



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**TÍTULO: Dianas terapéuticas basadas en el
metabolismo mitocondrial para el tratamiento de
infarto e ictus**

Autor: Jessica Paniagua Yerpes

Fecha: Julio 2020

Tutor: Antonio Martínez Ruiz

ÍNDICE

1. RESUMEN	2
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	2
3.1 Descripción de las patologías.....	2
3.2 Impacto y situación actual de las patologías.....	4
3.3 Fisiopatología y rutas metabólicas implicadas en la isquemia	4
4. OBJETIVOS	7
5. MATERIALES Y MÉTODOS	7
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
6.1 Complejo I de la cadena respiratoria.....	8
6.2 Complejo II de la cadena respiratoria.....	10
6.3 Intercambiador NCLX.....	12
6.4 Uniportador MCU	14
6.5 Poro de transición de permeabilidad mitocondrial.....	16
7. CONCLUSIONES	18
8. BIBLIOGRAFÍA.....	18

1. RESUMEN

El infarto de miocardio y el ictus son la primera y segunda causa de muerte a nivel mundial respectivamente. Ambas patologías tienen un origen isquémico, es decir se producen por la oclusión de una arteria que genera la falta de oxígeno en el tejido. Cuando este se restablece, da lugar en las células a la disminución de energía y la pérdida del potencial de membrana que conlleva la apertura de distintos canales iónicos, desencadenando el aumento de calcio y la apertura de un poro en la mitocondria. Se produce un aumento de Especies Reactivas de Oxígeno y finalmente se activan las vías de necrosis y apoptosis que llevan a la muerte celular.

Actualmente no existe en la clínica ningún fármaco que pueda evitar este daño, a pesar de que si se conocen posibles dianas terapéuticas basadas en el metabolismo de la mitocondria. La inhibición de los complejos I y II de la cadena respiratoria usando MitoSNO y malonato, del intercambiador NCLX usando CGP-37157, del canal MCU usando derivados del rutenio y del poro de transición de permeabilidad mitocondrial usando ciclosporina A han sido estudiados en múltiples experimentos o ensayos clínicos y demuestran en mayor o menor medida cardioprotección/neuroprotección.

Palabras clave: *Isquemia-reperusión, infarto, ictus, mitocondria, daño oxidativo.*

2. ABSTRACT

The myocardial infarct and the stroke are the first and second death causes in the world respectively. Both pathologies have an ischemic origin, which means that they are produced by the occlusion of an artery that generates the lack of oxygen in the tissue. When it is restored, results in an energy decrease, and membrane potential loss. These facts entail the opening of different ionic channels, triggering the calcium increase and the opening of the mitochondrial permeability transition pore. There is also an increase of reactive oxygen species and finally, necrotic and apoptotic pathways are activated, causing cell death.

Nowadays, there is no drug who can avoid that damage, despite so many mitochondrial targets are known. Several studies and clinical trials have demonstrated cardio and neuroprotection by the inhibition of many compounds: complexes I and II of the respiratory chain using MitoSNO and malonate; NCLX exchanger using CGP-37157; MCU channel using ruthenium derivatives and mitochondrial permeability transition pore using cyclosporine A.

Key words: *Ischemia-reperfusion, infarction, stroke, mitochondria, oxidative damage.*

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Descripción de las patologías

INFARTO DE MIOCARDIO

El infarto de miocardio es un Síndrome Coronario Agudo que se produce cuando una placa aterosclerótica se forma en el interior de las arterias y bloquea el flujo sanguíneo, disminuyendo su llegada al corazón^(1,2). Cuando hay evidencia de daño en el miocardio, como por ejemplo el aumento de troponinas cardíacas y necrosis en el tejido cardíaco se le denomina Infarto Agudo de Miocardio (IAM). Estos pueden clasificarse según sean con onda Q, sin onda Q, sin elevación del segmento ST (IAMSEST) o con ella (IAMCEST)⁽³⁾.

Los IAM se manifiestan con dolor de pecho, molestias del brazo izquierdo que se extienden hasta el cuello, dificultad respiratoria, sudor, náuseas, vómitos, fatiga... Aunque a veces pueden ser “silenciosos” dificultando más su diagnóstico. Los factores de riesgo que

promueven la aparición de la patología son la edad, el tabaco, la hipertensión arterial (HTA), una alta concentración de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en sangre, hipercolesterolemia y el consumo de drogas como la cocaína ⁽²⁾. Los IAM son más comunes en varones que en mujeres, pero a partir de los 75 años esto se invierte y aparecen más casos en mujeres. En estas, al menos un 30% de los casos cursan con síntomas atípicos, lo que dificulta su diagnóstico ⁽³⁾.

Actualmente, el tratamiento del IAM consta necesariamente de restablecer el flujo sanguíneo. Esto puede hacerse de dos maneras: con el Intervencionismo Coronario Percutáneo (ICP) que conlleva la introducción un *stent* arterial para desobstruir la arteria infartada, o con la Fibrinólisis que trata de usar fármacos trombolíticos que disuelvan el coágulo, como el activador tisular de plasminógeno (t-PA). Además, se pueden utilizar otros fármacos coadyuvantes como antiagregantes, betabloqueantes, nitratos, inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) que permiten evitar otras complicaciones ⁽³⁾.

A pesar de que la reperusión de los tejidos es la única vía para evitar la muerte del paciente, paradójicamente también supone un daño para las células. Al restablecerse el oxígeno se produce en los tejidos un daño oxidativo conocido como isquemia-reperusión (concepto que se desarrolla en profundidad más adelante). Este proceso produce la muerte celular en los tejidos afectados aumentando la probabilidad de aparición de nuevos infartos o insuficiencia cardíaca en el paciente.

ICTUS

El ictus o infarto cerebral es un tipo de Accidente Cerebrovascular (ACV) producido por un trastorno vascular en el tejido cerebral, que ocasiona déficit neurológico por al menos 24 horas y que cursa con necrosis tisular ⁽⁴⁾.

Normalmente el 85% de los ACV son de origen isquémico, es decir se producen por una arteria obstruida a causa de un trombo, y ocasionan la falta de aporte de oxígeno y con ello la muerte celular del tejido ^(4,5). El mayor grado de isquemia se produce en la zona de *core* o núcleo isquémico, donde irrigaba principalmente la arteria ocluida, mientras que la zona contigua que sufre menos falta de oxígeno es conocida como el área de penumbra isquémica. Esta zona es susceptible de recuperarse si la reperusión se produce pronto, pero en el caso contrario terminaría activando la cascada isquémica y produciendo gran parte de daño en los tejidos ⁽⁶⁾. El 15% restante de los ictus son de origen hemorrágico y se producen por la rotura de un vaso y la liberación de sangre a los tejidos contiguos ⁽⁴⁾.

Los principales síntomas del ictus son el entumecimiento súbito de un lado del cuerpo, la pérdida de visión en uno o ambos ojos, la dificultad al hablar o para comprender el lenguaje, cefalea y dificultad para la marcha ⁽⁷⁾. Algunos de los factores de riesgo de padecer esta patología son la edad, el tabaco, el alcohol, los factores psicosociales, la HTA, la fibrilación auricular, la hipercolesterolemia y la Diabetes Mellitus ⁽⁴⁾. El ictus es más común en varones que en mujeres, sin embargo esto se invierte a partir de los 85 años donde aparece más comúnmente en mujeres ⁽⁸⁾.

Al ser el ictus un proceso isquémico, el mejor tratamiento pasa por restablecer el flujo sanguíneo cerebral cuanto antes. En este caso se usan fármacos antitrombóticos para evitar la progresión del trombo (heparinas y antiagregantes plaquetarios como el Ácido Acetilsalicílico) y fármacos trombolíticos como el t-PA ⁽⁴⁾. Al igual que ocurre en el IAM, tras la reperusión se produce daño oxidativo de los tejidos, aumentando la probabilidad de que el paciente sufra efectos secundarios, por lo que es importante la búsqueda de fármacos neuroprotectores que bloqueen la cascada isquémica y retrasen la muerte celular.

3.2 Impacto y situación actual de las patologías

En la actualidad la primera causa de muerte en el mundo es la enfermedad isquémica coronaria, siendo responsable de un 15,96% de las muertes en 2017. Le sigue el ictus, que causó la muerte del 11,02% de la población mundial en el mismo año ⁽⁹⁾. Esta tendencia también se muestra en España donde al menos 14.521 personas fallecieron en 2018 por un infarto (de las cuales 40,36% eran mujeres y 59,64% eran hombres), y 2.348 lo hicieron a causa de un ictus (de las cuales 56,77% eran mujeres y 43,23% eran hombres) ⁽¹⁰⁾. A pesar de que las cifras de mortalidad por ambas patologías muestran tendencia a disminuir a lo largo de los años se estima que al menos un 80% de los infartos de miocardio y de accidentes cerebrovasculares podrían prevenirse ⁽¹¹⁾.

Sin embargo, las altas tasas de mortalidad de estas patologías no son solo el único motivo de su gran importancia. Para comprender el impacto del IAM y los ACV en la sociedad, y entender la necesidad de nuevos tratamientos que reduzcan el daño por isquemia-reperusión, se deben observar las cifras de morbilidad asociadas a estas patologías, ya que reflejan esa discapacidad que queda tras sufrir necrosis de los tejidos durante el infarto o ictus y la cual aún no puede disiparse por la falta de tratamientos eficaces.

En España durante el año 2017, la Tasa de Morbilidad asociada al infarto fue de 124 por cada 100.000 habitantes, produciéndose al menos 412.190 estancias hospitalarias por este motivo. En relación al ictus, la Tasa de Morbilidad fue de 229 por cada 100.000 habitantes, y se produjeron 1.439.961 estancias hospitalarias asociadas a ACV ⁽¹⁰⁾.

