

Medicina cardiovascular traslacional (II)

## Fisiopatología del daño miocárdico por isquemia-reperfusión: nuevas oportunidades terapéuticas en el infarto agudo de miocardio

Marisol Ruiz-Meana y David García-Dorado

Servicio de Cardiología. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona. España.

La muerte de los cardiomiocitos es la principal causa del impacto de la cardiopatía isquémica en la supervivencia y la calidad de vida. Se produce masivamente durante el infarto agudo de miocardio, y la recanalización coronaria no suele ser capaz de prevenirla. Los estudios experimentales han demostrado que una parte significativa de esta muerte celular se produce en los primeros minutos de reperfusión, y que los tratamientos dirigidos a interferir con los mecanismos de su desarrollo reducen el tamaño de infarto. Entre estos mecanismos, la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ , la permeabilización mitocondrial y la fragilidad del citoesqueleto/sarcolema (producida por la activación de proteasas) desempeñan un papel crítico. Además, la muerte celular se puede propagar a los cardiomiocitos adyacentes a través de *gap junctions*. Otras células miocárdicas y sanguíneas contribuyen a la muerte precoz y tardía de los cardiomiocitos durante la reperfusión. La mayoría de los tratamientos desarrollados contra el daño por reperfusión están circunscritos al ámbito experimental, pero algunos se han probado con éxito en pacientes, como el péptido natriurético auricular, la inhibición de la permeabilización mitocondrial y el poscondicionamiento. La posibilidad de salvar miocardio mediante tratamientos coadyuvantes aplicados durante la recanalización coronaria representa una nueva oportunidad terapéutica para los pacientes con infarto agudo de miocardio.

**Palabras clave:** Necrosis. Calcio. Hipercontractura. Mitocondrias.

La enfermedad coronaria es una de las principales causas de muerte y de incapacidad, con predicciones epidemiológicas que apuntan a que su morbimortalidad superará a la del cáncer y las en-

### Pathophysiology of Ischemia-Reperfusion Injury: New Therapeutic Options for Acute Myocardial Infarction

The impact of coronary artery disease on survival and quality of life is mainly due to cardiomyocyte death. Massive cardiomyocyte death occurs during acute myocardial infarction but emergency coronary recanalization is usually not able to prevent it. Laboratory research has demonstrated that a significant part of that cell death takes place during the first few minutes of reperfusion and that treatment aimed at disrupting the mechanisms responsible can reduce the size of the infarct. Those mechanisms include  $\text{Ca}^{2+}$  overload, mitochondrial permeabilization and cytoskeletal and membrane fragility (induced by the activation of proteases), all of which play critical roles. Moreover, cell death can propagate to adjacent cardiomyocytes via gap junctions. In addition, other myocardial and blood cells also contribute to both immediate and delayed cardiomyocyte death during reperfusion. Most forms of treatment developed to protect against reperfusion injury are still at the experimental stage, though some have been successfully tested in patients, such as atrial natriuretic peptide, inhibition of mitochondrial permeabilization and ischemic postconditioning. The possibility that myocardial salvage can be achieved by administering adjuvant treatment during coronary recanalization presents acute myocardial infarction patients with a new therapeutic option.

**Key words:** Necrosis. Calcium. Hypercontracture. Mitochondria.

Full English text available from: [www.revespcardiol.org](http://www.revespcardiol.org)

fermedades infecciosas en los próximos años en todos los países del mundo<sup>1</sup>. Las consecuencias devastadoras de esta enfermedad en la salud mundial se producen, en su mayor parte, por un mecanismo único, la muerte celular, que de forma directa o indirecta —a través del fallo contráctil, el remodelado ventricular y las arritmias— origina el desarrollo de insuficiencia cardíaca, incapacidad y muerte. El grado de extensión de la muerte celular (necrosis) causada por una oclusión coronaria aguda depende

Correspondencia: Dr. D. García-Dorado.  
Servicio de Cardiología. Hospital Universitari Vall d'Hebron.  
Pg. Vall d'Hebron, 119-129. 08035 Barcelona. España.  
Correo electrónico: [dgdorado@vhebron.net](mailto:dgdorado@vhebron.net)

no sólo de la extensión del área en riesgo, sino también de la severidad y duración de la isquemia. En los últimos años se ha producido un auténtico avance médico que ha ayudado de forma significativa a mejorar la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes con enfermedad coronaria. Este avance médico ha consistido en el desarrollo de tratamientos capaces de restaurar el flujo sanguíneo (terapia de reperfusión) en los pacientes con infarto agudo de miocardio.

Es bien conocido que la supervivencia de las células isquémicas depende de diversos factores, y que la duración de la isquemia a la que han estado sometidas en el momento en que se produce la restauración del flujo sanguíneo es el principal factor determinante del éxito de la terapia por reperfusión. Este conocimiento ha hecho que se invierta un gran esfuerzo en disminuir el tiempo que se tarda desde que un paciente siente un dolor torácico hasta que se le practica la reperfusión terapéutica. Sin embargo, cada vez es más costoso y difícil conseguir una reducción adicional de este intervalo y, a pesar de las mejoras en los procedimientos de reapertura de la arteria coronaria, que permiten una recanalización más efectiva, rápida, completa y permanente de las arterias coronarias ocluidas de forma aguda, la gran mayoría de los pacientes con síndrome coronario agudo con elevación del segmento ST continúan presentando necrosis miocárdicas más o menos extensas.

La terapia de reperfusión, ya sea con trombolisis o por procedimientos invasivos, no garantiza que las células isquémicas sobrevivan, y numerosos estudios de investigación llevados a cabo en las últimas dos décadas han establecido de forma inequívoca que, aunque la revascularización es la única alternativa posible para rescatar las células isquémicas de una muerte segura, una parte de la muerte celular se precipita, paradójicamente, por la propia restauración del flujo<sup>2</sup>. Este fenómeno, conocido como daño por reperfusión, ha sido exhaustivamente explorado en diversos modelos experimentales, pero sólo recientemente se ha reconocido su relevancia en el contexto de la reperfusión clínica. Por ello, la posibilidad de mejorar la eficacia de la trombolisis y de las intervenciones coronarias percutáneas mediante tratamientos cardioprotectores coadyuvantes empleados en el momento de la revascularización abre una nueva ventana terapéutica capaz de mejorar el resultado clínico cuando ya no es posible modificar el tiempo de isquemia.

