
Papel de las mitocondrias en la necrosis miocárdica por isquemia-reperfusión: un reto para la investigación cardiovascular

D. García-Dorado

Laboratorio de Investigación Cardiovascular, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona.

La magnitud de la muerte celular miocárdica tiene una gran trascendencia en el pronóstico vital y en la calidad de vida de los pacientes con síndromes coronarios agudos. Después de un periodo inicial, de interés por el papel desempeñado por las mitocondrias en la muerte celular por isquemia-reperfusión, al principio de la década de 1980, la investigación en esta área ha progresado muy lentamente. Sin embargo, durante los últimos años el interés se ha reavivado, en parte por el estallido de conocimientos sobre la muerte apoptótica, en la que las mitocondrias pueden ser un elemento crítico. Aunque cada vez está más claro que la apoptosis es un fenómeno poco relevante en la isquemia-reperfusión miocárdica, existen nuevos datos que sugieren que las mitocondrias pueden ser importantes en la iniciación de la muerte por perfusión. Se abre así un campo de investigación apasionante cuya oportunidad y conveniencia tiene sólidas bases, y cuya ejecución supone un importante reto.

A continuación se describen los avances científicos sobre los que se basa la investigación de un nuevo papel de las mitocondrias en la muerte celular por isquemia-reperfusión:

Las alteraciones de la homeostasis catiónica desempeñan un papel decisivo en la muerte celular durante la isquemia-reperfusión miocárdica. No existe una definición de muerte celular universalmente válida. En el presente proyecto definiremos muerte celular como la pérdida de integridad de la membrana celular (muerte por necrosis) o la degradación internucleosomal del ADN (apoptosis). Aunque la isquemia grave conduce inexorablemente a la muerte celular, se sabe que, de acuerdo con la anterior definición, ésta ocurre de forma bastante tardía, en varias horas. La reinstauración del flujo sanguíneo es una condición indispensable para la supervivencia celular, pero, paradójicamente, desencadena con frecuencia la muerte de un elevado número

de células cuyo sarcolema estaba intacto y que no habían desarrollado apoptosis. Se ha discutido mucho si la muerte celular asociada a la perfusión es un efecto adverso de ésta, denominado generalmente "daño letal por perfusión", o refleja solamente la aceleración de un daño celular "irreversible" que hubiera conducido inexorablemente a la muerte celular algún tiempo más tarde. La relevancia de esta discusión ha sido puesta en duda por la evidencia de que la perfusión durante las primeras horas de oclusión coronaria es en todo caso beneficiosa, y nunca incrementa la muerte celular. Sin embargo, la existencia del daño letal por perfusión podría tener importantes implicaciones si fuese posible evitarlo mediante tratamientos aplicados en el momento de la perfusión. De acuerdo con esta idea, definimos daño letal por perfusión como la parte de muerte celular causada por un episodio de isquemia transitoria que puede ser prevenida mediante intervenciones realizadas en el momento de la perfusión¹.

Los mecanismos responsables de la muerte celular durante la isquemia-reperfusión miocárdica no han sido completamente desvelados. Sin embargo, está claro que las alteraciones de la homeostasis catiónica desempeñan un papel fundamental en ésta. Durante la isquemia, se produce un exceso de protones y descenso del pH intracelular (pHi), y se activa el intercambiador Na⁺/H⁺ sarcolemal NHE1 y el cotransportador Na⁺COO³H⁻². Estos sistemas no impiden el descenso rápido del pHi hasta valores por debajo de 6,5 en los primeros minutos de isquemia grave, y producen la entrada de Na⁺ en la célula³. La [Na⁺]_{cit} aumenta progresivamente desde el principio de la isquemia por la entrada a través de los sistemas correctores de la acidosis intracelular y por la inactividad de la Na⁺/K⁺ ATPasa sarcolemal causada por la caída (en valores negativos) del cambio de energía libre de la hidrólisis del ATP (por la caída de ATP y el aumento de

ATP y Pi)⁴. El aumento de $[Na^+]_{\text{citosol}}$ y la pérdida del potencial de membrana hacen que el intercambiador Na^+/Ca^{2+} sarcolemal opere permanentemente en modo reverso introduciendo Ca^{2+} en el citosol. La entrada de Ca^{2+} a través del intercambiador Na^+/Ca^{2+} es la principal causa del incremento de $[Ca^{2+}]_{\text{citosol}}$ en cardiomiocitos durante la isquemia⁵. Sin embargo, la $[Ca^{2+}]_{\text{citosol}}$ sólo comienza a elevarse cuando los miocitos desarrollan contractura por rigor isquémico, una interacción de baja energía entre actina y miosina que no depende del Ca^{2+} y que ocurre cuando la ATP alcanza niveles críticamente bajos (50-100 μM)⁶. La elevación de $[Ca^{2+}]_{\text{citosol}}$ es capaz de activar diferentes sistemas enzimáticos. Una de las consecuencias de esta activación es la degradación de elementos del citoesqueleto y del sarcolema⁷. Sin embargo, la consecuencia fisiopatológica más importante de la elevación de $[Ca^{2+}]_{\text{citosol}}$ es que determina la aparición de hipercontractura durante la reperfusión¹.