Tras observar los datos es necesaria la reflexión sobre dónde debe ubicarse la investigación para estas patologías. Parece claro que si se eliminasen los daños asociados a las terapias de reperusión, los datos de morbilidad y de frecuentación hospitalaria disminuirían notablemente, y consecuentemente lo haría la mortalidad. Por tanto, se considera que la introducción en la clínica de un tratamiento eficaz y seguro para estos daños oxidativos asociados generaría un gran impacto socioeconómico y sanitario muy beneficioso para la sociedad a nivel mundial, y por tanto es necesario.

3.3 Fisiopatología y rutas metabólicas implicadas en la isquemia

Tanto el infarto como el ictus producen a nivel celular la falta de oxígeno denominada hipoxia. La hipoxia o isquemia tisular lleva a la necrosis celular en los cardiomiocitos y en las neuronas, daño que resulta irreparable. Es por ello necesario el restablecimiento del flujo sanguíneo en cuanto sea posible, pero se ha demostrado que la reperusión conlleva además otros daños que condicionan la salud del paciente a largo plazo. Esto es conocido como daño por isquemia-reperusión y produce las altas tasas de morbilidad que se han comentado anteriormente, además de reducir la supervivencia de aquellos que han sufrido ya un ictus o infarto.

Este suceso motiva la búsqueda de nuevos tratamientos que se puedan aplicar justo antes del restablecimiento del flujo sanguíneo y que eviten ese daño. Lo que se pretende en este trabajo es exponer los tratamientos más prometedores de esta línea de investigación, pero para ello es necesario el conocimiento de los sucesos bioquímicos que conducen al daño oxidativo de los tejidos durante el proceso de isquemia-reperusión. A continuación se comentan las rutas bioquímicas más relevantes que ocurren a nivel mitocondrial mientras se producen los infartos e ictus.

¿Por qué se buscan dianas a nivel mitocondrial?

El orgánulo celular que mayormente se ve afectado por la situación de hipoxia, es la mitocondria. En ella se encuentra la cadena respiratoria, donde se produce el transporte de electrones que en última instancia genera energía necesaria para que funcionen muchas otras rutas. También en la mitocondria se generan las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), por tanto es donde se deberá de acceder para evitarlas. El cómo se generan estas es un enigma que aún no está completamente claro, sin embargo se conocen algunas rutas definitivas.

En situación de normoxia, los electrones de la cadena respiratoria van pasando de complejo en complejo hasta transferirse finalmente al oxígeno molecular (O_2) que se reduce hasta formar una molécula de agua (H_2O). En una situación de hipoxia existe un desequilibrio entre la entrada de electrones y la transferencia de estos. Es posible que el radical semiquinona transfiera un electrón al oxígeno reduciéndolo de forma incompleta y formando así el radical superóxido ($\cdot O_2^-$), u otros como el radical hidroxilo ($\cdot OH$), o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2)⁽¹²⁾.

En condiciones normales se genera una pequeña cantidad de ROS, pero es tan mínima que los antioxidantes del organismo la eliminan sin problema. Sin embargo, cuando la concentración de ROS es muy elevada, estas especies comienzan a producir daño celular (como la oxidación de proteínas, la oxidación de los ácidos nucleicos, la peroxidación lipídica...) que puede ser irreversible⁽¹³⁾.

Para intentar eliminar o contrarrestar el efecto de las ROS existen algunos sistemas en el organismo que funcionan más intensamente durante los procesos hipóxicos. Son numerosas las vías que se activan en esta situación, pero se detallarán las que afectan a nivel mitocondrial:

- **HIF-1**

La hipoxia celular produce el aumento de transcripción de HIF-1⁽¹⁴⁾. Este factor conocido como el Factor Inducible por Hipoxia, produce a su vez el aumento de transportadores de glucosa para aumentar este metabolito y suplir la falta de ATP a través de la glucólisis, con la consecuente elevación de lactato y la disminución del pH. La presencia de HIF-1, produce el aumento de transcripción de la piruvato deshidrogenasa quinasa que fosforila a la piruvato deshidrogenasa, impiendiendo que el piruvato producido en la glucólisis se transforme en Acetil-CoA con normalidad, lo que enlentece el Ciclo del Ácido Cítrico (CAC). Este enlentecimiento resulta beneficioso porque al reducirse el flujo de electrones en la cadena respiratoria, se disminuye a su vez la producción de ROS⁽¹²⁾.

Por otra parte, el HIF-1, aumenta la transcripción de una proteasa que degrada la subunidad COX 4-1 del complejo IV de la cadena respiratoria. En lugar de esta se aumenta la transcripción de COX 4-2, que hace que el complejo IV esté mejor adaptado a las condiciones hipóxicas⁽¹²⁾.

- **Sistemas enzimáticos**

Existen al menos tres enzimas que protegen las células de las ROS: la Superóxido Dismutasa (SOD) que transforma dos moléculas de radicales superóxido en una de oxígeno molecular y otra de peróxido de hidrógeno(1), la Catalasa que reduce el peróxido de hidrógeno a agua(2) y la Glutation Peroxidasa (GPX) que produce la reducción de distintos radicales con ayuda del Glutation reducido (GSH), un aceptor de hidrógeno que actúa como reductor y regenera la glutatión reductasa (3). Su actividad está regula por la relación GSH/GSSG como se puede apreciar en la *Figura 1*. Esta tríada enzimática, presente tanto en el citosol como en la mitocondria, impide los posibles daños derivados disminuyendo la cantidad de ROS en el organismo⁽¹³⁾.

- (1) $2 \cdot O_2^- + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
- (2) $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$
- (3) $2 G-SH + H_2O_2 \rightarrow GS-SG + H_2O$

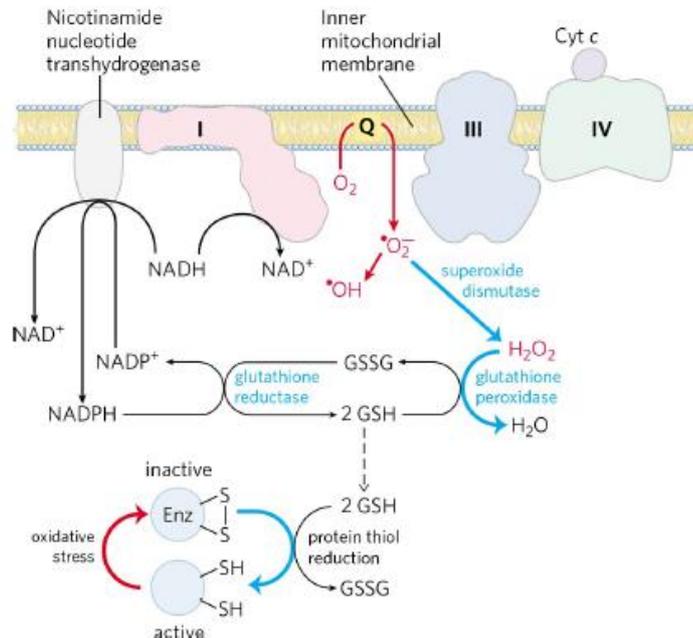


Figura 1-Sistemas enzimáticos en la eliminación de ROS, tomada de (15).

Daño por isquemia-reperfusión

• Isquemia

Cuando disminuye la concentración de oxígeno celular, la transferencia de electrones por la cadena respiratoria hasta el oxígeno y su consecuente bombeo de protones hacia el espacio intermembranoso de la mitocondria se ve paralizado. Esto produce la disminución de la fuerza motriz, ocasionando que la ATPsintasa no pueda introducir protones al interior de la matriz mitocondrial y en vez de producir ATP, comience a hidrolizarlo funcionando como ATPasa. Además, debido a la falta de oxígeno, la célula comienza a ejecutar la glucólisis anaeróbica, por la cual aumentan los subproductos como el ácido pirúvico y el ácido láctico que generan una disminución del pH tanto en la matriz mitocondrial como en el citosol celular. Sin embargo, esta disminución del pH produce la dimerización de la proteína IF1, que consigue inhibir la actividad ATPasa de la ATPsintasa, generando así un feedback positivo ⁽¹⁶⁾.

En los cardiomiocitos se produce un aumento de sodio por el fallo de la bomba Na^+/K^+ del sarcolema que no puede actuar por la falta de energía. El organismo busca normalizar el pH a través de la bomba NHE (Na^+/H^+), por la cual se eliminan protones al exterior celular a cambio de introducir sodio en el citoplasma, y por el cotransportador Na^+/HCO_3^- que también introduce sodio en el citoplasma ⁽¹⁷⁾. Esta acumulación de sodio activa a su vez la bomba NCX en dirección inversa (Na^+/Ca^{2+}), por tanto en vez de introducirse sodio, este sale al exterior de la célula, y en lugar de salir calcio, este se introduce al interior de la misma comenzando el calcio a acumularse en el citoplasma. Por otra parte, la falta de energía impide que la bomba SERCA ($Ca^{2+}/ATPasa$) introduzca el calcio citoplasmático en el retículo sarcoplásmico, contribuyendo a aumentar la concentración citosólica de calcio e impidiendo la relajación de las células. Esto produce la hipercontractura de los cardiomiocitos, que se propaga de célula en célula, aumentando así el tamaño de infarto ⁽¹⁸⁾.