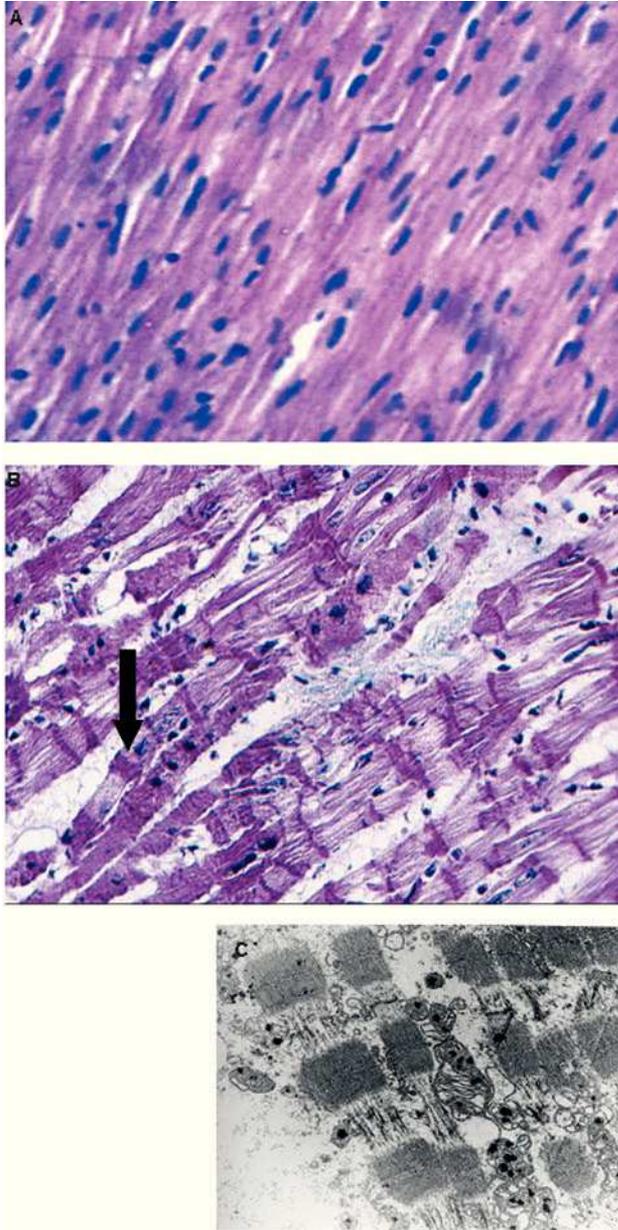
El desarrollo de estrategias de cardioprotección se basa en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos de la muerte celular aguda durante la reperfusión miocárdica. Aunque algunos de estos mecanismos han sido clásicamente conocidos por los cirujanos cardiovasculares (y prevenidos me-

dante estrategias de cardioprotección utilizadas en el contexto de la cirugía cardiaca), muchos otros se encuentran en fase de investigación. En los últimos años se ha producido un gran avance científico en el conocimiento y la identificación de diversos factores implicados en la muerte celular por reperfusión, y gracias a esta investigación se han identificado nuevas dianas terapéuticas potencialmente útiles para prevenirla.

## **NECROSIS MIOCÁRDICA EN LOS PRIMEROS MINUTOS DE LA REPERFUSIÓN**

Cuando la reperfusión se produce lo suficientemente pronto para salvar miocardio isquémico en riesgo, que se encuentra reversiblemente dañado y habría desarrollado infarto si no se hubiera abierto la arteria, las células que son capaces de recuperar el control de la homeostasis iónica sobreviven; sin embargo, en una proporción variable de cardiomiocitos el desequilibrio iónico no sólo no se corrige, sino que empeora, y acaba por desencadenar la muerte celular inmediata en forma de necrosis. Este tipo de muerte se caracteriza porque se produce durante los primeros minutos de la restauración del oxígeno y del flujo sanguíneo, y se acompaña de rotura de las membranas celulares y liberación al medio extracelular del contenido de las células (principalmente enzimas citosólicas), lo que da lugar a una apariencia histológica característica de necrosis en bandas de contracción<sup>3</sup>, en la que los cardiomiocitos individuales se encuentran masivamente acortados y con una desorganización completa de su estructura sarcomérica. Las imágenes ultraestructurales de estas células obtenidas mediante microscopio electrónico muestran rotura sarcolemal, edema mitocondrial y depósitos masivos de  $Ca^{2+}$  en la matriz mitocondrial, además de acortamiento y desorganización de las miofibrillas sarcoméricas (fig. 1).

Las características de esta necrosis se pueden reproducir en un experimento clásico de laboratorio, que consiste en someter a un corazón aislado de rata y perfundido retrógradamente a través de un sistema de Langendorff a una isquemia transitoria (normalmente, entre 40 y 60 min) y posterior reperfusión. Esta maniobra experimental produce una gran liberación de enzimas intracelulares (creatincinasa, lacatodeshidrogenasa) en los primeros minutos de reperfusión, cuya magnitud se correlaciona con la extensión de las áreas de necrosis en bandas de contracción visualizadas a partir de los cortes histológicos. Este tipo de respuesta es la demostración experimental de que la muerte celular miocárdica ocurre de forma precoz en el momento de la restauración del flujo<sup>4</sup>. Como veremos, esta muerte celular puede prevenirse por intervenciones aplicadas en el momento de la reperfusión.



**Fig. 1.** Imagen histológica de un miocardio porcino control (A) y de un miocardio porcino reperfundido después de una isquemia de 50 min (B), en el que se aprecia la desestructuración tisular, caracterizada por un gran acortamiento celular y el desarrollo de bandas de contracción (como la indicada por la flecha). C: detalle de la ultraestructura de una banda de contracción, con apelonamiento de las proteínas sarcoméricas y edema y desestructuración de las mitocondrias.

Los estudios llevados a cabo en modelos celulares de cardiomiocitos aislados han demostrado que la reoxigenación después de un periodo de isquemia simulada produce un acortamiento abrupto de la longitud celular en los primeros minutos de la reenergización, acompañado por una desorganización de la citoarquitectura, cuyas características ultraestructurales son coincidentes con las de la necrosis en bandas de contracción de los cortes histológi-

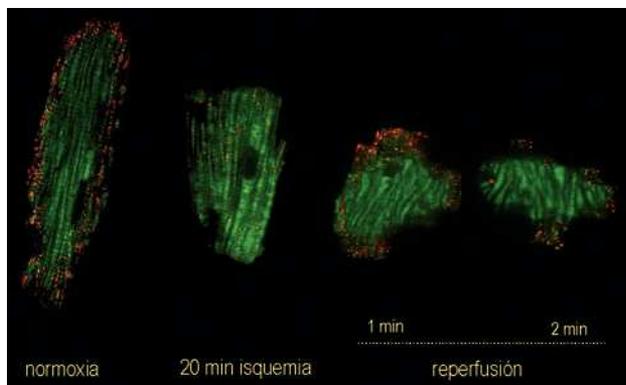
cos<sup>5</sup>. Este tipo de respuesta a escala celular se ha denominado hipercontractura, y la probabilidad de que ocurra depende del tiempo transcurrido entre que se produce una depleción severa de las reservas intracelulares de ATP durante la isquemia y el momento en el que se establece la reenergización<sup>6</sup>. El análisis con cristales piezoeléctricos ultrasónicos de la longitud de los segmentos miocárdicos ha permitido determinar el grado de acortamiento miocárdico que se produce durante la reperfusión, detectado como una reducción de la longitud telediastólica por debajo del nivel basal, y cuya magnitud se correlaciona con la extensión del área de necrosis en bandas de contracción<sup>7</sup>. Esta variable es una de las muchas determinaciones experimentales que indican que la necrosis en bandas de contracción de los infartos reperfundidos equivale a la hipercontractura observada en los cardiomiocitos aislados.