La reperfusión reinstaura rápidamente la energía libre de intercambio del ATP, y el $[Ca^{2+}]_{\text{citosol}}$ disminuye rápidamente debido en parte a la captación de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico por la Ca^{2+} -ATPasa. Estudios recientes de nuestro laboratorio dentro de un proyecto previo (CICYT-SAF99/102) han demostrado que este descenso se produce a pesar de la entrada adicional de Ca^{2+} extracelular a través del intercambiador Na^+/Ca^{2+} sarcolemal. Este intercambiador actúa en modo reverso al principio de la reperfusión debido al incremento de $[Na^+]_{\text{citosol}}$. Este incremento es debido a la sobrecarga de Na^+ acumulada durante la isquemia, a la entrada adicional de Na^+ a través de los sistemas correctores de la acidosis citosólica (NHE1 y Na^+ -COO₃H- especialmente) y a la disfunción transitoria de la Na^+/K^+ -ATPasa sarcolemal. Otros resultados del proyecto CICYT-SAF99/102 demostraron que el Na^+ puede acceder en grandes cantidades a las células a través de los *gap junctions*⁸ y que éstos pueden permanecer abiertos después de la isquemia prolongada⁹. La captación de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico desencadena su liberación a través de los canales ryanodina-sensibles, el aumento de $[Ca^{2+}]_{\text{citosol}}$ y su posterior recaptación, dando lugar a amplias oscilaciones de $[Ca^{2+}]_{\text{citosol}}$ durante los primeros minutos de reperfusión¹⁰. La elevación y las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_{\text{citosol}}$ en presencia de $[ATP]_{\text{citosol}}$ normal desencadenan una actividad contráctil excesiva que puede provocar el acortamiento extremo y disrupción de la arquitectura celular en cardiomiocitos aislados, y la ro-

tura del sarcolema y la muerte celular en los cardiomiocitos *in situ* (hipercontractura). La hipercontractura se ve favorecida por la fragilidad del citoesqueleto secundaria a la isquemia previa, en parte causada por cambios en el estado de fosforilación de sus elementos, y por la rápida desaparición de la acidosis intracelular¹¹, ya que el pH ácido es un potente inhibidor de la actividad contráctil. Por otra parte, la normalización abrupta de la osmolalidad extracelular junto con la entrada de Na^+ al citosol causan edema celular¹². La hipercontractura, el edema y la interacción mecánica con el tejido adyacente imponen una sobrecarga mecánica al sarcolema, cuya resistencia mecánica está disminuida por la activación enzimática y el catabolismo lipídico que se producen durante la isquemia, y, probablemente, por la agresión de radicales libres durante la reperfusión¹³. La hipercontractura y rotura del sarcolema pueden propagarse a cardiomiocitos adyacentes mediante el paso de Na^+ del sarcolema a través de los *gap junctions*¹⁴. Este tipo de muerte celular asociada a hipercontractura y rotura del sarcolema durante los primeros minutos de reperfusión es responsable de la mayor parte de la muerte celular total causada por la isquemia miocárdica transitoria¹⁴⁻¹⁶.

Cada vez existen más indicios de que las mitocondrias desempeñan un papel importante en la génesis de la muerte celular relacionada con alteraciones catiónicas por isquemia-reperfusión.

En la década de 1980 se prestó mucha atención a las mitocondrias como causa de muerte celular durante la isquemia-reperfusión. Las observaciones al microscopio electrónico demostraron la precocidad del edema mitocondrial durante la isquemia y la asociación entre la presencia de gránulos amorfos en la matriz mitocondrial y la muerte celular. La hipótesis más aceptada era que la entrada masiva de Ca^{2+} en las mitocondrias durante la reperfusión causaba el daño de éstas y la muerte celular por pérdida de la respiración mitocondrial. Esta hipótesis fue contestada por la observación de que la hipercontractura desencadenada por la reoxigenación ocurre en miocitos que han recuperado su competencia metabólica y, por tanto, su función mitocondrial¹⁰. Sin embargo, observaciones recientes sugieren que la participación de las mitocondrias en la muerte celular podría estar relacionada con otros mecanismos.

Las mitocondrias participan activamente en la homeostasis iónica celular. Las mitocondrias constan de una matriz y una doble membrana, y

suponen más del 30% del volumen celular de los cardiomiocitos. La membrana celular interna (no así la externa) posee una muy baja permeabilidad a los iones y sistemas transportadores iónicos específicos, por lo que las concentraciones iónicas en la matriz pueden ser muy diferentes a las del citosol. De hecho, la principal función de las mitocondrias, la síntesis de ATP en la F_0F_1 ATPasa en la membrana mitocondrial interna, está acoplada a la entrada de H^+ en la matriz a favor de un importante gradiente electroquímico. La matriz posee una H^+ mucho menor que la citosólica, y es muy electronegativa, con un potencial transmembrana ($\Delta\psi$) de aproximadamente -180 mV. Este gradiente está mantenido por la extrusión de H^+ asociada al transporte de electrones en la cadena respiratoria. La entrada de H^+ en la matriz puede realizarse, además de por la F_0F_1 ATPasa, a través de un intercambiador Na^+/H^+ mitocondrial, y de un intercambiador K^+/H^+ . De hecho, el gradiente de H^+ es utilizado para mantener la homeostasis iónica mitocondrial y para el transporte de metabolitos en contra de gradientes químicos¹⁷. La entrada de K^+ en la matriz puede ser favorecida en determinadas condiciones por la apertura de canales específicos dependientes de la concentración de ATP (canales K^+ ATP). La $[Ca^{2+}]_{mito}$ es normalmente menor que la citosólica y desempeña un papel clave en la regulación de la respiración mitocondrial a través de varios mecanismos¹⁸. La $[Ca^{2+}]_{mito}$ puede variar con rapidez y contribuir a la formación y progresión de ondas de Ca^{2+} , dentro de la célula y a su propagación entre células adyacentes a través de los *gap junctions*. En condiciones normales, el Ca^{2+} entra en la matriz a través de un unitransportador a favor de su gradiente electroquímico y sale acoplado a la entrada de Na^+ a través de un intercambiador Na^+/Ca^{2+} . El Ca^{2+} puede abandonar también la matriz mitocondrial a través del poro de transición (véase más adelante). Cada vez existe más evidencia de que este canal puede tener un papel en los cambios fisiológicos de Ca^{2+} ¹⁹. El Na^+ que entra a través del intercambiador Na^+/Ca^{2+} no se acumula en la matriz porque es expulsado al citosol a través del intercambiador Na^+/H^+ que opera introduciendo H^+ a favor del enorme gradiente electroquímico para este ión. Dado el volumen del compartimento mitocondrial es fácil comprender que el transporte de iones entre la mitocondria y el citosol tenga importantes efectos sobre las concentraciones iónicas en éste. Además, las mitocondrias presentan una relación anatomofuncional íntima con el retículo sarcoplásmico, de manera que las concentraciones iónicas