En las neuronas también se produce la acumulación de sodio y en consecuencia se despolariza la membrana. Se activan los canales de calcio dependientes de voltaje que introducen calcio a la célula, y el NCX en su modo inverso, introduciendo calcio también a la vez que saca el sodio fuera de la neurona ⁽¹⁹⁾. La entrada masiva de calcio en la célula produce la liberación a la hendidura sináptica de glutamato en grandes cantidades. El neurotransmisor sobreestimula los receptores NMDA y AMPA de la neurona postsináptica produciéndose la entrada de sodio y calcio a la neurona. Este proceso que se transmite de una neurona a otra es conocido como Excitotoxicidad por glutamato y es el causante de producir la muerte celular en el tejido cerebral, agrandando el área de penumbra en el ictus ⁽²⁰⁾.

Durante la isquemia, en ambos tipos celulares se acumulan los productos finales metabólicos como la hipoxantina y la xantina, que no contribuyen al metabolismo mitocondrial, o el succinato, que es un intermediario del CAC y será una importante diana terapéutica ⁽¹⁸⁾.

- **Reperusión**

Al restablecerse el flujo sanguíneo se restaura a su vez la transmisión de electrones en la cadena respiratoria, normalizándose el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) ⁽²¹⁾. Este suceso junto con la alta concentración de calcio citosólico produce el estímulo necesario para que el calcio atraviese la membrana mitocondrial interna (IMM) gracias a la apertura del uniportador de calcio MCU, formándose acúmulos de calcio mitocondriales. Junto con las altas concentraciones de sodio citoplasmático y el calcio mitocondrial se activa el intercambiador NCLX, que introduce sodio a la mitocondria mientras expulsa calcio al citosol.

En este punto comienza a producirse la reducción incompleta del oxígeno, generándose una gran cantidad de ROS, sobretodo en el complejo I de la cadena respiratoria. El pH se normaliza y en consecuencia empieza a producirse la apertura del Poro de Transición de Permeabilidad mitocondrial (mPTP) ⁽²²⁾, lo que genera que la membrana interna mitocondrial no pueda seguir siendo una barrera para los protones u otros iones, derivando en un colapso del $\Delta\Psi_m$ y la posterior inflamación de la mitocondria que lleva a la necrosis celular. También se libera el citocromo c de la membrana mitocondrial interna al citosol, donde activa las caspasas y su vía apoptótica generando así la apoptosis celular. De esta manera se produce la muerte de las células en los primeros minutos de reperusión ⁽¹⁸⁾.

4. OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo es la búsqueda de dianas terapéuticas mitocondriales que puedan ser efectivas en la disminución del daño oxidativo que se produce al restaurarse el oxígeno en los tejidos tras una isquemia ocasionada por un infarto o un ictus.

Se pretende resumir las dianas más relevantes y los fármacos asociados a estas, exponiendo su utilidad en el tratamiento de las patologías. Para ello se quiere establecer en qué punto de la investigación se encuentran, buscando los posibles experimentos o ensayos clínicos llevados a cabo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la elaboración del presente documento se ha llevado a cabo una amplia búsqueda bibliográfica eligiendo los datos más actualizados y fiables. Para ello se han usado bases de datos como *Pubmed* o *Google Scholar*. También se han usado libros sobre bioquímica para establecer la bases de la isquemia-reperusión y guías terapéuticas clínicas para el estudio de las patologías.

Además, se han usado páginas web como *ClinicalTrials.gov* para la búsqueda de ensayos clínicos en curso o acabados, y *Espacenet* o *Patentscope* como bases de datos para la búsqueda de patentes en curso.

Los datos de carácter estadístico se han buscado en la base de datos del *Instituto Nacional de Estadística (INE)* o en la del *Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME)*.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DIANAS TERAPÉUTICAS MITOCONDRIALES:

6.1 *Complejo I de la cadena respiratoria*

El complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, también conocido como NADH deshidrogenasa, transfiere electrones del NADH a la ubiquinona a la vez que expulsa protones al espacio intermembranoso. Estas reacciones se producen mientras el complejo se encuentra en su forma activa (A), pero ante la falta de oxígeno estas dejan de suceder y la enzima pasa a la conformación inactiva (D, de *dormant*), exponiendo un residuo -SH de la Cys39 presente en la subunidad ND3 del complejo ⁽²³⁾.

Si se consigue inhibir reversiblemente a la enzima en su estado inactivo se enlentece la activación del complejo I durante los primeros minutos de la reperfusión. Esto paraliza el flujo de electrones en la cadena respiratoria y disminuye notablemente la producción de ROS, reduciendo en gran parte el daño oxidativo ⁽²³⁾.

Una de las moléculas probadas con este fin es el MitoSNO (S-nitrosotiol dirigido a mitocondrias), que contiene un resto S-nitrosante unido a un catión trifenilfosfonio, para permitir la entrada de la molécula a la mitocondria. Se ha estudiado su acción protectora *in vivo* en modelo de infarto de miocardio, exponiendo a un grupo de ratones a la oclusión de la arteria coronaria descendente anterior izquierda. Esta molécula interacciona con la Cys39 del complejo I, que solo está presente en hipoxia, bloqueando el complejo en su estado de baja actividad, lo que permite disminuir la producción de ROS durante la reperfusión. Concretamente se produce la interrupción de la interacción entre el complejo I y la ubiquinona ⁽²⁴⁾.

Para comprobar que el MitoSNO produce la S-nitrosación en la mitocondria y no en cualquier otra localización subcelular se realizó un experimento donde se provocaba la isquemia en un grupo de ratones. Justo antes de la reperfusión se inyectó por vía intravenosa MitoSNO a una mitad del grupo, y a la otra SNAP (S-nitroso-N-acetilpenicilamina), que es otro agente S-nitrosante no dirigido a la mitocondria. Se comprobó, usando una sonda de fluorescencia roja, que solo se produce la nitrosación mitocondrial en el grupo de ratones tratados con MitoSNO ⁽²⁴⁾. En la *Figura 2.A)* se observa la reducción selectiva de proteínas en presencia de MitoSNO o SNAP y la carga proteica en geles de electroforesis con tinción Coomassie.

Cuando se expuso a los ratones a 30 minutos de isquemia seguidos de 5 minutos de reperfusión con MitoSNO y sin esta, se observó que la actividad del complejo I disminuye en las mitocondrias de los cardiomiocitos del grupo de ratones tratados con MitoSNO. Esta actividad se normaliza a los 30 minutos usando cobre y ascorbato, lo que prueba que se trata de una S-nitrosación reversible ⁽²⁴⁾. En la *Figura 2.B)* se observan estos resultados.

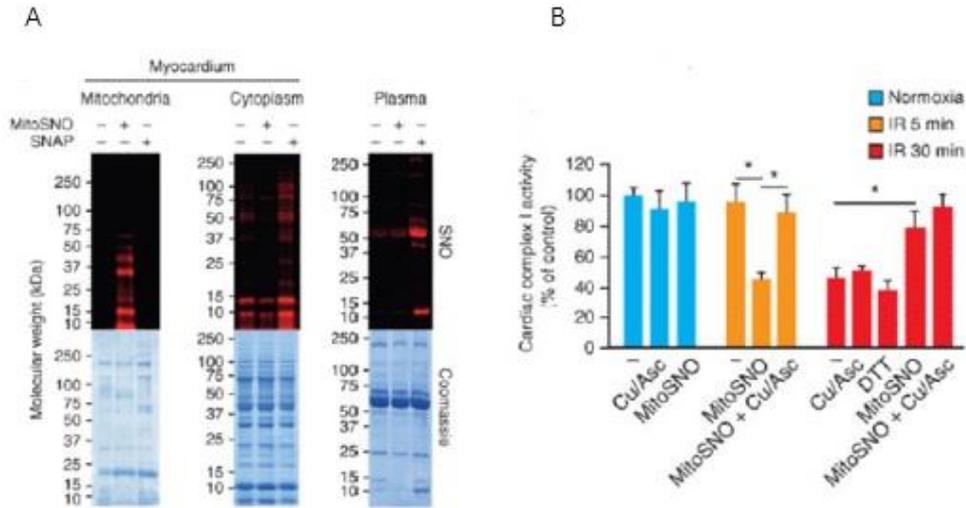


Figura 2-Estudios del efecto de MitoSNO (donde *P<0.05), tomada de (24). 2.A) Se observa la reducción selectiva de proteínas en presencia de MitoSNO o SNAP detectadas por la sonda fluorescente en distintas localizaciones celulares y la carga proteica en geles de electroforesis con tinción Coomassie. 2.B) Se observa disminución de la actividad del complejo I en presencia de MitoSNO, y la reversibilidad de los efectos en presencia de Cu/Asc

También se realizó un estudio en ratones, en el que se pretendía elucidar si la administración de MitoSNO consigue reducir el tamaño del infarto tras 24 horas de su administración y protege a largo plazo del fallo cardíaco tras un IAM⁽²⁵⁾. Se expuso a un grupo de ratones a 30 minutos de isquemia y 5 minutos antes de la reperfusión se les administró un bolo de MitoSNO (100ng/Kg) y una infusión intravenosa (1ng/Kg/min) que se prolongó hasta 20 minutos después de haber comenzado la reperfusión. A las 24 horas del experimento se comprobó que la troponina liberada es significativamente menor en los ratones tratados, tal y como se observa en la *Figura 3.A)*. Para observar qué ocurría a largo plazo se determinó la FEVI (fracción de eyección del ventrículo izquierdo) a los 28 días. Este parámetro indica cómo de fuerte se contrae el ventrículo cardíaco y cuanto más alto sea su valor, más sano está el corazón. Como se puede observar en la *Figura 3.B)*, el MitoSNO mejoró significativamente este valor.