### **Pérdida de la homeostasis iónica durante la isquemia-reperfusión**

Los mecanismos que conducen al acortamiento celular masivo por hipercontractura han sido objeto de intensa investigación en el modelo de miocitos aislados, en el que es posible analizar simultáneamente los cambios morfológicos y los desequilibrios iónicos en un entorno controlado. Este tipo de estudios ha demostrado que la hipercontractura está causada por la coincidencia de la reenergización (que reactiva la actividad contráctil de las miofibrillas dependiente de ATP) en presencia de una concentración anormalmente elevada de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (que, en presencia de ATP, genera una fuerza contráctil incontrolada y excesiva) (fig. 2)<sup>8</sup>. La pérdida de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  se inicia durante el periodo previo de isquemia, en el que se producen importantes cambios en la composición citosólica<sup>6</sup>.

Uno de los primeros desequilibrios iónicos que se instauran durante la isquemia es el aumento sostenido de la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  debido al fallo de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  del sarcolema, que no puede operar en ausencia de energía, y la acidificación progresiva del citosol por la puesta en marcha de la glucólisis anaeróbica. La célula trata de corregir la sobrecarga de  $\text{Na}^+$  a través del intercambiador de membrana  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  en su modo reverso, que no requiere energía para funcionar y que extruye el  $\text{Na}^+$  intracelular a costa de introducir  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la células, y de esta forma se inicia un proceso de pérdida progresiva del control de  $\text{Ca}^{2+}$ , uno de los cationes que en condiciones fisiológicas se encuentra más estrictamente regulado en el medio intracelular.

La reenergización de las células que se encuentran en esta situación de riesgo puede precipitar un empeoramiento abrupto del control catiónico, prin-



**Fig. 2.** Secuencia temporal obtenida por microscopio confocal ( $\times 400$ ) de un miocito cardiaco de rata en condiciones control (normoxia), después de 20 min de isquemia simulada y durante los primeros 2 min de reenergización. La célula está marcada con un fluorocromo específico que refleja los cambios en el potencial de membrana mitocondrial (JC-1), utilizado como un índice de la fosforilación oxidativa. La pérdida del color rojo en relación con el verde refleja la despolarización mitocondrial. A los 20 min de isquemia, la mayoría de las mitocondrias se encontraban despolarizadas debido a una depleción energética severa, que se acompaña de un acortamiento de la longitud celular o rigor isquémico. Durante los primeros minutos de reperfusión se produjo una repolarización mitocondrial rápida simultánea al desarrollo de hipercontractura.

principalmente por la puesta en marcha de mecanismos dirigidos a corregir la acidosis intracelular que acaban por empeorar aún más la sobrecarga citosólica de  $\text{Na}^+$ . La llegada de flujo sanguíneo produce un lavado rápido de los catabolitos (fundamentalmente  $\text{H}^+$ ) del medio extracelular, lo que da lugar a un gradiente de pH entre las células y su entorno, causa de la activación de los mecanismos de corrección de la acidosis intracelular (principalmente a través del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de la membrana plasmática y del cotransportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ ). Esta respuesta de corrección de la acidosis intracelular empeora aún más la sobrecarga citosólica de  $\text{Na}^+$  que, de nuevo, es manejada por la célula activando el modo inverso del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , lo que produce<sup>9</sup> un influjo adicional de  $\text{Ca}^{2+}$ . La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del modo inverso del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  es poco relevante en condiciones fisiológicas en los miocitos humanos, pero puede ser deletérea cuando la célula se encuentra sobrecargada de  $\text{Na}^+$ . Como resultado de todos estos mecanismos de corrección en cadena la célula reoxigenada acumula una gran cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  en su interior, comprometiendo seriamente su propia supervivencia. De hecho, la inhibición farmacológica del intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  con KB-R7943 se ha mostrado capaz de reducir la sobrecarga citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  en cardiomiocitos aislados y el tamaño de infarto en un modelo de oclusión coronaria transitoria in situ<sup>9</sup>.

## Edema celular, fragilidad estructural y uniones intercelulares

Además de los cambios iónicos que se producen en el citosol descritos más arriba, la reactivación del metabolismo energético tiene consecuencias directas en la integridad y el funcionamiento de estructuras celulares vitales (citoesqueleto, orgánulos intracelulares y sarcolema). En primer lugar, la aparición de edema celular por efecto del lavado de los metabolitos que estaban acumulados en el espacio extracelular crea un gradiente osmótico transsarcolema y favorece la entrada de agua al interior de las células. El aumento de volumen en células que tienen el citoesqueleto y la membrana celular fragilizados favorece la pérdida de la integridad celular. Los estudios experimentales han demostrado que la reperfusión hiperosmótica puede tener efectos beneficiosos en el tamaño del infarto al reducir el grado de edema y la muerte celular<sup>10</sup>.

En segundo lugar, el desarrollo de fragilidad mecánica durante la isquemia puede reducir significativamente la resistencia de las células al propio estrés mecánico impuesto por la reperfusión. Los mecanismos que conducen a la fragilización de las estructuras celulares no son bien conocidos, pero se ha descrito que la activación de las calpaínas puede dar lugar a una proteólisis de estructuras del citoesqueleto subsarcolema<sup>11,12</sup>. Las calpaínas son proteasas activadas por  $\text{Ca}^{2+}$  que se encuentran inhibidas por la acidosis, pero desempeñan un papel crítico en la muerte de los cardiomiocitos durante la reperfusión, por la concurrencia de la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  y la normalización del pH. La degradación —mediada por calpaína— de la ankirina, una proteína que participa en el anclaje de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa de la membrana al citoesqueleto subsarcolema, es una causa importante de disfunción de la bomba de  $\text{Na}^+$  durante la reperfusión inicial<sup>13</sup>. Esta degradación proteolítica puede dar pie a la instauración de un círculo vicioso, en el que la sobrecarga de  $\text{Na}^+$  favorezca la entrada adicional de  $\text{Ca}^{2+}$  y perpetúe el estado de activación de las calpaínas que, a su vez, empeoran la sobrecarga de  $\text{Na}^+$  intracelular, lo que desencadena el desarrollo de hipercontractura y muerte celular.

Incluso en presencia de fragilidad, la hipercontractura no suele causar rotura del sarcolema en miocitos aislados, pero sí en las células intactas que forman parte del tejido miocárdico. Esta diferencia en la respuesta al estrés mecánico impuesto por la hiperactivación contráctil puede tener varias explicaciones. Una de ellas es que la ausencia de edema osmótico en los miocitos aislados reoxigenados (en los que no se produce efecto de lavado durante la reperfusión) reduce la tensión mecánica del sarcolema secundaria al desarrollo de hipercontractura<sup>14,15</sup>.