en ambos compartimentos están íntima y reciprocamente influidas²⁰.

Las mitocondrias modulan las alteraciones iónicas mitocondriales causadas por la isquemia-reperfusión. Durante los primeros momentos de la isquemia miocárdica, antes de la aparición del rigor isquémico la acidosis celular ya se ha establecido, y el aumento importante de $[Na^+]_{citosol}$ induce la entrada de Ca^{2+} al citosol a través del modo reverso del intercambiador Na^+/Ca^{2+} . Sin embargo, el Ca^{2+} citosólico se mantiene normal hasta el desarrollo de rigor. Observaciones recientes de nuestro grupo sugieren que las mitocondrias contribuyen a mantener la normalidad de $[Ca^{2+}]_{citosol}$ secuestrando Ca^{2+} en paralelo con el retículo sarcoplásmico. Nuestros resultados preliminares también sugieren que el aumento brusco de $[Ca^{2+}]_{citosol}$ después del rigor es debido no sólo a la detención de la entrada de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico al "agotarse" el ATP, sino también a la salida de Ca^{2+} de la mitocondria al perderse el potencial de membrana.

Otros resultados de nuestro grupo habían demostrado que la captación de Ca^{2+} por parte de las mitocondrias contribuye a la rápida caída de $[Ca^{2+}]_{citosol}$ durante los momentos iniciales de la reoxigenación, ya que la caída se sigue produciendo cuando se bloquea la Ca^{2+} ATPasa sarcolemal con tapsigarguina¹². Más aun, dichos resultados son compatibles con la interpretación de que el bloqueo de la entrada de Ca^{2+} al citosol a través del intercambiador Na^+/Ca^{2+} sarcolemal protege a los miocitos mediante la disminución de la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial y la subsecuente disminución de la liberación de Ca^{2+} mitocondrial al citosol.

La interrelación entre los cambios en $[Ca^{2+}]_{citosol}$ y $[Ca^{2+}]_{mito}$ es probablemente mucho más compleja que un simple intercambio de iones entre ambos compartimentos. Por ejemplo, se ha demostrado recientemente que el aumento de $[Ca^{2+}]_{mito}$ tiene un efecto inhibitorio sobre el intercambiador Na^+/Ca^{2+} sarcolemal por mecanismos desconocidos²¹.

Las mitocondrias desempeñan un papel clave en la muerte celular por apoptosis o necrosis. El mecanismo más importante y mejor conocido por el que las mitocondrias pueden inducir la apoptosis implica la apertura del poro de transición mitocondrial, un megacanal que permite el paso libre e indiscriminado de moléculas de hasta 1,5 kDa²²⁻²⁴. El poro de transición se forma por el ensamblaje de subunidades proteicas en regiones de la pared mitocondrial en las que la

membrana externa e interna están en estrecha proximidad. La estructura del poro se conoce sólo parcialmente. Se sabe que incluye proteínas de la membrana interna, el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) y proteínas de la membrana externa, como la porina (canal de aniones dependiente de voltaje), que actúan conjuntamente. Además, incluye un receptor de benzodiazepinas y la ciclofilina D²⁵. La probabilidad de apertura del poro de transición está regulada por varios factores, que incluyen el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$), la concentración mitocondrial de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$) y H^+ (pH_{mito}) y ATP. La elevación de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ y la caída de $\Delta\psi$ (y quizás también su aumento anormal) favorecen la apertura del poro, mientras que la acidosis y el ATP la inhiben. Diversas moléculas, y especialmente los radicales libres del O_2 , pueden actuar como estimuladores externos de la apertura, mientras que otras sustancias como la ciclosporina A, que se une a la ciclofilina D, o el ácido bongkrékico, que se une a ANT, son capaces de dificultarla o inhibirla²⁶. La apertura del poro mitocondrial está regulada por una familia de proteínas (Bcl-2) que se expresan en la membrana mitocondrial externa. La familia de productos Bcl-2 tiene potentes efectos pro (Bax) o antiapoptosis (Bcl-2) y regula no sólo la apertura del poro de transición sino también otros sistemas transportadores mitocondriales, incluyendo el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ²⁷.