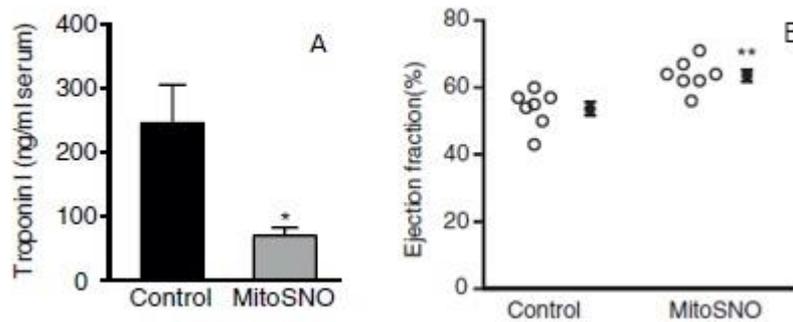


Figura 3-Efecto de MitoSNO en la cardioprotección a largo plazo (donde *P<0.05, **P<0.001), tomada de (25). 3.A) Disminución de troponinas en animales tratados. 3.B) Aumento de la fracción de eyección en animales tratados.

La acción del MitoSNO ha sido probada en un modelo de daño por isquemia-reperfusión cerebral en ratones, y los resultados son igual de positivos, lo que demuestra que la molécula es útil en el ictus⁽²⁶⁾.

Aunque actualmente no existe ningún ensayo clínico en curso para humanos de esta molécula, podría ser una vía farmacológica muy prometedora para la protección de los cardiomiocitos y las neuronas. Su gran importancia reside en que puede administrarse una vez ha comenzado la isquemia, es decir una vez ha comenzado el infarto o el ictus. Además, sus efectos son reversibles y no produce variaciones importantes en los parámetros hemodinámicos.

Otro fármaco que también bloquea el complejo I, disminuyendo la producción de ROS y protegiendo así del daño oxidativo es el Amobarbital. Sin embargo, y aunque se ha demostrado su acción en animales, algunos estudios apuntan que solo es efectivo si se administra antes de la isquemia⁽²⁷⁾ y otros experimentos afirman que tiene efectividad cuando se aplica justo antes de la reperfusión⁽²⁸⁾. Por este motivo entre otros no se considera tan útil como el MitoSNO.

6.2 Complejo II de la cadena respiratoria

El complejo II de la cadena respiratoria también se conoce como Succinato Deshidrogenasa (SDH). Oxida el succinato a fumarato y con los electrones obtenidos en esa cadena de reacciones intermedia reduce la ubiquinona a ubiquinol que se desplaza por la membrana para transportar los electrones al complejo III.

Para determinar qué cambios afectan a este complejo durante la hipoxia se llevó a cabo un experimento donde se realizó una cromatografía líquida acoplada a una espectroscopia de masas en el cerebro, riñón, hígado y corazón de ratones sometidos a isquemia *in vivo*. En esta prueba se caracterizaron tres metabolitos que aumentaban su concentración en todos estos tejidos durante la isquemia: la xantina y la hipoxantina, que son productos de degradación de nucleótidos de purina, y el succinato, que es un intermediario del CAC y es el sustrato del Complejo II. Se determinó que tras 5 minutos de reperfusión todo el succinato acumulado se oxidaba rápidamente restaurándose los niveles normales a la vez que aumentaba la producción de ROS. Se quiso establecer el origen de la acumulación de succinato, estudiando las posibles fuentes del metabolito como la vía α -cetoglutarato o la vía dependiente del GABA. Sin embargo, al inhibir estas vías no se evitaba el aumento del succinato durante la isquemia, lo que llevó a pensar que debía producirse por la acción reversa de la succinato deshidrogenasa, es decir el fumarato se reduce a succinato ante la falta de oxígeno^(18,29)

Si la SDH funciona en el sentido inverso durante la isquemia, entonces es necesario una gran fuente de fumarato, que puede provenir de la lanzadera malato/aspartato (MAS) o del Ciclo de Nucleótidos de Purina dependiente de AMP (PNC). Se probó a inhibir estas vías bloqueando la aspartato aminotransferasa que interviene en MAS y la adenilosuccinato liasa que interviene en PNC y como resultado el succinato se acumulaba en menor medida durante la isquemia, por tanto se concluyó que ambas vías son las responsables de aumentar el fumarato que se convierte a succinato por acción inversa de la SDH durante la isquemia^(18,29). Posteriores estudios demostraron la acumulación de succinato en los músculos papilares de conejos⁽³⁰⁾ y en el corazón aislado de ratones⁽³¹⁾.

Por otra parte, parece que durante la reperfusión la oxidación de todo el succinato acumulado aumenta el potencial de membrana, y genera una sobrecarga del complejo III que no es capaz de consumir todos los electrones que le llegan. La síntesis de ATP sigue comprometida y esto conduce a que el exceso de electrones se vea forzado a ir hacia atrás en la cadena respiratoria llegando al complejo I donde se produce una liberación masiva de ROS. Este fenómeno se conoce como Transporte Reverso de Electrones (RET)⁽¹⁸⁾.

Por tanto, si se consigue prevenir la acumulación del succinato durante la isquemia se protege a los tejidos de sufrir daño oxidativo durante la reperfusión. Es por ello por lo que se han probado varios inhibidores de la SDH.

El malonato se probó en un modelo de isquemia-reperfusión cardíaca *in vivo* en ratones y en otro de isquemia-reperfusión cerebral *in vivo* en ratas. En ambos se inyectó a los animales dimetil malonato unos minutos antes de la isquemia, y se comprobó que este disminuía significativamente la acumulación de succinato y con ello el tamaño del infarto o del ictus, frente a los grupos control. Esto se observa en la Figura 4.

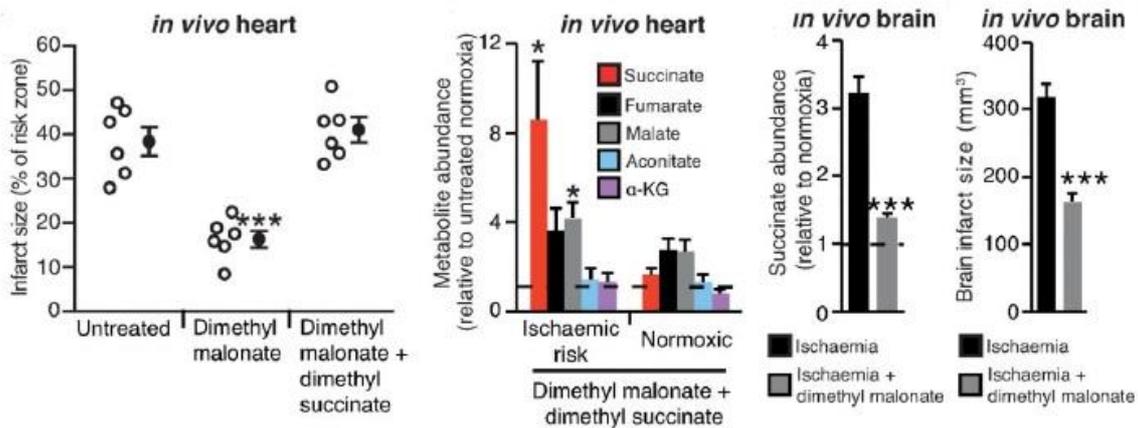


Figura 4-Resultados de experimentos *in vivo* en corazón y cerebro (donde * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$), tomada de (29). Las gráficas demuestran que en presencia de malonato se reduce la abundancia de succinato, y el tamaño de infarto/ictus.

En otro estudio en corazones aislados de ratones se les sometió a 30 minutos de isquemia y 60 minutos de reperfusión, administrándoles malonato disódico a un grupo antes de la isquemia en concentraciones de 1, 3 y 10mmol/L y al otro justo antes de la reperfusión en concentración de 3 mmol/L. Se observó una disminución significativa del tamaño de infarto en los ratones que habían recibido dosis de 3 y 10mmol/L antes de la isquemia, y en los que lo habían recibido al inicio de la reperfusión. Esto significa que el malonato produce cardioprotección tanto si se aplica antes de la isquemia como si se aplica durante la reperfusión. Además, se demostró que el tratamiento con 3mmol/L de malonato disódico recuperaba la presión desarrollada del ventrículo izquierdo, demostrando una mejora en el tejido ⁽³²⁾.

Aunque la acción del malonato es reversible, su administración sistémica puede resultar tóxica en animales. Esto motivó un experimento donde se administraba a cerdos malonato disódico por vía intracoronaria, evitando así los posibles efectos en otros tejidos. Su administración previa a la reperfusión en un modelo de isquemia-reperfusión demostró la disminución de las ROS sin producir variaciones en las arritmias por reperfusión ⁽³³⁾.

Los resultados positivos del malonato llevaron a usarlo en combinación con estrategias no farmacológicas para buscar un efecto sinérgico. Se probó la administración de dimetil malonato en conejos sometidos a hipotermia de 32°C durante la isquemia, lo cual resultó en una mayor disminución del succinato acumulado y una menor producción de ROS ⁽³⁴⁾.

Otra estrategia fue usar el fármaco a la vez que se induce el preconditionamiento isquémico. Esta técnica trata de someter al paciente a repetidos episodios de isquemia breves intercalando con episodios de reperfusión, y ha demostrado disminuir la necrosis en los tejidos ⁽³⁵⁾. El uso del malonato y preconditionamiento isquémico resulta tan prometedor que se ha realizado un ensayo clínico usando ambos para determinar el papel de la respiración mitocondrial en los tejidos de pacientes diabéticos antes y después de la isquemia, administrándoles ambos tratamientos, aunque aún no se han presentado resultados ⁽³⁶⁾.

6.3 Intercambiador NCLX

En la membrana interna mitocondrial está ubicado el intercambiador NCLX, que introduce a la matriz mitocondrial sodio o litio mientras expulsa calcio al espacio intermembranoso. Contiene dos dominios transmembrana denominados $\alpha 1$ y $\alpha 2$ donde se unen los iones que van a ser transportados ⁽³⁷⁾.