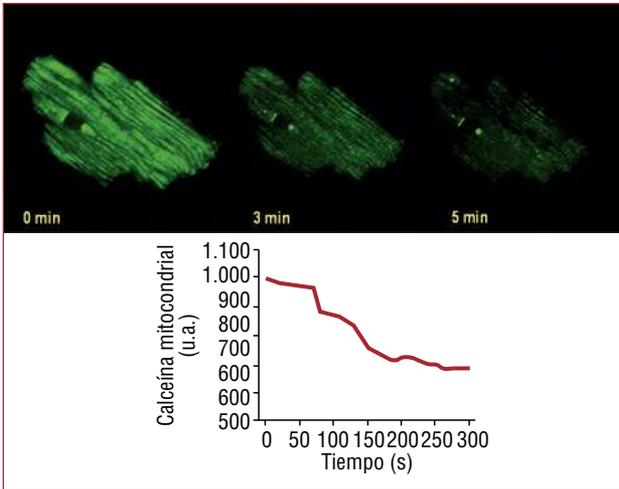
Otra posible explicación es que la presencia de uniones intercelulares en el tejido intacto impone fuerzas de tensión y desgarramiento durante el acortamiento celular que facilitan la rotura de la membrana celular. Estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la hipercontractura de un miocito puede transmitirse a los miocitos adyacentes a través de las uniones intercelulares de tipo *gap junction*, y que la propagación célula a célula de la hipercontractura contribuye al tamaño final de los infartos reperfundidos<sup>16,17</sup>. El uso de inhibidores farmacológicos de la comunicación intercelular se ha demostrado efectivo en la reducción de la muerte celular durante los primeros minutos de reperfusión en diversos modelos experimentales<sup>18,19</sup>. Nuestro laboratorio ha demostrado que el mecanismo de esta propagación del daño celular se basa en el paso de  $\text{Na}^+$  a través de las *gap junctions* desde el miocito hipercontraído a los miocitos adyacentes, y a la ulterior activación del intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  en la célula adyacente, lo que a su vez induce sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  y desarrollo de hipercontractura en esa célula<sup>20</sup>.

### **El retículo sarcoplásmico y las mitocondrias en la génesis de la hipercontractura y la muerte celular**

En condiciones fisiológicas los cardiomiocitos consumen una gran cantidad de energía química para producir el trabajo mecánico. La contracción miofibrilar es un fenómeno altamente regulado y sincrónico, que está mediado por aumentos transitorios del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico procedentes, en su mayor parte, del retículo sarcoplásmico. La participación del retículo sarcoplásmico en algunas enfermedades y, en particular, en la génesis de ciertos tipos de arritmias, en la progresión de la insuficiencia cardíaca y en la miocardiopatía diabética, se conoce desde hace tiempo. Mucho menos conocida, sin embargo, es la contribución del retículo sarcoplásmico al desarrollo del daño letal por reperfusión, a pesar de que hay sólidas evidencias experimentales que demuestran que puede desempeñar un papel decisivo en la muerte necrótica de los cardiomiocitos. Durante los primeros minutos de la reperfusión miocárdica, el retículo sarcoplásmico se encuentra en un entorno de gran sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ , y la reactivación mitocondrial de la síntesis de ATP pone en marcha el funcionamiento de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA), encargada de la captación del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, incluso a pesar de la persistencia de un flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  aumentado desde el medio extracelular. Como resultado de ello, se produce una gran acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior del retículo sarcoplásmico que excede su capacidad de almacenamiento, por lo que finalmente el  $\text{Ca}^{2+}$

es extruido a través de los receptores de ryanodina (RyR) y luego vuelve a ser captado, lo que da lugar a un patrón de oscilaciones rápidas de  $\text{Ca}^{2+}$  que se propagan a lo largo de la célula e imponen una fuerza mecánica que puede sobrepasar la capacidad elástica de los sarcómeros<sup>21</sup>. Diversos estudios experimentales han demostrado que el bloqueo farmacológico de las oscilaciones del  $\text{Ca}^{2+}$  por parte del retículo sarcoplásmico reduce la incidencia de hipercontractura en miocitos reoxigenados<sup>22</sup> y que la activación de vías de señalización intracelulares que interfieren con los movimientos del  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes del retículo sarcoplásmico —por ejemplo, con agonistas del péptido natriurético— confieren protección durante la reperfusión miocárdica, tanto en animales como en humanos<sup>23,24</sup>.

Aunque la hipercontractura por sí sola puede ser un factor determinante en la rotura del sarcolema, existen otros mecanismos propuestos recientemente que también pueden contribuir al daño por reperfusión y a la muerte celular. Uno de los que están siendo actualmente objeto de intensa investigación es la pérdida de la integridad de las mitocondrias cuando concurren ciertas condiciones patológicas (sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ , déficit energético, daño oxidativo), por un cambio brusco en la permeabilidad de sus membranas, un fenómeno conocido como transición de permeabilidad mitocondrial<sup>25</sup>. Este cambio brusco en la permeabilidad mitocondrial produce un desacoplamiento de la respiración celular y un colapso energético incompatible con la supervivencia celular<sup>26</sup>. La transición de la permeabilidad mitocondrial se ha documentado durante la reperfusión miocárdica, como consecuencia principalmente del daño oxidativo y la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  y por la rápida corrección de la acidosis intracelular, uno de los inhibidores más efectivos de este cambio de permeabilidad mitocondrial (fig. 3)<sup>27-29</sup>. Aunque parece claro que la transición de la permeabilidad mitocondrial produce liberación del citocromo C y pone en marcha la cadena de señalización que conduce a la apoptosis celular, el mecanismo por el que causa necrosis en el miocardio reperfundido no se conoce bien<sup>30</sup>. De hecho, el colapso energético secundario a la permeabilización mitocondrial es difícil de reconciliar con el desarrollo de hipercontractura, ya que tanto los primeros estudios sobre daño letal por reperfusión<sup>31</sup> como los datos recientes obtenidos con espectroscopia por resonancia magnética (datos no publicados) demuestran que la hipercontractura es un fenómeno dependiente de energía. Tampoco está claro el mecanismo por el que la depleción energética inducida por el cambio de permeabilidad mitocondrial puede causar rotura del sarcolema en los primeros minutos de la reperfusión. Estudios recientes en cardiomiocitos aislados, en los que se induce la transición de la permeabili-



**Fig. 3.** Secuencia temporal obtenida por microscopio confocal ( $\times 400$ ) de un miocito cardiaco de rata durante los primeros minutos de reperusión, en el que las mitocondrias se han marcado con calceína, un fluorocromo que se queda atrapado en su interior a menos que se produzca una transición de la permeabilidad mitocondrial. En este ejemplo concreto, el aparato contráctil de la célula fue bloqueado con BDM para prevenir el desarrollo de hipercontractura y evitar artefactos en la intensidad de la señal fluorescente. Durante los primeros minutos de reperusión, se produjo una caída importante de la señal fluorescente mitocondrial, indicio de permeabilización mitocondrial.

dad mitocondrial mediante estimulación con pulsos de láser, indican que la transición de permeabilidad en unas pocas mitocondrias dentro de la célula puede empeorar el manejo del  $\text{Ca}^{2+}$  celular, ya que se acompaña de una liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial hacia el espacio citosólico, lo que favorece el desa-