Durante la reperfusión, después de un período prolongado de isquemia, coinciden circunstancias que favorecen la apertura del poro, especialmente, elevación de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$, generación de radicales libres de O_2 y normalización del pH ²⁸.

La apertura masiva del poro de transición (muchos poros en muchas mitocondrias) causa edema mitocondrial grave que puede resultar en rotura de la membrana mitocondrial externa y liberación de citocromo C y otros activadores de la cadena de las caspasas^{22,29}. Aún en ausencia de rotura de la membrana externa, la apertura del poro de transición puede permitir la salida de citocromo C y la inducción de apoptosis. Si la liberación de citocromo C, un elemento de la cadena respiratoria, es muy importante, puede comprometer la respiración mitocondrial hasta el punto de que no se sintetice suficiente ATP para ejecutar el programa de muerte celular, y la muerte se produce por necrosis. Por otra parte, la apertura del poro de transición puede resultar en la activación de múltiples sistemas enzimáticos distintos de las proteasas capaces de causar fragilidad del sarcolema y el citoesqueleto^{30,31}.

En mitocondrias con sobrecarga de Ca^{2+} , la apertura del poro de transición puede resultar en la salida al citosol de importantes cantidades de este ión, y en el aumento de la concentración citosólica de éste. Incluso si el poro de transición no se abre, la normalización de la función mitocondrial conlleva la liberación del exceso de Ca^{2+} en el citosol, probablemente a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. La normalización de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ supone en cualquier caso un mecanismo potencial de sobrecarga citosólica de Ca^{2+} durante la reperfusión, tal como se ha discutido en el apartado anterior, y puede favorecer el desarrollo de hipercontractura. Por otra parte, estudios preliminares en miocitos permeabilizados expuestos a distintas concentraciones de ATP demuestran que la reelevación inadecuada de la concentración de ATP tras el desarrollo de rigor por exposición a concentraciones decrecientes puede causar una paradójica exacerbación de la contractura en ausencia de Ca^{2+} ³². Esta observación sugiere que si la recuperación inadecuada de la síntesis de ATP durante la reperfusión eleva la concentración citosólica de ATP lo suficiente para alcanzar el rango crítico de desarrollo de contractura por rigor, pero no lo suficiente como para sobrepasar rápidamente dicho rango, se puede producir una paradójica contractura por rigor durante la reperfusión.

Finalmente, las alteraciones mitocondriales pueden contribuir a la pérdida de la integridad del sarcolema. Las mitocondrias constituyen la principal fuente intracelular de radicales libres durante la reoxigenación, y son a la vez una importante diana para los radicales libres^{33,34}. Los radicales libres del oxígeno contribuyen a la activación de múltiples sistemas celulares, entre ellos el poro de transición mitocondrial (véase más adelante) y, además, pueden incrementar directamente la fragilidad del sarcolema¹³ y favorecer la muerte celular por necrosis.

Las mitocondrias parecen estar implicadas en la génesis del efecto protector de los tratamientos que se han mostrado más útiles contra la muerte celular miocárdica por isquemia-reperfusión. Las mitocondrias participan en el mecanismo protector del preconditionamiento isquémico. Aunque el mecanismo último por el que la exposición a breves episodios de isquemia-reperfusión protegen el miocardio contra la muerte celular secundaria a un episodio de isquemia prolongada subsiguiente no se conoce^{35,36}, existe creciente acuerdo sobre la participación en éste de las mitocondrias³⁷ y, en particular, de los canales K^+ -ATP mitocondriales^{34,38}. En la mayoría de las condi-

ciones investigadas, la protección puede ser evocada por fármacos que abren estos canales y abolida por otros que los bloquean. Los sistemas de transducción de señales que llevan desde el estímulo preconditionante hasta la apertura de los canales en la mitocondria están siendo progresivamente esclarecidos³⁹. La cadena de sucesos que conduce desde la apertura de los canales K⁺ATP mitocondriales hasta la prevención de la muerte celular no se conoce. Sin embargo, existen datos preliminares que sugieren que el edema moderado y la despolarización mitocondrial parcial son los responsables de la protección al atenuar la sobrecarga de Ca²⁺ mitocondrial⁴⁰⁻⁴².

Las mitocondrias podrían participar de forma importante en la protección proporcionada por los bloqueadores del NHE1 y de NCX1. Existe acuerdo unánime en que el bloqueo del intercambiador Na⁺/H⁺ sarcolemal durante la isquemia miocárdica reduce drásticamente la muerte celular secundaria a isquemia-reperfusión^{28,43}. Sin embargo, el mecanismo de este efecto protector no está esclarecido. La actividad del intercambiador Na⁺/COO³H⁻ es capaz de compensar en gran medida los efectos del bloqueo de NHE1 sobre las concentraciones citosólicas de H⁺ y Na⁺. De hecho, el escaso o nulo efecto de estos bloqueadores sobre las concentraciones citosólicas de Na⁺, Ca²⁺ o H⁺^{6,11} contrasta vivamente con la magnitud del entretimiento en la caída de la concentración de ATP y del retraso en el desarrollo de rigor^{11,28}. Recientemente se ha propuesto que los inhibidores de NEH1 podrían afectar también al intercambiador Na⁺/H⁺ mitocondrial^{44,45}. Nosotros hemos observado recientemente que el bloqueador altamente selectivo HOE642 modifica dramáticamente la cinética del Ca²⁺ mitocondrial durante la inhibición metabólica en células permeabilizadas en las que no pueden existir efectos sobre NHE1 sarcolemal.