Durante la hipoxia, en el complejo I se produce la transición al estado D y se acidifica la matriz mitocondrial. Esta variación de pH resulta suficiente para solubilizar unos precipitados de fosfato cálcico que existen en la matriz mitocondrial. Estos precipitados son la principal fuente de calcio mitocondrial dado que se ha probado a inhibir MCU, y la concentración de calcio sigue siendo elevada, lo que significa que el calcio ya estaba en la mitocondria con anterioridad, almacenado en esos precipitados ⁽³⁸⁾.

Al disolverse el fosfato cálcico aumenta la concentración de calcio mitocondrial y esto activa el intercambiador NCLX que introduce tres moléculas de sodio a la mitocondria por cada molécula de calcio que transporta al citosol ⁽³⁷⁾. Se genera una alta concentración de sodio mitocondrial que interacciona con los fosfolípidos de la membrana, uniéndose a la fosfatidilcolina por su grupo carbonilo y ocasionando una disminución en la fluidez de la IMM, que impide la movilidad de la ubiquinona entre el complejo II y III. Esto conlleva la ralentización en la transferencia de electrones y con ello la producción de ROS por el complejo III, generando la muerte celular que daña permanentemente los tejidos en un infarto o ictus ⁽³⁸⁾.

Por todo esto, se contempla que la inhibición del NCLX disminuya el daño oxidativo al evitar que se aumenten los niveles de sodio y por tanto no se pueda modificar la fluidez de la membrana. Es por ello que el intercambiador se considera una buena diana terapéutica.

Una molécula que actúa sobre esta diana es el CGP-37157, que es en realidad el 7-cloro-5-(2-clorofenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-ona. Su estructura es muy parecida a la del Diltiazem (que inhibe el NCLX y los canales tipo L de calcio) o el Clonazepam (que ha demostrado ser un fármaco cardioprotector en cardiomiocitos aislados por su efecto inhibitorio sobre NCLX) ⁽³⁹⁾. Sin embargo, esta molécula es más potente que las anteriores y necesita menos dosis para producir su efecto, lo que reduce los posibles efectos secundarios. Al ser lipofílica atraviesa sin problemas las membranas e inhibe el NCLX de una manera dosis dependiente, alcanzado la IC_{50} con tan solo $0,36\mu M$ en mitocondrias cardíacas aisladas, tal y como se observa en la *Figura 5*. La dosis necesaria para bloquear el intercambiador *in vitro* es de $10\mu M$ ⁽⁴⁰⁾.

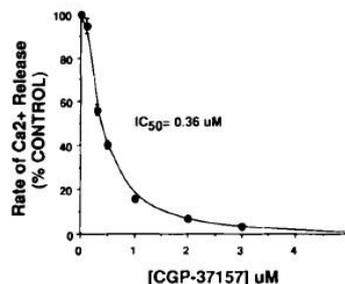


Figura 5-Disminución de la liberación de Ca^{2+} en presencia del inhibidor del NCLX, tomada de (40). Donde el 100% es la tasa máxima de liberación de calcio al citosol en el grupo control.

Al administrar el fármaco los niveles de calcio se estabilizan permitiendo el mantenimiento del potencial redox NADPH/NADP, restableciéndose la producción de ATP por el proceso de fosforilación oxidativa y neutralizándose las ROS producidas ⁽⁴¹⁾, tal y como se observa en la *Figura 6*.

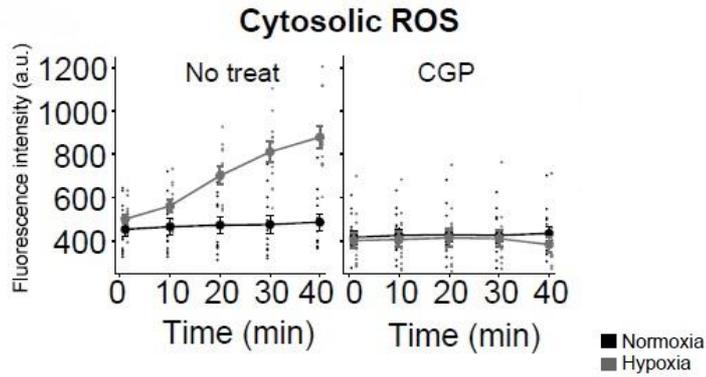


Figura 6-Detección de ROS con microscopia de fluorescencia en células vivas tratadas y no tratadas, tomada de (38). Se observa una disminución de la producción de ROS en células tratadas con CGP-37157.

Otro estudio sobre su efecto en los cardiomiocitos fue llevado a cabo en cerdos. A estos se les sometía a 60 minutos de isquemia y 120 minutos de reperfusión. La mitad de los animales recibía la infusión intracoronaria de CGP-37157 justo antes de la isquemia -Figura 7.a)- y la otra mitad la recibía justo antes de la reperfusión -Figura 7.b)-. En ambos grupos se detectó una disminución del tamaño de infarto frente al grupo control, pero no se consideró significativa. Sin embargo, en el grupo donde se administró el fármaco justo antes de la reperfusión se observó una resolución acelerada del segmento ST -Figura 7.d)- frente a los animales en los que se administró CGP-37157 antes de la isquemia -Figura 7.c)-.

Finalmente se concluyó que al no disminuir significativamente el tamaño de infarto no se podía dictaminar que el CGP-37157 fuese cardioprotector, pero al reducir significativamente el tiempo de resolución del segmento ST (predictor de la mortalidad post-infarto) la molécula puede funcionar como supresor de arritmias en el corazón dañado ⁽⁴¹⁾.

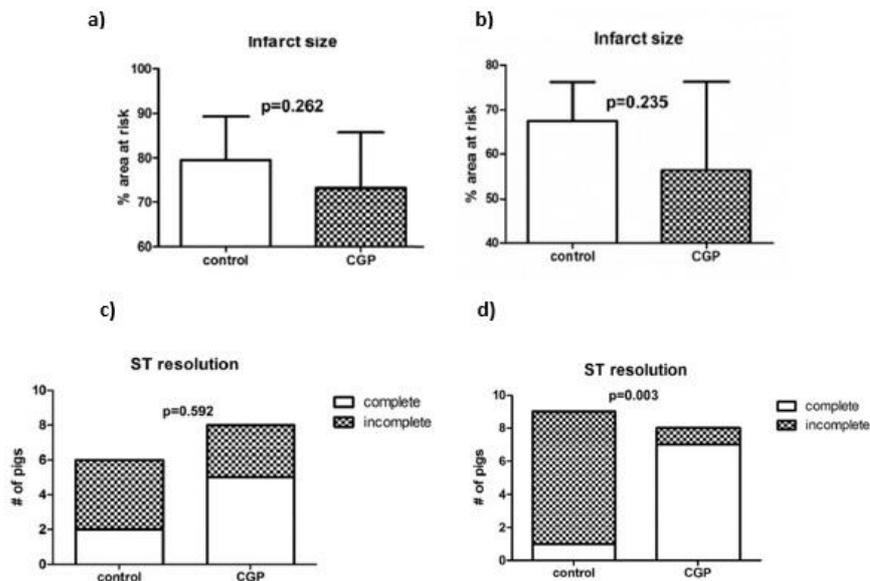


Figura 7-Disminución del tamaño de infarto y resolución del ST en animales tratados vs control, tomada de (41). Resultados del estudio modelo isquemia-reperfusión en cardiomiocitos de cerdos.

Esta molécula también se ha probado en un modelo de daño neuronal *in vitro*, con neuronas corticales de rata. En este estudio no solo se confirmaba su eficacia como inhibidor del NCLX si no que se probó que es capaz de inhibir los canales de calcio dependientes de voltaje de la célula previniendo el fenómeno de excitotoxicidad neuronal, y con ello la muerte celular. Se confirmó que la producción de ROS disminuye alrededor de un 52% en el grupo de neuronas pre-incubadas con CGP-37157 frente al grupo control ⁽⁴²⁾. De esta manera ofrece

neuroprotección modulando la homeostasis del calcio a través de dos dianas simultáneamente, previene de la excitotoxicidad y del daño oxidativo.

A pesar de sus resultados positivos en la actualidad no existen ensayos clínicos en curso para esta molécula.

6.4 Uniportador MCU

El uniportador de calcio conocido como MCU es un canal ubicado en la membrana mitocondrial interna y funciona como una vía de entrada de calcio a la mitocondria. Está compuesto por la subunidad M_{cu}, que es la formadora del poro y que contiene sus dominios N y C terminales orientados hacia la matriz mitocondrial. Además, los dominios transmembrana TM1 y TM2 confieren una conformación tetramérica. La entrada de calcio está regulada por las proteínas MICU1, MICU2 y EMRE de la siguiente manera: cuando la concentración citosólica de calcio es muy elevada MICU1 y MICU2 se disocian dejando libre el canal para que pase el calcio, sin embargo, cuando el calcio mitocondrial se une a los dominios terminales del canal, se produce la señal para cambiar de nuevo la conformación de las proteínas MICU1 y MICU2, impidiendo el paso de calcio hacia la mitocondria ⁽⁴³⁾.

En los procesos de isquemia-reperfusión se produce la apertura de este canal, produciéndose un aumento de la concentración de calcio mitocondrial que colapsa el potencial de membrana de la mitocondria, abre el mPTP y activa las vías de apoptosis o necrosis. Por tanto, una posibilidad para evitar la muerte celular es la inhibición de esta entrada de calcio a la mitocondria.