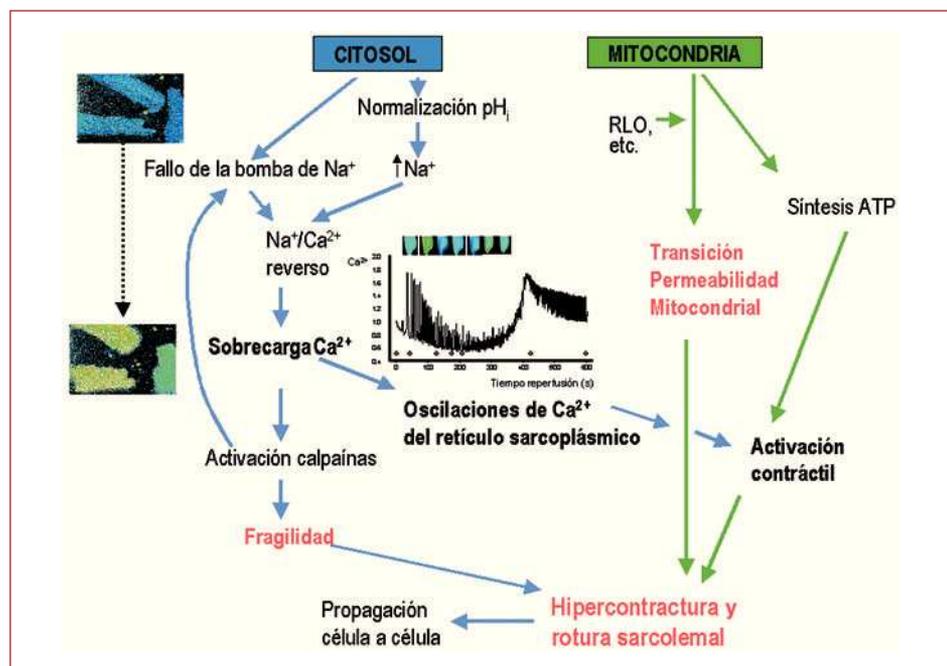
rollo de hipercontractura siempre que la célula conserve un número suficiente de mitocondrias intactas capaces de mantener la demanda energética<sup>32</sup>. En la figura 4 se muestra un esquema del mecanismo fisiopatológico del daño por reperusión.

### La contribución de otros tipos celulares al daño por isquemia-reperusión

Por último, no hay que olvidar que aunque la mayor parte de las características de la necrosis secundaria a una isquemia miocárdica transitoria pueden reproducirse experimentalmente en preparaciones de cardiomiocitos aislados y en corazones aislados y perfundidos, otros tipos celulares, como las plaquetas, los neutrófilos y los fibroblastos, entre otros, pueden contribuir al daño por reperusión y a la extensión final de la muerte celular. En particular, las plaquetas activadas durante la isquemia-reperusión se adhieren al endotelio microvascular del miocardio reperfundido a través de la L-selectina y liberan factores que contribuyen a la pérdida de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  y a la muerte miocitaria<sup>33-35</sup>.

### DE LA INVESTIGACIÓN DE LABORATORIO A LOS PACIENTES: LOS RETOS DE LA MEDICINA TRASLACIONAL

El daño letal por reperusión puede ser un objetivo terapéutico en pacientes con infarto agudo de miocardio. La posibilidad de aplicar tratamientos coadyuvantes durante la angioplastia se debe basar



**Fig. 4.** Representación esquemática de los mecanismos que conducen a la muerte celular durante los primeros minutos de reperusión. RLO: radicales libres de oxígeno.

en el conocimiento de los mecanismos moleculares y celulares que conducen a la muerte necrótica aguda durante la reperfusión miocárdica. Sin embargo, a menudo la investigación básica encuentra numerosas barreras para su traslación al contexto clínico, y aunque ciertos fármacos e intervenciones han demostrado ser eficaces para reducir la muerte celular en modelos celulares y animales, casi nunca llegan a desarrollarse comercialmente para su uso en humanos. Las razones del fracaso en la traslación de la investigación biomédica suelen atribuirse a las diferencias que existen entre especies en la patogenia de las enfermedades y en la respuesta a los tratamientos, y a que los modelos experimentales no son capaces de reproducir adecuadamente la complejidad de los procesos fisiopatológicos que tienen lugar en el contexto clínico, pero existen otras muchas razones que pueden explicar este fracaso.

### Falta de adecuación en la traslación de los conocimientos

Una de las aproximaciones experimentales que ha tenido un efecto protector claro tanto en modelos animales como en órganos perfundidos o células en cultivo es la inhibición del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  con cariporide<sup>36,37</sup>. La acidosis intracelular que se instaura progresivamente durante la isquemia contribuye a la sobrecarga patológica de  $\text{Na}^+$ , por acción del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de la membrana celular. Este mecanismo no es operativo en células normales, de forma que la inhibición del intercambiador podría constituir una buena diana terapéutica capaz de actuar específicamente durante el proceso patológico. Experimentos realizados por nuestro grupo y por otros grupos de investigación han demostrado que, efectivamente, la inhibición del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  con cariporide antes de una oclusión coronaria es capaz de reducir significativamente el tamaño de la necrosis en la reperfusión, pero su mecanismo de acción no se basa en prolongar la acidosis, como se había previsto, sino en retrasar la depleción de las reservas energéticas celulares y la aparición de rigor isquémico<sup>38,39</sup>. Su administración en el momento de la reperfusión no tiene ningún efecto en el tamaño del infarto porque los cardiomiocitos son capaces de corregir la acidosis intracelular a pesar de tener el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  inhibido mediante otros mecanismos paralelos (fundamentalmente el cotransportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ ), que contribuyen a la sobrecarga de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y contrarrestan el efecto protector de cariporide<sup>40</sup>.

A pesar de estas evidencias, se han llevado a cabo diversos ensayos clínicos con el objetivo de investigar el efecto protector de la inhibición del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en pacientes con infarto agudo de

miocardio: el estudio Guard During Ischemia Against Necrosis (GUARDIAN)<sup>41</sup>, el estudio Evaluation of the Safety And Cardioprotective Effects of Eniporide in Acute Myocardial Infarction (ESCAMI)<sup>42</sup> y el estudio Sodium-Hydrogen Exchange Inhibition to Prevent Coronary Events in Acute Cardiac Conditions (EXPEDITION)<sup>43</sup>. El estudio GUARDIAN incluyó a más de 11.000 pacientes con síndrome coronario agudo, que fueron sometidos a angioplastia o se les practicó cirugía, y que recibieron cariporide a distintas dosis (20 mg, 80 mg o 120 mg). La administración de cariporide a altas dosis fue protectora cuando los pacientes recibieron el tratamiento antes de la isquemia (un requisito que se cumplió únicamente en el subgrupo de pacientes que eran sometidos a cirugía de *bypass*). El fármaco no tuvo efectos protectores en las demás variables de estudio (tasa de reinfarctos, evolución de los pacientes que no llegaron a presentar isquemia severa), de acuerdo con lo que habían previsto los estudios experimentales. En el estudio ESCAMI se seleccionó específicamente a pacientes con oclusión coronaria con elevación del segmento ST sometidos a reperfusión (un total de 959) y se administró eniporida (hasta 200 mg) en el momento de la reperfusión. Los resultados de este estudio fueron negativos, y el tratamiento farmacológico resultó ser seguro pero ineficaz. A la vista de los resultados positivos en el subgrupo de pacientes que eran sometidos a cirugía del estudio GUARDIAN, se diseñó el estudio EXPEDITION, un gran ensayo clínico que incluyó a más de 5.700 pacientes sometidos a cirugía de *bypass* aortocoronario, a los que se administró una dosis muy elevada de cariporide (más de 200 mg) durante un lapso muy prolongado. Los resultados de este estudio también demostraron una reducción del daño miocárdico, tal como se había descrito en el estudio GUARDIAN, pero hubo un aumento significativo en la incidencia de accidentes cerebrovasculares asociado al tratamiento. En conjunto, se trata de una serie de ejemplos en los que la investigación traslacional ha fracasado por la inadecuación del diseño de los estudios clínicos (tanto en la selección de la población como en las variables de estudio, las dosis y el tiempo de administración del tratamiento farmacológico) a los resultados experimentales.