La eficacia protectora del bloqueo del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ sarcolemal NCX1 contra la muerte celular durante la reperfusión ha sido descrita sólo recientemente por nuestro grupo^{5,12}, y está lejos de ser universalmente aceptada como lo son las del preconditionamiento y la del bloqueo del intercambiador Na⁺/H⁺. Su mecanismo podría estar también relacionado con la atenuación de la sobrecarga mitocondrial de Ca²⁺ durante la reperfusión inicial como se ha descrito con anterioridad. Por otra parte, no se conoce si el inhibidor más específico de este intercambiador disponible hasta el momento atraviesa la membrana celular, ni si es capaz de bloquear también el intercambiador mitocondrial.

El conocimiento actual de las alteraciones iónicas mitocondriales inducidas por la isquemia-reperfusión es muy incompleto. *El conocimiento estructural y funcional de los transportadores iónicos es muy incompleto.* La identificación de los genes de los transportadores mitocondriales y su secuenciación no se ha completado, en contraste con lo que sucede con la mayoría de los transportadores sarcolemales¹⁷. La identidad molecular del unitransportador es objeto de discusión y muy recientemente se ha sugerido que es indistinguible del canal sarcolemal sensible a la ryanodina⁴⁶. Las similitudes y diferencias entre el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ mitocondrial y el NCX1 sarcolemal no han sido establecidas⁴⁷, y se discute todavía si la cinética de intercambiador mitocondrial es electroneutra (2Na⁺:1Ca²⁺) o electrogénica (3Na⁺:1Ca²⁺) como la del de NCX1⁴⁸ y si puede servir de vía de entrada de Ca²⁺ durante la isquemia⁴⁹.

No existe información sobre los cambios iónicos mitocondriales en células intactas durante la reperfusión. Aunque se ha publicado un gran número de trabajos sobre los cambios iónicos mitocondriales en distintas condiciones fisiológicas y patológicas, existen muy pocos datos sobre los cambios inducidos por la isquemia. Se discute si las mitocondrias se sobrecargan de Ca²⁺ o no durante la isquemia, si sueltan Ca²⁺ o lo captan durante la reperfusión, las vías por las que lo hacen, y la posible apertura del poro de transición durante la isquemia y la reperfusión y su relevancia. Una de las razones principales de ello es que los indicadores fluorescentes existentes supuestamente selectivos para las mitocondrias son retenidos en la matriz mitocondrial por la electronegatividad de ésta y salen de la mitocondria cuando ésta se despolariza durante la isquemia. Los estudios de adsorción atómica no distinguen entre Ca²⁺ iónico o ligado a fosfatos u otras moléculas. Los estudios en mitocondrias aisladas no pueden reproducir con exactitud los cambios citosólicos isquémicos y rompen la unidad mitocondria-retículo sarcoplásmico²⁰.

El papel del óxido nítrico (NO) en homeostasis iónica mitocondrial no ha sido estudiado. Aunque se sabe que el NO modula la respiración mitocondrial, y que tanto NO como GMPc modulan la actividad de muchos transportadores iónicos, el papel regulador de NO y el GMPc en la homeostasis iónica mitocondrial no se conoce. Más aún, se sabe ahora que en las mitocondrias se expresa de forma constitutiva una NO sintasa de tipo neural⁵⁰. Sin embargo, el papel del NO mitocon-

drial en la fisiopatología del daño miocárdico por isquemia-reperusión no ha sido investigado, a pesar de que se sabe que el NO puede tener efectos protectores^{51,52} e inductores de apoptosis⁵³ dependiendo de las condiciones.

Las posibilidades terapéuticas de la modificación de iones mitocondriales no han sido exploradas en modelos de isquemia fuera del preconditionamiento. Los estudios que se han realizado hasta ahora se basan casi exclusivamente en modelos celulares. Los pocos estudios en corazones intactos y animales han asumido que las intervenciones producían determinados efectos sobre las concentraciones iónicas mitocondriales sin comprobarlo⁵⁴⁻⁵⁶.

Los posibles mecanismos moleculares por los que la apertura del poro de transición puede favorecer la rotura del sarcolema no se conocen. En concreto, el mecanismo de acción de la glicina, un aminoácido con un potente efecto protector contra la rotura de la membrana celular en condiciones que favorecen la apertura del poro en órganos distintos del corazón y, según observaciones nuestras no publicadas, tampoco es conocido en miocitos.

Conclusión

Existen buenas razones para pensar que las mitocondrias ejercen un papel importante en la muerte celular durante la isquemia-reperusión miocárdica, y que contienen nuevas dianas farmacológicas con alto potencial terapéutico. Varios laboratorios ya han comenzado a explorarlas, y nuestro grupo se ha sumado a esta apasionante tarea.