Recientemente se ha descubierto el gen que codifica la porción formadora del canal, y esto ha permitido la realización de estudios experimentales a partir del uso de animales a los que se les ha eliminado el canal MCU genéticamente. En estos experimentos se usaron ratones modificados genéticamente y obtenidos a través de cruces, que no presentan el gen que codifica para MCU ($MCU^{fl/fl}$ -MCU). Se comprobó que en estos animales disminuía la entrada de calcio a la mitocondria en comparación con los controles ($MCU^{fl/fl}$), como se puede observar en la *Figura 8*. Además, se descubrió que la delección de MCU reduce la expresión del receptor NCLX ⁽⁴⁴⁾.

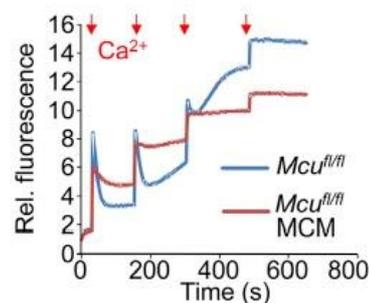


Figura 8- Representación de la entrada de calcio mitocondrial, tomada de (44). Medida de fluorescencia frente al tiempo, tras repetidas administraciones de calcio.

Se expuso a estos animales a un modelo de isquemia-reperfusión cardíaca *in vivo*. Tras 40 minutos de isquemia y 24 horas de perfusión se valoró el tamaño de infarto del ventrículo izquierdo con azul de Evans, observándose una reducción del 45% en el tamaño de infarto en los animales $MCU^{fl/fl}$ -MCU. Además, se contabilizó la concentración de troponinas en suero de los ratones un día después de que acabase la perfusión y esta se había reducido en torno a un 65% en los ratones sin MCU ⁽⁴⁵⁾.

Esto prueba que la ausencia de MCU en los cardiomiocitos realmente previene la apertura del mPTP mediada por la entrada de calcio a la mitocondria. Dado que en los humanos no se puede llevar a cabo la deleción genética del uniportador, se comenzó con la búsqueda de fármacos que pudiesen inhibir el canal.

En esta línea se descubrió el Ru360, un derivado del Rojo de Rutenio que consta de dos átomos de rutenio unidos a un oxígeno y rodeados de grupos amino, y presenta una gran absorbancia en 360nm. Esta molécula alcanza rápidamente la superficie de los cardiomiocitos, pero pasa muy lentamente a su interior, donde interacciona con el residuo de Ser259, inhibiendo parcialmente la MCU.

Para comprobar su acción se llevó a cabo un estudio en modelo de isquemia-reperfusión cardíaca *in vivo* en ratas. En el experimento se sometió a los animales a 5 minutos de isquemia seguidos de 5 minutos de perfusión inyectándoles un bolo de Ru360, 30 minutos antes de la isquemia y se comprobó que desaparecía la fibrilación ventricular en dosis de entre 25 y 50nmol/Kg. Debido a que la fibrilación ventricular se produce por las sobrecargas de calcio se concluyó que el Ru360 impide la acumulación de calcio en la mitocondria, y gracias a esto evita la apertura del mPTP, disminuyendo los daños producidos por la perfusión ⁽⁴⁶⁾.

Sin embargo, la poca permeabilidad del fármaco en células intactas y el bajo rendimiento de su proceso de síntesis motivaron la búsqueda de otros compuestos. Así se descubrió el Ru265, que no presenta oxígeno en su estructura sino un nitrógeno. Este compuesto tiene mucha más capacidad para atravesar la membrana celular y llegar al canal MCU donde actúa uniéndose a un residuo de Cys97. Se ha demostrado su capacidad de inhibición del MCU *in vitro* y la capacidad de evitar la apertura del mPTP. Además, su ruta de síntesis es más sencilla y no requiere de procesos de purificación, lo que genera importantes ahorros a la hora de su producción a gran escala ⁽⁴³⁾.

Para aclarar diferencias en su acción celular se realizó una comparativa de Ru360 y Ru265 (C-2 en la Figura 9). En la figura se pueden observar los resultados de este estudio, donde se concluyó que Ru265 disminuye en mayor medida la entrada de calcio a la mitocondria. Ninguno de los derivados de rutenio varía significativamente el flujo de salida de calcio de la célula, lo que se comprueba inhibiendo en las células el canal NCLX con CGP-37157 sin observarse cambios significativos. Esto confirma que tanto Ru265 como Ru360 actúan inhibiendo solo MCU. En el mismo estudio se consideró a Ru265 menos tóxico y al menos 10 veces más efectivo que Ru360 ⁽⁴³⁾.

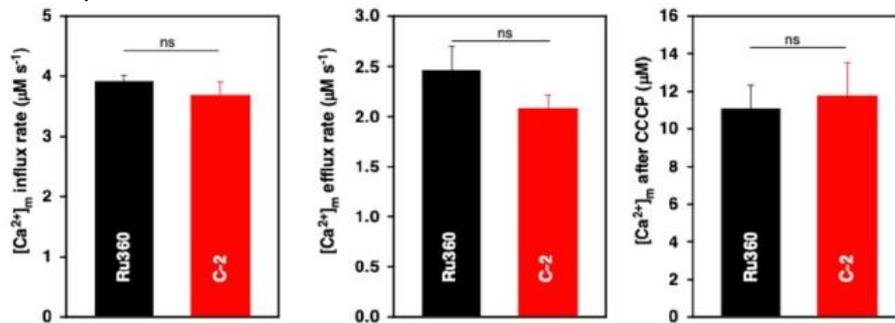


Figura 9-Comparativa entre Ru360 y Ru265, tomada de (43). Diferencia entre las tasas de entrada y salida de calcio, y la concentración de calcio mitocondrial tras tratamiento con GCP-37157.

Recientemente se ha realizado un experimento para comprobar la utilidad de ambos inhibidores en el daño por isquemia-reperfusión cerebral. El estudio se llevó a cabo en neuronas corticales de ratón sometidas a la privación de oxígeno y glucosa. Se administró Ru265 en tres dosis distintas (3, 10, 30mg/Kg) para determinar la dosis más efectiva que no presentase efectos secundarios. Las conclusiones fueron que el fármaco debe administrarse

30 minutos antes de la hipoxia para que sea efectivo. A pesar de que se demostró que Ru265 conserva la respiración mitocondrial e inhibe la activación de las calpaínas en neuronas corticales de ratón, en las dosis 10, 30mg/Kg aparecieron convulsiones de una manera dosis dependiente. Por tanto, se concluyó que la dosis más segura es la de 3mg/Kg, con la cual disminuyen los déficits sensoriales y motores derivados del daño oxidativo durante un ictus, sin aparecer convulsiones ⁽⁴⁷⁾.

Aunque los resultados de todos estos experimentos son muy prometedores, ninguna de estas moléculas se ha ensayado en humanos, ya que su administración debe hacerse antes de la hipoxia para que el fármaco sea efectivo y eso reduce su utilidad para el ictus y el infarto, que aparecen de manera impredecible.

6.5 Poro de transición de permeabilidad mitocondrial

El mPTP es un megacanal ensamblado en la IMM. Aunque algunos estudios reflejan que existe en condiciones fisiológicas para expulsar calcio y así mantener la homeostasis ⁽⁴⁸⁾ otros afirman que solo aparece durante los procesos de isquemia-reperfusión ⁽⁴⁹⁾. Ambas teorías coinciden en que ante estas circunstancias el poro cambia la permeabilidad de la membrana mitocondrial, lo que permite la entrada de protones que colapsan el potencial de la membrana y desacoplan la fosforilación oxidativa, y de solutos o agua, que hinchan la mitocondria rompiéndola, produciendo la necrosis celular. La apertura del canal también es un estímulo para la liberación de factores que activan la apoptosis ⁽⁴⁹⁾.

Los factores que llevan al ensamblaje del poro y su aumento de tamaño son: 1) la disminución de ATP, por el déficit de electrones en la cadena respiratoria y su hidrólisis a ADP, lo cual aumenta el fosfato inorgánico que activa el poro en presencia de calcio; 2) el aumento de calcio en la matriz mitocondrial que se produce a causa del MCU; 3) la gran cantidad de ROS que se producen durante la reperfusión; 4) la normalización del pH, pues parece que la acidez que se produce durante la isquemia mantiene el poro cerrado, pero cuando esta se corrige actúa como señal de su apertura ⁽⁴⁹⁾.

Aunque se han llevado a cabo múltiples experimentos no se ha conseguido dilucidar cuál es la estructura exacta del canal y qué componentes lo forman. Una posibilidad es que las proteínas que forman el poro sean monómeros de la ATPsintasa y se activen con bajas cantidades de calcio ⁽⁵⁰⁾, pero un experimento probó que si a las células HAP1 se les eliminan partes de la ATPsintasa el mPTP sigue apareciendo con normalidad, desmontando la idea de que el canal esté formado por estas proteínas ⁽⁵¹⁾. Otra posibilidad que se contempla es que un componente del poro sea la Adenin-Nucleótido Translocasa (ANT) interaccionando con una isomerasa conocida como Ciclofilina D, ya que en un experimento llevado a cabo en hígados de ratón que no contenían ninguna de las tres isoformas de la ANT y que se cruzaban con ratones que no poseían la Ciclofilina D no se formaba el poro de transición de permeabilidad ⁽⁵²⁾. Recientemente un grupo de investigadores probó los efectos de la inhibición del mPTP y la ATPsintasa midiendo la capacidad de retención de calcio en mitocondrias aisladas del corazón de ratones en presencia y ausencia de Ciclofilina D, llegando a la conclusión según sus resultados de que es tan posible que el poro esté formado por monómeros de ATPsintasa como de ANT y Ciclofilina D, o incluso de ambos ⁽⁵³⁾.