Otro problema que se presenta con frecuencia a la hora de trasladar los resultados experimentales a los estudios clínicos es que se ponen a prueba dianas terapéuticas cuyo papel fisiopatológico es dudoso o sobre las que no hay evidencia científica suficientemente sólida. Así, por ejemplo, se han diseñado numerosos estudios clínicos para probar el efecto cardioprotector de los fármacos que inhiben la formación de los radicales libres del oxígeno, con resultados negativos o controvertidos<sup>44</sup>, basán-

dose en la hipótesis de que los radicales libres del oxígeno, cuando se aplican exógenamente, son perjudiciales. Sin embargo, una limitación importante de esta hipótesis es que no hay datos mecanísticos experimentales que establezcan una relación causa-efecto entre la producción de radicales libres del oxígeno durante la reperfusión y el desarrollo de hipercontractura y muerte celular.

### La dificultad de seleccionar dianas terapéuticas de interés para el desarrollo de fármacos

El intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  de la membrana celular es la última causa de sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la reperfusión<sup>9,20,45</sup>. La activación de este intercambiador en su modo inverso sirve para que la célula se deshaga del exceso de  $\text{Na}^+$  que se ha acumulado durante la isquemia a costa de una entrada deletérea de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular. Este intercambio es irrelevante en células sanas con un buen control de la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$ , pero es crítico para los miocitos que han sufrido una isquemia previa. Los resultados experimentales han aportado evidencias sólidas que demuestran que la inhibición de este intercambiador en el momento de la reperfusión utilizando un fármaco específico no comercializado, el KB-R7943, es capaz de reducir de forma significativa la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y la hipercontractura en miocitos cardiacos aislados reperfundidos, y esto se traduce en una reducción del tamaño de infarto en corazones aislados de rata y en el corazón porcino con oclusión coronaria transitoria in situ<sup>9,20</sup>. Otros estudios, utilizando animales genéticamente modificados, han confirmado el mecanismo por el que ese fármaco es protector en el daño por reperfusión<sup>46</sup>. No obstante, a pesar de la solidez de las evidencias experimentales, ninguna compañía farmacéutica ha invertido el esfuerzo necesario para desarrollar un fármaco capaz de inhibir de forma específica y segura el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Como consecuencia de ello, no se ha llegado a hacer ningún estudio clínico en humanos en el contexto de la reperfusión miocárdica.

El GMPc es un segundo mensajero que desempeña numerosas funciones celulares y diversos estudios han demostrado que se encuentra disminuido en los cardiomiocitos sometidos a isquemia-reperfusión<sup>47</sup>. Los primeros experimentos diseñados para explorar el potencial efecto cardioprotector del GMPc durante la reperfusión se llevaron a cabo en miocitos cardiacos aislados<sup>48</sup>, y demostraron que la estimulación de la síntesis de GMPc (o la exposición a miméticos solubles del GMPc) era capaz de disminuir la hipercontractura y la muerte celular durante la reperfusión. Estudios posteriores han

probado que la administración exógena de L-arginina (capaz de aumentar la disponibilidad de NO y, por lo tanto, de GMPc) también protege el corazón aislado de rata y el corazón porcino intacto contra el daño por reperfusión<sup>49</sup>. Sin embargo, el aumento de la disponibilidad de NO producido por la L-arginina puede tener muchos otros efectos además de incrementar la síntesis de GMPc, y es una intervención que debe ser aplicada previamente a la reperfusión, lo que limita significativamente su potencial terapéutico. Para paliar esta deficiencia, se han diseñado otras aproximaciones experimentales con el objetivo de aumentar la concentración miocárdica de GMPc mediante estimulación de la guanilato ciclasa particulada con urodilatina. Esta intervención, aplicada en los primeros minutos de la reperfusión, ha sido capaz de atenuar la hipercontractura y reducir significativamente la extensión de la necrosis en corazones de rata aislados sometidos a isquemia-reperfusión<sup>50</sup> y en corazones porcinos intactos sometidos a oclusión coronaria transitoria, en ausencia de efectos hemodinámicos<sup>23</sup>. Otros laboratorios han documentado de forma consistente un efecto protector de las intervenciones dirigidas a aumentar la concentración de GMPc en el miocardio reperfundido. Además, se han propuesto diversos mecanismos por los que el GMPc puede tener efectos beneficiosos durante la reperfusión miocárdica, como la reducción de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo sarcoplásmico y las arritmias<sup>51</sup> y la inhibición de la comunicación intercelular<sup>52</sup>, además de la inhibición de la activación plaquetaria. Se trata, por lo tanto, de una diana terapéutica capaz de reducir las consecuencias del daño celular asociado a la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  una vez que ésta ya se ha establecido.

A diferencia de otras intervenciones experimentales, el concepto de cardioprotección mediante la estimulación del GMPc sí que ha sido probado en pacientes. La administración intravenosa de péptido natriurético auricular en el momento de la reperfusión en pacientes con infarto agudo de miocardio se ha asociado a un menor remodelado del ventrículo izquierdo, después de 1 mes de seguimiento, comparado con los controles<sup>53</sup>. Más recientemente, se ha demostrado el efecto protector del ANP recombinante humano en un estudio clínico doble ciego<sup>54</sup>. A pesar de estas evidencias, no se han realizado suficientes estudios clínicos en pacientes sobre el potencial efecto protector de estos fármacos en la cardioprotección, porque no se lo ha considerado un tema de interés prioritario.

Recientemente se ha realizado un estudio piloto en pacientes para probar el efecto protector de la inhibición de la transición de permeabilidad mitocondrial administrando ciclosporina A inmediatamente antes de la intervención coronaria percutánea

nea<sup>55</sup>. La transición de permeabilidad mitocondrial ha sido identificada en numerosos estudios experimentales como un mecanismo inductor de muerte celular necrótica durante la reperfusión. En este estudio, 58 pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación ST fueron aleatorizados a recibir un bolo intravenoso de ciclosporina A (2,5 mg/kg) o placebo. Aunque el tiempo previo de isquemia y el área en riesgo eran similares en los dos grupos, la administración de ciclosporina A redujo significativamente el tamaño de infarto (CK, troponina I y RMN) en el grupo que recibió tratamiento. Se puede argumentar que la ciclosporina A es un fármaco pleiotrópico, con efectos inmunosupresores y poco específicos, y que es cuestionable el mecanismo de acción por el que ejerce su efecto cardioprotector, pero este estudio tiene el valor de haber probado con éxito una hipótesis experimental en pacientes.

De forma similar, se ha trasladado el concepto de cardioprotección por poscondicionamiento isquémico a pacientes con infarto agudo de miocardio. El poscondicionamiento isquémico es el fenómeno por el cual episodios breves de oclusión y reapertura de la arteria coronaria en el momento de la reperfusión reducen la muerte celular, una estrategia que ha sido probada en diversos modelos animales y en órganos perfundidos, aunque los mecanismos moleculares implicados siguen siendo controvertidos. En el estudio de Staat et al<sup>56</sup>, 30 pacientes sometidos a angioplastia coronaria fueron aleatorizados a un grupo control o a un grupo de poscondicionamiento, en el que el balón de angioplastia fue hinchado y deshinchado alternativamente durante cuatro episodios de 1 min cada uno. El tamaño de infarto, determinado por la liberación de CK a las 72 h, fue significativamente menor en el grupo de pacientes poscondicionados.

