producción de ROS y el estrés oxidativo por la disminución de la afinidad del oxígeno por los eritrocitos, así como la apertura de los mPTP, ya que tiene efecto inhibitorio sobre la ciclofilina D, proteína mitocondrial con actividad enzimática directa en la inducción de la apertura de los mPTP.

Debido a que son varios los mecanismos que subyacen a la lesión por IR, la combinación de distintas terapias farmacológicas y mecánicas que se dirijan a varias vías mecanicistas podría ser una estrategia atractiva para conferir protección al corazón tras la reperfusión miocárdica. Sin embargo, a pesar de la evidente necesidad de encontrar un tratamiento contra el daño derivado de la reperfusión del miocardio isquémico, todavía no hay ninguna terapia efectiva disponible que forme parte de la práctica clínica estándar. Hasta el momento, la transposición de los fármacos probados desde los estudios experimentales a los ensayos clínicos con humanos no ha tenido éxito alguno. Este fracaso de la traducción puede deberse, al menos en parte, al hecho de que la mayoría de estos estudios se realizaron en animales jóvenes y sanos que carecen de comorbilidades, comedificaciones o factores de riesgo, y al fracaso en el diseño de los ensayos clínicos.

7. Bibliografía

1. Ruiz Meana M, García Dorado D. Fisiopatología del daño miocárdico por isquemia-reperfusión: nuevas oportunidades terapéuticas en el infarto agudo de miocardio. *Revista Española de Cardiología*. 2020;(62):199-209.
2. Pell VR, Chouchani ET, Murphy MP, Brookes PS, Krieg T. Moving Forwards by Blocking Back-Flow: The Yin and Yang of MI Therapy. *Circ Res*. 2016;118(5):898-906.
3. Chouchani ET, Pell VR, James AM, et al. A Unifying Mechanism for Mitochondrial Superoxide Production during Ischemia-Reperfusion Injury. *Cell Metab*. 2016;23(2):254-263.
4. Pell VR, Chouchani ET, Frezza C, Murphy MP, Krieg T. Succinate metabolism: a new therapeutic target for myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2016;111(2):134-141.
5. Dröse S, Stepanova A, Galkin A. Ischemic A/D transition of mitochondrial complex I and its role in ROS generation. *Biochim et Biophys Acta*. 2016; 1857 (7): 946-957.
6. Dueñas Castell C, Zapata Oquendo H, De La Espriella R, Ortiz Ruiz G. Mitocondria y disfunción mitocondrial en el paciente crítico. *Acta Colombiana de Cuidado Intensivo*. 2001; 11 (1): 55-67.
7. Babot M, Birch A, Labarbuta P, Galkin A. Characterisation of the active/de-active transition of mitochondrial complex I. *Biochim et Biophys Acta*. 2014;1837(7):1083-1092.
8. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*. 2014;515(7527):431-435.
9. Marín Hernández Á. El factor inducido por la hipoxia-1 (HIF-1) y la glucólisis en las células tumorales. *Revista de Educación Bioquímica*. 2009; 28 (2): 42-51.
10. Brand MD. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radic Biol Med*. 2016;100:14-31.