A pesar de que su estructura no esté del todo clara, este canal sigue siendo una de las principales dianas para evitar la muerte celular en los procesos de isquemia-reperfusión y se han probado varias moléculas para su inhibición.

Uno de los inhibidores más conocidos del mPTP es la ciclosporina A, un inmunosupresor que suele utilizarse para el tratamiento de pacientes que han recibido un trasplante de

órganos. A lo largo de los años esta molécula ha sido probada en numerosos experimentos con animales, en los que se demostró que la molécula inhibe la apertura del poro probablemente por su interacción con la Ciclofilina D, reduce la inflamación de la mitocondria y produce tanto cardioprotección ^(54,55) como neuroprotección ⁽⁵⁶⁾.

Este fármaco se llevó a un ensayo clínico en humanos, llamado CYCLE y realizado en Italia entre 2012 y 2014. Se trata de un ensayo aleatorizado, multicéntrico y abierto que pretende determinar si una dosis intravenosa de ciclosporina A administrada dentro de las primeras horas tras la aparición de los síntomas del IAMCEST, mejora el daño por isquemia-reperusión tras someter el paciente al ICP ⁽⁵⁷⁾.

En la fase II del estudio se eligieron 410 pacientes seleccionados de unidades de cuidados cardíacos de entre 51 y 75 años, que sufrieron un IAMCEST. Durante las primeras 6 horas tras los síntomas se les administró una única dosis de 2.5mg/Kg a 207 pacientes, el resto fue el grupo control. El fármaco debía administrarse al menos 5 minutos antes de realizarle al paciente el ICP. Tras su recuperación los pacientes debían realizar una visita al mes y otra a los seis meses donde se llevaban a cabo pruebas como electrocardiogramas, medidas de presión arterial y análisis de troponinas en suero ⁽⁵⁸⁾.

Los resultados del ensayo demostraron que existe un ligero aumento en la resolución del segmento ST en los pacientes tratados con ciclosporina que habían sufrido anteriores infartos, pero no se produce un aumento en la fracción de eyección. Esto puede observarse en la *Figura 10*. Estos datos junto con los obtenidos en las pruebas realizadas a los 6 meses del tratamiento sugieren que la ciclosporina A no produce una reducción significativa del daño por isquemia-reperusión cuando se administra en las condiciones indicadas. Dado que solo se presentó una reacción adversa grave y se puede considerar un fármaco seguro, el ensayo clínico pasó a fase III, en la cual se encuentra actualmente ⁽⁵⁸⁾.

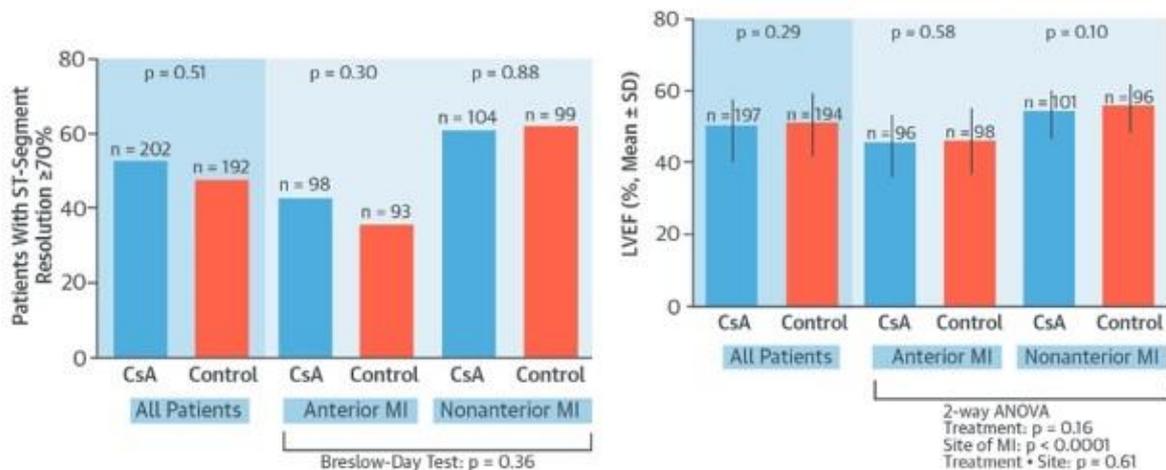


Figura 10- Resultados del ensayo CYCLE en pacientes tratados vs control, tomada de (48). Se compara la resolución del segmento ST y la fracción de eyección en pacientes que han sufrido anteriores IAM y pacientes en los que debuta el IAM.

Posteriormente se realizó el ensayo clínico CIRCUS, un estudio internacional, multicéntrico, doble-ciego y aleatorio en un total de 970 pacientes. En él se pretendía establecer si la administración de ciclosporina A por vía intravenosa a pacientes con IAMCEST reduce el daño por isquemia-reperusión que comienza tras la ICP y si previene la remodelación ventricular izquierda a largo plazo. Sin embargo, los datos obtenidos no revelaron diferencias significativas entre los pacientes tratados y sin tratar ^(59,60).

7. CONCLUSIONES

En la literatura actual existen muchas posibles dianas mitocondriales que parecen ser prometedoras. Sin embargo, cuando los estudios se llevan a la práctica usando moléculas que puedan inhibir esas dianas aparecen muchos problemas no previstos.

En este trabajo se ha comprobado que todas las moléculas probadas presentan cardioprotección o neuroprotección en animales, pero a la vez algunas de ellas presentan algún motivo por el cual no pueden usarse en la clínica. El Ru265 inhibe la MCU pero produce convulsiones; el malonato bloquea la SDH pero debe administrarse antes de la aparición de la isquemia para que sea más efectivo; el CGP-37157 inhibe el NCLX pero no disminuye el tamaño del infarto y la ciclosporina A no ha resultado eficaz al probarse en humanos a pesar de que sí lo era en animales. El fármaco que parece tener más posibilidades es el inhibidor del complejo I, MitoSNO, pero para comprobar su eficacia habrá que llevarlo a ensayos clínicos.

Todo esto demuestra que la búsqueda de una diana terapéutica y un fármaco útil en la clínica es larga, lenta y costosa porque son muchos los factores que deben tenerse en cuenta para encontrar una terapia eficaz y segura. Se espera que esta línea de investigación siga avanzando ya que la existencia de un medicamento que reduzca el daño por isquemia-reperfusion generará un impacto social-sanitario enorme.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Montalescot G, Sechem U, Achenbach S, Andreotti F, Arden C, Budaj A, et al. Guía de Práctica Clínica de la ESC 2013 sobre diagnóstico y tratamiento de la cardiopatía isquémica estable. Rev Esp Cardiol. 2014;67(2): 135.e1-e81.
2. Lu L, Liu M, Sun RR, Zheng Y, Zhang P. Myocardial Infarction: Symptoms and Treatments. Rev Cell Biochem Biophys. 2015 Jul 1;72(3):865–867.
3. Ibáñez B, James S, Agewall S, J.Antunez M, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, et al. Guía ESC 2017 sobre el tratamiento del infarto agudo de miocardio en pacientes con elevación del segmento ST. Rev Española Cardiol. 2017;70(12): 1082.e1-e61.
4. Díez-Tejedor E, Arboix A, Díaz J, Álvarez J, Pérez-Sempere A, Pareja A, et al. Guía para el diagnóstico y tratamiento del ictus. Nº3. 1ª Edición. Barcelona: Prous Science; 2006.
5. Díez-Tejedor E, Del Brutto O, Álvarez-Sabín J, Muñoz M, Abiusi G. Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares. Sociedad Iberoamericana de Enfermedades Cerebrovasculares. Rev Neurol. 2001;33(5):455–64.
6. Alonso M. Fisiopatología de la isquemia cerebral. Guía neurológica 8: enfermedad neurovascular. p:5-17.
7. Pedro-García L. Examen clínico del paciente con ictus. Rev Cubana Neurol Neurocir. 2011; 1(1):74–89.
8. Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, et al. Heart disease and stroke statistics-2008 Update: A report from the American heart association statistics committee and stroke statistics subcommittee. Rev Circulation. 2008;117:e25-e146.
9. Institute for Health Metrics and Evaluation IHME [Internet]. [Consultado 27 mayo 2020]. Disponible en: <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>
10. Instituto Nacional de Estadística [Internet]. [Consultado 27 mayo 2020]. Disponible en: https://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/categoria.htm?c=Estadistica_P&cid=1254735573175
11. Organización Mundial de la Salud [Internet] [Consultado 27 mayo 2020]. Disponible en: https://www.who.int/cardiovascular_diseases/es/
12. L.Nelson D, M.Cox M. LEHNINGER: PRINCIPIOS DE BIOQUIMICA. Ediciones Omega; 5ª edición. 2009. 1296p;707-772.
13. San-Miguel A, Martín-Gil FJ. Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libres) y los antioxidantes en clínica. Rev Gac Médica Bilbao. 2009 Jan;106(3):106–113.
14. Calle X, Jiménez-Gallegos D, Muñoz-Córdova F, Sánchez P, Lavandero S. Mecanismo sensor y de adaptación a los niveles de oxígeno y su implicancia en las enfermedades cardiovasculares: a propósito del Premio Nobel de Fisiología-Medicina 2019. Rev Chil Cardiol. 2019;38(3):225–235.
15. L.Nelson D, M.Cox M. Lehninger Principles of Biochemistry. 7th edition. 2017. 1328 p.
16. García Bermúdez J. [Internet]. Regulación de la expresión y actividad de IF1, el inhibidor fisiológico de la H⁺-ATP sintasa de la mitocondria. 2015. [Consultado 30 mayo 2020]. Disponible en