### **EL FUTURO DE LA PROTECCIÓN MIOCÁRDICA CONTRA LA MUERTE CELULAR SECUNDARIA A LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN**

A pesar del enorme progreso que se ha producido en las dos últimas décadas en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos que conducen al daño letal por reperfusión, algunos resultados son controvertidos y se sigue sin conocer muchos de los factores involucrados. El futuro de la investigación cardiovascular debe orientarse hacia un enfoque menos compartimentalizado, que incluya: *a*) la biología de sistemas; *b*) los estudios de fisiología integrada, y *c*) la multidisciplinariedad.

La biología de sistemas puede permitir desentrañar la complejidad de los modelos biológicos que, en general, funcionan como redes constituidas por una infinidad de nodos, mediante el estudio inter-

gral de los sistemas complejos a partir de técnicas cuantitativas de alto rendimiento y utilizando modelos de simulación por ordenador<sup>57</sup>. Este abordaje permite hacer predicciones más exactas (biología predictiva) y establece de forma más fiable la relación que existe entre un efecto biológico concreto y el estímulo que lo ha desencadenado (biología integrativa). El estudio en red de los sistemas biológicos requiere una tecnología de alto rendimiento y el desarrollo de modelos matemáticos sofisticados, que sólo ahora empiezan a estar disponibles. Un ejemplo de ello es la espectroscopia por resonancia magnética, una herramienta que permite hacer estudios metabonómicos complejos en los que se puede comparar patrones generales de muchos metabolitos de forma simultánea<sup>58</sup>. Por otra parte, los estudios de fisiología integrada permiten investigar de forma directa la relación entre las vías metabólicas implicadas en un determinado proceso y el efecto real de ese proceso en la morfología o la función celular. Este enfoque aporta información relevante sobre la respuesta integrada de una célula u organismo a un determinado estímulo, aunque su principal limitación sigue siendo su gran dependencia de las condiciones experimentales. Por último, el enfoque multidisciplinario debería permitir abordar los problemas biológicos desde una perspectiva más amplia, tanto desde el punto de vista técnico como del conocimiento, facilitando de esta forma el desarrollo de nuevas estrategias de cardioprotección y el correcto diseño de los estudios clínicos.

### **CONCLUSIONES**

El tratamiento del daño por reperfusión emerge como una oportunidad real de disminuir la muerte celular y mejorar el pronóstico de los pacientes con infarto de miocardio sometidos a reperfusión. Los resultados positivos obtenidos en varios estudios clínicos recientes apoyan esta idea. Sin embargo, será necesario un intenso esfuerzo de investigación traslacional y la participación decidida de la industria para llevar el tratamiento cardioprotector a la práctica clínica en pacientes con infarto agudo de miocardio.

### **AGRADECIMIENTOS**

Parcialmente financiado por el proyecto FIS-PI060996 y por la Red-RETICS del Instituto de Salud Carlos III RECAVA.

### **BIBLIOGRAFÍA**

1. Foot DK, Lewis RP, Pearson TA, Beller GA. Demographics and cardiology, 1950-2050. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35 Suppl B:B66-80.

2. Piper HM, Abdallah Y, Schäfer C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 2004;61:365-71.
3. García-Dorado D, Théroux P, Duran JM, Solares J, Alonso J, Sanz E, et al. Selective inhibition of the contractile apparatus. A new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. *Circulation.* 1992;85:1160-74.
4. Hearse DJ, Humphrey SM, Chain EB. Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release. *J Mol Cell Cardiol.* 1973;5:395-407.
5. Vander Heide RS, Angelo JP, Altschuld RA, Ganote CE. Energy dependence of contraction band formation in perfused hearts and isolated adult myocytes. *Am J Pathol.* 1986;125:55-68.
6. Piper HM, García-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 1998;38:291-300.
7. 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. *Pflugers Arch.* 1996;431:519-26.
8. Siegmund B, Zude R, Piper HM. Recovery of anoxic-reoxygenated cardiomyocytes from severe calcium overload. *Am J Physiol.* 1992;263:H1262-9.
9. Inserte J, García-Dorado D, Ruiz-Meana M, Padilla F, Barrabés JA, Pina P, et al. Effect of inhibition of Na(+)/Ca(2+) exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death. *Cardiovasc Res.* 2002;55:739-48.
10. García-Dorado D, Théroux P, Munoz R, Alonso J, Elizaga J, Fernandez-Avilés F, et al. Favorable effects of hyperosmotic reperfusion on myocardial edema and infarct size. *Am J Physiol.* 1992;262:H17-22.
11. Inserte J, García-Dorado D, Hernando V, Soler-Soler J. Calpain-mediated impairment of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity during early reperfusion contributes to cell death after myocardial ischemia. *Circ Res.* 2005;97:465-73.
12. Inserte J, García-Dorado D, Hernando V, Barba I, Soler-Soler J. Ischemic preconditioning prevents calpain-mediated impairment of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity during early reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2006;70:364-73.
13. Inserte J, García-Dorado D, Ruiz-Meana M, Agulló L, Pina P, Soler-Soler J. Ischemic preconditioning attenuates calpain-mediated degradation of structural proteins through a protein kinase A-dependent mechanism. *Cardiovasc Res.* 2004;64:105-14.
14. Ruiz-Meana M, García-Dorado D, González MA, Barrabés JA, Soler-Soler J. Effect of osmotic stress on sarcolemmal integrity of isolated cardiomyocytes following transient metabolic inhibition. *Cardiovasc Res.* 1995;30:64-9.
15. Ruiz-Meana M, García-Dorado D, González MA, Barrabés JA, Oliveras J, Soler-Soler J. Efecto del edema osmótico durante la reoxigenación sobre la viabilidad celular: Estudio en el miocito aislado. *Rev Esp Cardiol.* 1995;48:266-71.
16. 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.* 1997;96:3579-86.
17. Rodríguez-Sinovas A, García-Dorado D, Ruiz-Meana M, Soler-Soler J. Enhanced effect of gap junction uncouplers on macroscopic electrical properties of reperfused myocardium. *J Physiol.* 2004;559:245-57.
18. Rawanduzay A, Hansen A, Hansen TW, Nedergaard M. Effective reduction of infarct volume by gap junction blockade in a rodent model of stroke. *J Neurosurg.* 1997;87:916-20.
19. Lin JH, Weigel H, Cotrina ML, Liu S, Bueno E, Hansen AJ, et al. Gap-junction-mediated propagation and amplification of cell injury. *Nat Neurosci.* 1998;1:494-500.
20. Ruiz-Meana M, García-Dorado D, Hofstaetter B, Piper HM, Soler-Soler J. Propagation of cardiomyocyte hypercontracture by passage of Na<sup>+</sup> through gap junctions. *Circ Res.* 1999;85:280-7.
21. Abdallah Y, Gkatzoflia A, Pieper H, Zoga E, Walther S, Kasseckert S, et al. Mechanism of cGMP-mediated protection in a cellular model of myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2005;66:123-31.
22. Siegmund B, Schlack W, Ladilov YV, Balsler C, Piper HM. Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture. *Circulation.* 1997;96:4372-9.
23. Padilla F, García-Dorado D, Agullo L, Barrabés JA, Inserte J, Escalona N, et al. Intravenous administration of the natriuretic peptide urodilatin at low doses during coronary reperfusion limits infarct size in anesthetized pigs. *Cardiovasc Res.* 2001;51:592-600.
24. Kitakaze M, Asakura M, Kim J, Shintani Y, Asanuma H, Hamasaki T, et al. Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): two randomised trials. *Lancet.* 2007;370:1483-93.
25. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature.* 2005;434:658-62.
26. Halestrap AP, Brenner C. The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem.* 2003;10:1507-25.
27. Duchon MR, McGuinness O, Brown LA, Crompton M. On the involvement of a cyclosporin A sensitive mitochondrial pore in myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 1993;27:1790-4.
28. Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J.* 1995;307:93-8.
29. Di Lisa F, Menabo R, Canton M, Barile M, Bernardi P. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD<sup>+</sup> and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem.* 2001;276:2571-5.
30. Honda HM, Korge P, Weiss JN. Mitochondria and ischemia/reperfusion injury. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1047:248-58.
31. Vander Heide RS, Angelo JP, Altschuld RA, Ganote CE. Energy dependence of contraction band formation in perfused hearts and isolated adult myocytes. *Am J Pathol.* 1986;125:55-68.
32. Ruiz-Meana M, Abellán A, Miró-Casas E, García-Dorado D. Opening of mitochondrial permeability transition pore induces hypercontracture in Ca<sup>2+</sup> overloaded cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol.* 2007;102:542-52.
33. Barrabés JA, García-Dorado D, Mirabet M, Inserte J, Agulló L, Soriano B, et al. Antagonism of selectin function attenuates microvascular platelet deposition and platelet-mediated myocardial injury after transient ischemia. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45:293-9.
34. Mirabet M, García-Dorado D, Ruiz-Meana M, Barrabés JA, Soler-Soler J. Thrombin increases cardiomyocyte acute cell death after ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;39:277-83.
35. Barrabés JA, Mirabet M, Agulló L, Figueras J, Pizcueta P, García-Dorado D. Platelet deposition in remote cardiac regions after coronary occlusion. *Eur J Clin Invest.* 2007;37:939-46.
36. Inserte J, García-Dorado D, Ruiz-Meana M, Solares J, Soler J. The role of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange occurring during hypoxia in the genesis of reoxygenation-induced myocardial oedema. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29:1167-75.
37. Rodríguez-Sinovas A, García-Dorado D, Padilla F, Inserte J, Barrabés JA, Ruiz-Meana M, et al. Pre-treatment with the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibitor cariporide delays cell-to-cell electrical uncoupling during myocardial ischemia. *Cardiovasc Res.* 2003;58:109-17.