11. Quinlan C, Perevoshchikova I, Hey-Mogensen M, Orr A, Brand M. Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biology*. 2013; 1 (1): 304-312.
12. Fang X, Wang H, Han D, et al. Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(7):2672-2680.
13. Ibáñez B, Heusch G, Ovize M, Van de Werf F. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(14):1454-1471.
14. Valls-Lacalle L, Barba I, Miró-Casas E, Ruiz-Meana M, Rodríguez-Sinovas A, García-Dorado D. Selective Inhibition of Succinate Dehydrogenase in Reperfused Myocardium with Intracoronary Malonate Reduces Infarct Size. *Sci Rep*. 2018;8(1):2442.
15. Chouchani E, Krieg T, Saeb-Parsy K, Murphy M, Work L, Frezza C. Succinate dehydrogenase inhibitors (SDHI) [Internet]. *Patentscope.wipo.int*. 2016.
16. Valls-Lacalle L, Barba I, Miró-Casas E, et al. Succinate dehydrogenase inhibition with malonate during reperfusion reduces infarct size by preventing mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res*. 2016;109(3):374-384.
17. Pell VR, Chouchani ET, Frezza C, Murphy MP, Krieg T. Succinate metabolism: a new therapeutic target for myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2016;111(2):134-141.
18. Methner C, Chouchani ET, Buonincontri G, et al. Mitochondria selective S-nitrosation by mitochondria-targeted S-nitrosothiol protects against post-infarct heart failure in mouse hearts. *Eur J Heart Fail*. 2014;16(7):712-717.
19. Chouchani ET, Methner C, Nadtochiy SM, et al. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. *Nat Med*. 2013;19(6):753-759.
20. Sun J. Protein S-nitrosylation: a role of nitric oxide signaling in cardiac ischemic preconditioning. *Sheng Li Xue Bao*. 2007;59(5):544-552.
21. Pell VR, Chouchani ET, Murphy MP, Brookes PS, Krieg T. Moving forwards by Blocking Back-Flow. *Circ Res*. 2016; 118 (5): 898-906.
22. Derek J Hausenloy, Helen L Maddock, Gary F Baxter, Derek M Yellon. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovascular Research*. 2002; 55 (3): 534-543.
23. Paggio A, Checchetto V, Campo A y col. Identification of an ATP-sensitive potassium channel in mitochondria. *Nature*. 2019; 572 (7771): 609-613.
24. Foster MN, Coetzee WA. KATP Channels in the Cardiovascular System. *Physiol Rev*. 2016;96(1):177-252.
25. García-Rivas GJ. Canales mitocondriales de potasio sensibles a ATP y cardioprotección. *Revista de Educación Bioquímica*. 2006;(25(1):20-25.

26. Cuellas Ramón C, Pérez de Prado A, Pérez Martínez C, Diego Nieto A, Gonzalo Orden J, Fernández Vázquez F. Investigación traslacional en isquemia, infarto de miocardio y reperfusión. *Revista Española de Cardiología*. 2013; (13): 57-63.
27. Henn MC, Janjua MB, Zhang H, et al. Diazoxide Cardioprotection Is Independent of Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium Channel Kir6.1 Subunit in Response to Stress. *J Am Coll Surg*. 2015;221(2):319-325.
28. Shyng S, Ferrigni T, Nichols CG. Regulation of KATP channel activity by diazoxide and MgADP. Distinct functions of the two nucleotide binding folds of the sulfonylurea receptor. *J Gen Physiol*. 1997;110(6):643-654.
29. Anastacio MM, Kanter EM, Makepeace C, et al. Cardioprotective mechanism of diazoxide involves the inhibition of succinate dehydrogenase. *Ann Thorac Surg*. 2013;95(6):2042-2050.
30. Heusch G. Treatment of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Ischemic and Pharmacological Postconditioning. *Compr Physiol*. 2015;5(3):1123-1145.
31. Kohlhauser M, Pell VR, Burger N, et al. Protection against cardiac ischemia-reperfusion injury by hypothermia and by inhibition of succinate accumulation and oxidation is additive. *Basic Res Cardiol*. 2019;114(3):18.
32. Kanemoto S, Matsubara M, Noma M, et al. Mild hypothermia to limit myocardial ischemia-reperfusion injury: importance of timing. *Ann Thorac Surg*. 2009;87(1):157-163.
33. Ziekenhuis Eindhoven C. EUROpean Intracoronay Cooling Evaluation in Patients With ST-elevation Myocardial Infarction [Internet]. *Clinicaltrials.gov*. 2019.
34. Tao Z, Zhao Z, Lee CC. 5'-Adenosine monophosphate induced hypothermia reduces early stage myocardial ischemia/reperfusion injury in a mouse model. *Am J Transl Res*. 2011; 3 (4): 351-361.
35. Singer M, Martin JF, Dyson AP. Tetrathiomolybdate for using in the treatment of ischemia-reperfusion injury [Internet]. *Patentscope.wipo.int*. 2015.