BIBLIOGRAFÍA

1. Piper HM, García-Dorado D, Ovize M. A fresh look on reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1998;38:291-300.
2. Piper HM, Balsler C, Ladilov V, Schäfer M, Siegmund B, García-Dorado D. The role of Na⁺/H⁺ exchange in ischemia-reperfusion. *Basic Res Cardiol* 1996;91:191-202.
3. Steenbergen C, Perlman ME, London RE, Murphy E. Mechanism of preconditioning. Ionic alterations. *Circ Res* 1993;72:112-25.
4. Pike MM, Kitakaze M, Marban E. ²³Na-NMR measurement of intracellular sodium in intact perfused ferret hearts during ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 1990;259:H1767-73.
5. Ladilov Y, Haffner S, Balsler-Schäfer C, Maxeiner H, Piper HM. Cardioprotective effects of KB-R7943: a novel inhibitor of the reverse mode of Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Am J Physiol* 1999;276:H1868-76.
6. Ruiz-Meana M, García-Dorado D, Juliá M, Inserte J, Siegmund B, Ladilov Y, et al. Protective effect of HOE642, a selective blocker of Na⁺/H⁺ exchange, against the development of rigor contracture in rat ventricular myocytes. *Am J Exp Physiol* 2000;85(1):17-25.
7. Weinbrenner C, Baines CP, Liu GS, Armstrong SC, Ganote CE, Walsh AH, et al. Fostriecin, an inhibitor of protein phosphatase 2A, limits myocardial infarct size even when administered after onset of ischemia. *Circulation* 1998;98:899-905.
8. Ruiz-Meana M, García-Dorado D, Hofstaetter B, Piper HM, Soler-Soler J. Propagation of cardiomyocyte hypercontracture by passage of Na⁺ through gap junctions. *Circ Res* 1999;85:280-7.
9. Ruiz-Meana M, García-Dorado D, Lane S, Inserte J, Pina P, Mirabet M, et al. Persistence of gap junction communication during myocardial ischemia. *Am J Physiol* 2001;280(6):H2563-71.
10. Siegmund B, Schlack W, Ladilov YV, Balsler C, Piper HM. Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture. *Circulation* 1997;96:4372-9.
11. Schafer C, Ladilov YV, Schafer M, Piper HM. Inhibition of NHE protects reoxygenated cardiomyocytes independently of anoxic Ca(2⁺) overload and acidosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279(5):H2143-50.
12. Inserte J, García-Dorado D, Ruiz-Meana M, Padilla F, Barrabés JA, Pina P, et al. Inhibition of reverse mode of Na⁺/Ca²⁺ exchanger at the time of myocardial reperfusion limits hypercontracture and cell death. *Cardiovasc Res* 2002;55:739-48.
13. Schlüter KD, Jacob G, Ruiz Meana M, García-Dorado D, Piper HM. Protection of reoxygenated cardiomyocytes against osmotic fragility by NO donors. *Am J Physiol* 1996;271:H428-34.
14. García-Dorado D, Inserte J, Ruiz Meana M, González MA, Solares J, Juliá M, et al. Gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion. *Circulation* 1997b;96:3579-86.
15. García-Dorado D, Thérout P, Durán JM, Solares J, Alonso J, Sanz E, et al. Selective inhibition of the contractile apparatus. A new approach to the modification of infarct size, infarct composition and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. *Circulation* 1992a;85:1160-74.
16. Barrabés JA, García-Dorado D, Ruiz Meana M, Piper HM, Solares J, González MA, et al. Myocardial segment shrinkage during coronary reperfusion "in situ". Relation to hypercontracture and myocardial necrosis. *Pflügers Arch-Eur J Physiol* 1995;431:519-26.
17. Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 1999;79(4):1127-55.
18. Duchon MR. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol* 2000;529(Pt 1):57-68.