- <http://hdl.handle.net/10486/669588>
17. García-dorado D, Ruiz-Meana M. Fisiopatología del daño miocárdico por isquemia-reperusión : nuevas oportunidades terapéuticas en el infarto agudo de miocardio. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62(2):199–209.
 18. Pell VR, Chouchani ET, Frezza C, Murphy MP, Krieg T. Succinate metabolism: A new therapeutic target for myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc research* . 2016;111(2):134–141.
 19. Bo K, Siesjo MD, Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. *J Neurosurg*. 1992;77(1–2):169–184.
 20. Piccirillo S, Magi S, Castaldo P, Preziuso A, Lariccia V, Amoroso S. NCX and EAAT transporters in ischemia: At the crossroad between glutamate metabolism and cell survival. *Rev Cell Calcium*. 2020;86(January):102–160.
 21. Sánchez R, Arboleda G. Mitocondria y muerte celular. *Nova-Publicación científica en ciencias biomédicas* 2008;6:101-236.
 22. Pezoa J. El poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm) como blanco de estrategias cardioprotectoras en daño por isquemia- reperusión miocárdica: rol de los anestésicos inhalatorios. *Rev Chil Anest*. 2012;41(2):128–34.
 23. Babot M, Birch A, Labarbuta P, Galkin A. Characterisation of the active/de-active transition of mitochondrial complex I. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2014;1837(7):1083–1092.
 24. Chouchani ET, Methner C, Nadtochiy SM, Logan A, Victoria R, Ding S, et al. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. *Nat Med*. 2013;19(6):753–759.
 25. Methner C, Chouchani ET, Buonincontri G, Pell VR, Sawiak SJ, Murphy MP, 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.
 26. Kim M, Stepanova A, Niatsetskaya Z, Sosunov S, Arndt S, Murphy MP, et al. Attenuation of oxidative damage by targeting mitochondrial complex I in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Free Radic Biol Med*. 2018;124(April):517–524.
 27. Chen Q, Younus M, Thompson J, Hu Y, Hollander JM, Lesnefsky EJ. Intermediary metabolism and fatty acid oxidation: novel targets of electron transport chain-driven injury during ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Hear Circ Physiol* 2018;314:787–795.
 28. Xu A, Szczepanek K, Maceyka MW, Ross T, Bowler E, Hu Y, et al. Transient complex I inhibition at the onset of reperfusion by extracellular acidification decreases cardiac injury. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2014;306(12):1142–1153.
 29. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijević D, Sundier SY, Robb EL, et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*. 2014;515(7527):431–435.
 30. Taegtmeier H. Metabolic responses to cardiac hypoxia. Increased production of succinate by rabbit papillary muscles. *Circulation Res*. 1978;43(5):808–815.
 31. Ashrafian H, Czibik G, Bellahcene M, Aksentijević D, Smith AC, Mitchell SJ, et al. Fumarate is cardioprotective via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Cell Metab*. 2012;15(3):361–371.
 32. Valls-Lacalle L, Barba I, Miró-Casas E, Alburquerque-Béjar JJ, Ruiz-Meana M, Fuertes-Agudo M, et al. Succinate dehydrogenase inhibition with malonate during reperfusion reduces infarct size by preventing mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res*. 2016;109(3):374–384.
 33. 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. *Scientific Reports*. 2018;8(1):1–10.
 34. Kohlhauser M, Pell VR, Burger N, Spiroski AM, Gruszczuk A, Mulvey JF, 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):1–9.
 35. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74(5):1124–1136.
 36. The Role of Mitochondrial Respiration in the Cardioprotective Capacity of IPC in Diabetic and Non-diabetic Patients [Internet]. [Consultado 3 junio 2020]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02993484>
 37. Boyman L, Williams GSB, Khananshvilid D, Sekler I, Lederer WJ. NCLX: The mitochondrial sodium calcium exchanger. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Academic Press; 2013;59:205–213.
 38. Hernansanz-agustín P, Choya-foces C, Carregal-romero S, Ramos E, Villa-piña T, Moreno L, et al. Na + controls hypoxic signalling by the mitochondrial respiratory chain. Aceptado en *Nature*. Doi: <https://doi.org/10.1101/385690>. Disponible en <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/385690v2.full>

39. Griffiths EJ, Ocampo CJ, Savage JS, Rutter GA, Hansford RG, Stern MD, et al. Mitochondrial calcium transporting pathways during hypoxia and reoxygenation in single rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 1998;39(2):423–433.
40. Cox D, Conforti L, Sperelakis N, Matlib M. Selectivity of Inhibition of Na⁺/Ca²⁺ Exchange of heart Mitochondria by Benzothiazepine CGP-37157. *J Cardiovasc Pharmacology.* 1993;21:595–599.
41. Sventzouri S, Nanas I, Vakrou S, Kapelios C, Sousonis V, Sfakianaki T, et al. Pharmacologic inhibition of the mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger protects against ventricular arrhythmias in a porcine model of ischemia-reperfusion. *Hell J Cardiology.* 2018;59(4):217–22.
42. Ruiz A, Alberdi E, Matute C. CGP37157, an inhibitor of the mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger, protects neurons from excitotoxicity by blocking voltage-gated Ca²⁺ channels. *Cell Death Disease.* 2014;5(4):e1-156.
43. Woods JJ, Nemani N, Shanmughapriya S, Kumar A, Zhang M, Nathan SR, et al. A Selective and Cell-Permeable Mitochondrial Calcium Uniporter (MCU) Inhibitor Preserves Mitochondrial Bioenergetics after Hypoxia/Reoxygenation Injury. *ACS Cent Science.* 2019;5(1):153–166.
44. Kwong JQ, Lu X, Correll RN, Schwanekamp JA, Vagnozzi RJ, Sargent MA, et al. The Mitochondrial Calcium Uniporter Selectively Matches Metabolic Output to Acute Contractile Stress in the Heart. *Cell Reports.* 2015;12(1):15–22.
45. Luongo TS, Lambert JP, Yuan A, Zhang X, Gross P, Song J, et al. The Mitochondrial Calcium Uniporter Matches Energetic Supply with Cardiac Workload during Stress and Modulates Permeability Transition. *Cell Reports.* 2015;12(1):23–34.
46. De J García-Rivas G, Carvajal K, Correa F, Zazueta C. Ru 360, a specific mitochondrial calcium uptake inhibitor, improves cardiac post-ischaemic functional recovery in rats in vivo. *British J of Pharmacology.* 2006;149(7):829–837.
47. Novorolsky RJ, Nichols M, Kim JS, Pavlov E V., J Woods J, Wilson JJ, et al. The cell-permeable mitochondrial calcium uniporter inhibitor Ru265 preserves cortical neuron respiration after lethal oxygen glucose deprivation and reduces hypoxic/ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2020;40(6):1172–1181.
48. Šileikytė J, Forte M. Shutting down the pore: The search for small molecule inhibitors of the mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2016;1857(8):1197–1202.
49. Andrews DT, Royse CF, Royse AG. The mitochondrial permeability transition pore and its role in anaesthesia-triggered cellular protection during ischaemia-reperfusion injury. *Anaesth Intensive Care.* 2012;40(1):46–70.
50. Mnatsakanyan N, Llaguno MC, Yang Y, Yan Y, Weber J, Sigworth FJ, et al. A mitochondrial megachannel resides in monomeric F1FO ATP synthase. *Nature Commun.* 2019;10(1).
51. Carroll J, He J, Ding S, Fearnley IM, Walker JE. Persistence of the permeability transition pore in human mitochondria devoid of an assembled ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(26):12816–12821.
52. Karch J, Bround MJ, Khalil H, Sargent MA, Latchman N, Terada N, et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition by deletion of the ANT family and CypD. *Sci Adv.* 2019;5(8):1–8.
53. Baines CP, Gutiérrez-aguilar M. The mitochondrial permeability transition pore : Is it formed by the ATP synthase , adenine nucleotide translocators or both ? *BBA - Bioenerg.* 2020;1861(10):148249.
54. Crompton M, Ellinger H, Costi A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J.* 1988;255(1):357–360.
55. Griffiths EJ, Ocampo CJ, Savage JS, Stern MD, Silverman HS. Protective effects of low and high doses of cyclosporin A against reoxygenation injury in isolated rat cardiomyocytes are associated with differential effects on mitochondrial calcium levels. *Cell Calcium.* 2000;27(2):87–95.
56. Deng H, Zhang S, Ge H, Liu L, Liu L, Feng H, et al. The effect of cyclosporin a on ischemia-reperfusion damage in a mouse model of ischemic stroke. *Neurol Res.* 2020; Disponible en: <https://doi.org/10.1080/01616412.2020.1762353>
57. CYClosporinE A in Reperfused Acute Myocardial Infarction (CYCLE) [Internet]. [Consultado 5 junio 2020] Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01650662?cond=Ischemia+Reperfusion+Injury&draw=4&rank=222>
58. Ottani F, Latini R, Staszewsky L, La Vecchia L, Locuratolo N, Sicuro M, et al. Cyclosporine A in Reperfused Myocardial Infarction the Multicenter, Controlled, Open-Label CYCLE Trial. *J American College Cardiology.* 2016;67(4):365–374.
59. Does Cyclosporine ImpRove Clinical oUtcome in ST Elevation Myocardial Infarction Patients at 3 Years of Follow-up. CIRCUS II Study (CIRCUS II) [Internet]. [Consultado 5 junio 2020]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02934217?term=CIRCUS&draw=2&rank=1>
60. Cung TT, Morel O, Cayla G, Rioufol G, Garcia-Dorado D, Angoulvant D, et al. Cyclosporine before PCI in patients with acute myocardial infarction. *New England J Med.* 2015;373(11):1021–1031.