38. Ruiz-Meana M, García-Dorado D, Julia M, Inserte J, Siegmund B, Ladilov Y, et al. Protective effect of HOE642, a selective blocker of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange, against the development of rigor contracture in rat ventricular myocytes. *Exp Physiol*. 2000;85:17-25.
39. García-Dorado D, González MA, Barrabés JA, Ruiz-Meana M, Solares J, Lidon RM, et al. Prevention of ischemic rigor contracture during coronary occlusion by inhibition of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange. *Cardiovasc Res*. 1997;35:80-9.
40. Schäfer C, Ladilov YV, Siegmund B, Piper HM. Importance of bicarbonate transport for protection of cardiomyocytes against reoxygenation injury. *Am J Physiol*. 2000;278:H1457-63.
41. Theroux P, Chaitman BR, Danchin N, Erhardt L, Meinertz T, Schroeder JS, et al. Inhibition of the sodium-hydrogen exchanger with cariporide to prevent myocardial infarction in high-risk ischemic situations. Main results of the GUARDIAN trial. Guard during ischemia against necrosis (GUARDIAN) Investigators. *Circulation*. 2000;102:3032-8.
42. Zeymer U, Suryapranata H, Monassier JP, Opolski G, Davies J, Rasmanis G, et al; ESCAMI Investigators. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibitor eniporide as an adjunct to early reperfusion therapy for acute myocardial infarction. Results of the evaluation of the safety and cardioprotective effects of eniporide in acute myocardial infarction (ESCAMI) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:1644-50.
43. The EXPEDITION Study Investigators. Effects of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibition by cariporide on death and nonfatal myocardial infarction in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. The EXPEDITION study. *Circulation*. 2003;108:3M.
44. Flaherty JT, Pitt B, Gruber JW, Heuser RR, Rothbaum DA, Burwell LR, et al. Recombinant human superoxide dismutase (h-SOD) fails to improve recovery of ventricular function in patients undergoing coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation*. 1994;89:1982-91.
45. Schafer C, Ladilov Y, Inserte J, Schafer M, Haffner S, García-Dorado D, et al. Role of the reverse mode of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovasc Res*. 2001;51:241-50.
46. Yamashita J, Kita S, Iwamoto T, Ogata M, Takaoka M, Tazawa N, et al. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced renal injury in mice deficient in Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;304:284-93.
47. Agullo L, García-Dorado D, Escalona N, Ruiz-Meana M, Inserte J, Soler-Soler J. Effect of ischemia on soluble and particulate guanylyl cyclase-mediated cGMP synthesis in cardiomyocytes. *Am J Physiol*. 2003;284:H2170-6.
48. Hempel AM, Friedrich M, Schlüter KD, Forssmann WG, Kuhn M, Piper HM. ANP protects against reoxygenation-induced hypercontracture in adult cardiomyocytes. *Am J Physiol*. 1997;273:244-9.
49. 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.
50. Inserte J, García-Dorado D, Agulló L, Paniagua A, Soler-Soler J. Urodilatin limits acute reperfusion injury in the isolated rat heart. *Cardiovasc Res*. 2000;45:351-9.
51. O'Neill SC, Miller L, Hinch R, Eisner DA. Interplay between SERCA and sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> efflux pathways controls spontaneous release of Ca<sup>2+</sup> from the sarcoplasmic reticulum in rat ventricular myocytes. *J Physiol*. 2004;559:121-8.
52. De Mello WC. Atrial natriuretic factor reduces cell coupling in the failing heart, an effect mediated by cyclic GMP. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998;32:75-9.
53. Hayashi M, Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Mabuchi N, Tsutsui T, Horie H, et al. Intravenous atrial natriuretic peptide prevents left ventricular remodeling in patients with first anterior acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37:1820-6.
54. Kitakaze M, Asakura M, Kim J, Shintani Y, Asanuma H, Hamasaki T, et al; J-WIND investigators. Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): two randomised trials. *Lancet*. 2007;370:1483-93.
55. Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2008;359:473-81.
56. Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, et al. Postconditioning the human heart. *Circulation*. 2005;112:2143-8.
57. Kirschner MW. The meaning of systems biology. *Cell*. 2005;121:503-4.
58. Barba I, De León G, Martín E, Cuevas A, Aguade S, Candell-Riera J, et al. Nuclear magnetic resonance-based metabolomics predicts exercise-induced ischemia in patients with suspected coronary artery disease. *Magn Reson Med*. 2008;60:27-32.