19. Petronilli V, Miotto G, Canton M, Brini M, Colonna R, Bernardi P, et al. Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys J* 1999;76(2):725-34.
20. Arnaudeau S, Kelley WL, Walsh JV, Jr., Demareux N. Mitochondria recycle Ca(2+) to the endoplasmic reticulum and prevent the depletion of neighboring endoplasmic reticulum regions. *J Biol Chem* 2001;276(31):29430-3.
21. Opuni K, Reeves JP. Feedback inhibition of sodium/calcium exchange by mitochondrial calcium accumulation. *J Biol Chem* 2000;275(28):21549-54.
22. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000;6(5):513-9.
23. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis. Basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res* 1998;82:1111-29.
24. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995;267:1445-62.
25. Halestrap AP. Calcium-dependent opening of a non-specific pore in the mitochondrial inner membrane is inhibited at pH values below 7. Implications for the protective effect of low pH against chemical and hypoxic cell damage. *Biochem J* 1991;278(Pt 3):715-9.
26. Halestrap AP, Connern CP, Griffiths EJ, Kerr PM. Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* 1997;174(1-2):167-72.
27. Zhu L, Yu Y, Chua BH, Ho YS, Kuo TH. Regulation of sodium-calcium exchange and mitochondrial energetics by bcl-2 in the heart of transgenic mice. *J Moll Cell Cardiol* 2001;33(12):2135-44.
28. García-Dorado D, González MA, Barrabés JA, Ruiz Meana M, Solares J, Lidón RM, et al. Prevention of ischemic rigor contracture during coronary occlusion by inhibition of Na⁺/H⁺ exchange. *Cardiovasc Res* 1997a;35:80-9.
29. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309-12.
30. Lemasters JJ. The mitochondrial permeability transition and the calcium, oxygen and pH paradoxes: one paradox after another. *Cardiovasc Res* 1999;44(3):470-3.
31. Cohen MV, Yang XM, Liu GS, Heusch G, Downey JM. Acetylcholine, bradykinin, opioids, and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K(ATP) channels. *Circ Res* 2001;89(3):273-8.
32. Cummings BS, McHowat J, Schnellmann RG. Phospholipase A(2)s in cell injury and death. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;294(3):793-9.
33. Ruiz-Meana M, Julià M, García-Dorado D, Insete J. Reversibility of rigor shortening in isolated skinned cardiomyocytes. Supplement to *Circulation* 1996;94:I-365 (abstract).
34. Yellon DM, Baxter GF, García-Dorado D, Heusch G, Sumeray MS. Ischaemic preconditioning: present position and future directions. *Cardiovasc Res* 1998;37:21-33.
35. Schulz R, Cohen MV, Behrends M, Downey JM, Heusch G. Signal transduction of ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 2001;52(2):181-98.
36. Maulick N, Engelmana RM, Rousou JA, Flack III JE, Deaton D, Das DK. Ischemic Preconditioning reduces Apoptosis by Upregulating Anti-Death Gene Bcl-2. *Circulation* 1999;100(Suppl II):II369-75.
37. Szewczyk A, Wojtczak L. Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev* 2002;54:101-27.
38. Ishida H, Hirota Y, Genka C, Nakazawa H, Nakaya H, Sato T. Opening of mitochondrial K(ATP) channels attenuates the ouabain-induced calcium overload in mitochondria. *Circ Res* 2001;89(10):856-8.
39. Kowaltowski AJ, Seetharaman S, Paucek P, Garlid KD. Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K(+) channel of heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280(2):H649-H56.
40. Menown IB, Adgey AA. Cardioprotective therapy and sodium-hydrogen exchange inhibition: current concepts and future goals. *J Am Coll Cardiol* 2001;38(6):1651-3.
41. Hotta Y, Ishikawa N, Ohashi N, Matsui K. Effects of SM-20550, a selective Na⁺-H⁺ exchange inhibitor, on the ion transport of myocardial mitochondria. *Mol Cell Biochem* 2001;219(1-2):83-90.
42. Miura T, Liu Y, Goto M, Tsuchida A, Miki T, Nakano A, et al. Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels play a role in cardioprotection by Na⁺-H⁺ exchange inhibition against ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol* 2001;37(3):957-63.
43. Murata M, Akao M, O'Rourke B, Marban E. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca(2+) overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* 2001;89(10):891-8.
44. Beutner G, Sharma VK, Giovannucci DR, Yule DI, Sheu SS. Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* 2001;276(24):21482-8.
45. Li W, Shariat-Madar Z, Powers M, Sun X, Lane RD, Garlid KD. Reconstitution, identification, purification, and immunological characterization of the 110-kDa Na⁺/Ca²⁺ antiporter from beef heart mitochondria. *J Biol Chem* 1992;267(25):17983-9.
46. Jung DW, Baysal K, Brierley GP. The sodium-calcium antiporter of heart mitochondria is not electro-neutral. *J Biol Chem* 1995;270(2):672-8.
47. Griffiths EJ. Reversal of mitochondrial Na/Ca exchange during metabolic inhibition in rat cardiomyocytes. *FEBS Lett* 1999;453(3):400-4.
48. Lacka Z, Puskar M, Figueroa JP, Zhang J, Rajapakse N, Busija DW. Mitochondrial nitric oxide synthase is constitutively active and is functionally upregulated in hypoxia. *Free Radic Biol Med* 2001;31(12):1609-15.

49. Kirshenbaum LA, de Moissac D. The bcl-2 gene product prevents programmed cell death of ventricular myocytes. *Circulation* 1997;96:1580-5.
50. Padilla F, García-Dorado D, Agulló L, Inserte J, Paniagua A, Mirabet S, et al. L-arginine administration prevents reperfusion-induced cardiomyocyte hypercontracture and reduces infarct size in the pig. *Cardiovasc Res* 2000;46:412-20.
51. Taimor G, Rakow A, Piper HM. Transcription activator protein 1 (AP-1) mediates NO-induced apoptosis of adult cardiomyocytes. *FASEB J* 2001;15(13):2518-20.
52. Griffiths EJ, Halestrap AP. Protection by cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1993;25:1461-9.
53. Chen Z, Chua CC, Ho Ys, Hamdy RC, Chua BH. Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280(5):H2313-20.
54. Javadov SA, Lim KH, Kerr PM, Suleiman MS, Angelini GD, Halestrap AP. Protection of hearts from reperfusion injury by propofol is associated with inhibition of the mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res* 2000;45(2):360-9.
55. Ruiz-Meana M, García-Dorado D, Pina P, Inserte J, Agulló L, Soler-Soler J. Caripode preserves mitochondrial protonmotive force and ATP synthesis in cardiomyocytes during ischemic conditions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H999-1006.
56. Ruiz-Meana M, Pina P, Rodríguez-Sinovas A, Barba I, Miró E, Mirabet M, et al. Glycine protects cardiomyocytes against lethal reperfusion injury by inhibiting mitochondrial transition pore opening. *J Physiol* 2004;558:873-82.

DISCUSIÓN

F. SORIGUER: Me gustaría comentar el concepto de área de conocimiento, ya que tú has manifestado tus dudas respecto a la delimitación entre las áreas de vascular y de cardiología. Creo que habría que tener un cierto respeto al concepto de disciplina. A mi modo de entender, las habilidades son lo que distingue una disciplina de ese concepto universal del conocimiento.

D. GARCÍA-DORADO: Efectivamente, a medida que la investigación se hace más básica existen menos fronteras. En mi laboratorio, por ejemplo, tenemos cardiólogos, bioquímicos, químicos, veterinarios, farmacéuticos, técnicos, etc. Con lo cual, en el aspecto básico las disciplinas realmente no existen y no tiene ningún sentido discutir sobre qué campos defiende cada uno. Efectivamente, en el aspecto clínico, lo que define a cada cual son las técnicas y una formación clínica, es decir, una capacidad de integrar y decidir con experiencia en su área de actividad.

F. SORIGUER: ¿Concibes que un investigador básico—que yo considero que se le debería denominar investigador preclínico— que lleva 30 años realizando esta tarea pueda dedicarse en algún momento a la clínica?

D. GARCÍA-DORADO: La investigación básica no existe como tal en el área de la cardiología ni de la biomedicina. La investigación básica es otra cosa. Por tanto, estoy completamente de acuerdo en que la investigación no se debe llamar "básica", pero no estoy de acuerdo en que se

deba denominar "preclínica", ya que muchas de las cosas que se realizan no llegan a la clínica ni tienen por qué llegar. Yo hablaría, en todo caso, de "investigación básica" entre comillas. Respecto a si se puede pasar de la clínica a la básica y de la básica a la clínica, no es una pregunta fácil de responder. Un básico que jamás ha hecho clínica no tiene la misma formación que un clínico, entre otras cosas por motivos prácticos (cuando una persona empieza una carrera básica se mantiene como básico). En cambio, hay muchos clínicos que han hecho el trasvase a la básica. Este trasvase es difícil pero posible y conlleva una serie de ventajas y desventajas. En mi caso, debo diseñar experimentos y elaborar proyectos y manuscritos sobre aspectos de biología celular y molecular. Para ello estoy en cierta desventaja con los bioquímicos, que han estado toda la vida manejando estos temas. Por otro lado, tengo la ventaja, y aquí está el truco, de que conozco muy bien la realidad del problema clínico que pretendemos abordar.

En cuanto a la capacidad de combinar ambas cosas, depende del área en la que se trabaja. Por ejemplo, en nuestro laboratorio tenemos un cardiólogo que trabaja dos días en la unidad coronaria y tres días en el laboratorio. En el laboratorio trabaja en trombosis y en el papel de las plaquetas en el daño miocárdico y en la clínica también trata con plaquetas, con lo cual es fácil trabajar con plaquetas en los dos ámbitos. Sin embargo, en otras áreas es muy difícil poder compatibilizar una cosa con la otra. Por último, me gustaría señalar que algunos investi-

gadores consideran que la investigación clínica, generalmente realizada por clínicos que atienden pacientes, es conceptualmente sencilla y quizás de un nivel intelectual menor que la investigación básica, muchas veces realizada por "investigadores profesionales". Creo que es importante darse cuenta de que ambas formas de investigación, la más básica y la más aplicada, son esenciales y complementarias y que la investigación clínica de calidad tiene la misma dignidad intelectual que la que se realiza enteramente en el laboratorio.

Y. ÁLVAREZ: En los experimentos que has presentado, me ha parecido entender que cuando se reperfunde en el corazón podría aumentar la muerte celular con el tiempo. ¿Esto tiene alguna correlación con las troponinas?

D. GARCÍA-DORADO: Las troponinas son moléculas de gran tamaño específicas del miocardio que aparecen en sangre en caso de lisis de membrana y, por tanto, son un marcador. Efectivamente, la reperfusión causa muerte celular. ¿Qué ocurre? Que la muerte celular que causa es siempre menor que la que se produciría si no se hubiese realizado la reperfusión. Por ejemplo, nosotros tenemos diez miocitos isquémicos, con isquemia intensa, y en el momento de la reperfusión se mueren siete, pero hemos salvado tres con la reperfusión. A nivel experimental nosotros, en el momento de reperfundir, intentamos que en vez de morirse siete, mueran tres miocitos. Por tanto, esto confirma que la reperfusión deba considerarse tratamiento de primera línea y como condición *sine qua non* para que podamos realizar luego otro tratamiento en el paciente con oclusión coronaria e infarto de miocardio.

S. ERILL: ¿Se han hecho estudios con hipoxia en la reperfusión?

D. GARCÍA-DORADO: Se han hecho, lo que ocurre es que en realidad no se trata de reperfusión, ya que las arritmias aparecen en el momento de restaurar el flujo o en el momento de restaurar el oxígeno y la respuesta es muy local y poco trascendente. Lo que sí es importante es que desde hace mucho tiempo se han realizado esfuerzos modificando las condiciones de reperfusión, y esto en el campo de la cirugía cardiovascular se ha aplicado desde hace tiempo de manera empírica (en el campo de la cardiología se ha aplicado menos). Ocurre que el paradigma de por qué las células se mueren ha cambiado. Primero se discutía si las células podían morir en el momento de la reperfusión o si podían estar ya muertas. Esto ocurría en parte porque los experimentos que se hacían para evitar la muerte celular no eran muy claros. El mecanismo de muerte no estaba claro y se pensaba que los radicales libres del oxígeno eran el factor crítico. Ahora, gracias al trabajo de muchos grupos durante muchos años, hemos llegado a la conclusión de que los radicales libres ejercen un papel que puede ser importante en determinados aspectos de todo este complicado y demostrado esquema, pero que no son el único factor. Se pueden corregir otros factores para salvar células que de otra manera iban a morir. La isquemia produce acidosis y la normalización del pH rápida durante la reperfusión es tremendamente deletérea. Si se logra hacer que sea más progresiva y más tardía se obtienen claros beneficios terapéuticos. Por tanto, lo que hace falta es desarrollar fármacos que sean capaces de hacer esto a través de las vías más adecuadas.