



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE MEDICINA

TESI DOCTORAL

**Prevenió del dany per reperfusió mitjançant inhibició reversible de la succinat deshidrogenasa mitocondrial.
Mecanismes implicats.**

Tesi presentada per Laura Valls de Lacalle per optar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona

Tesi adscrita al Programa de Doctorat en Medicina del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Investigació desenvolupada al Laboratori de Malalties Cardiovasculars de l'Institut de Recerca Vall Hebrón sota la direcció del Dr. David García-Dorado † i del Dr. Antonio Rodríguez Sinovas.

La doctoranda,

Laura Valls de Lacalle

Director de la tesi,

Director de la tesi,

Tutor de la tesi,

Dr. David García-Dorado †

Dr. Antonio Rodríguez Sinovas

Dr. Jaume Alijotas Reig

Barcelona, 2019

AGRAÏMENTS

Aquesta tesi doctoral no hauria estat possible si no hagués retornat, en el que ja sento a hores d'ara, com el "meu laboratori". Durant les pràctiques del Grau de Bioquímica al laboratori de Malalties Cardiovasculars em vaig quedar captivada pel seu dia a dia i, sobretot, pels seus integrants. Al cap de dos anys, i després d'una trucada el mateix dia del meu aniversari (llámale destino...), vaig decidir tornar al mateix laboratori per a cursar les pràctiques del Màster de Recerca Biomèdica Translacional, període en el que vaig iniciar el projecte que finalment ha donat lloc a aquesta tesi doctoral.

Gran part d'aquest treball no hauria estat possible sense la incansable ajuda del Dr. Antonio RodríguezSinovas, co-director d'aquesta tesi. Només tinc paraules d'agraïment per la seva capacitat docent, per haver-me ensenyat gran part del que sé, per convertir-me en una "mini" veterinària, aprenent noves tècniques quirúrgiques, per les màgiques classes d'estadística i per eixamplar el meu coneixement sobre la "reial llengua espanyola".

També vull agrair al Dr. David García-Dorado, co-director d'aquesta tesi, director del laboratori de Malalties Cardiovasculars. Malauradament, tot i la seva incansable lluita contra la malaltia, no ha pogut veure com neix una nova doctora del seu laboratori. Gràcies per confiar en mi per a realitzar les cirurgies del model in vivo, per tots els consells i recomanacions rebudes al llarg d'aquests 4 anys.

Cal una menció especial pel Dr. Ignasi Barba, per les seves complicades explicacions sobre ressonància magnètica nuclear, on jo m'imaginava hidrògens ballant en els seus spins. Per deixar-me ser durant un temporada la reina de la reso i per tots els sentits consells sobre la vida a Cambridge. Agrair el suport de l'Elisabet Miró per ajudar-me a entendre el món dels mitocondris i fer-me veure que, en veritat, tot és culpa de la ubiquinona.

A tots els meus companys de laboratori, als que encara hi són com els que no, des dels múltiples estudiants de grau i màster, estudiants predoctorals, postdoctorals, tècnics, infermeres, secretàries i altres investigadors principals, que entre tots han format una petita gran família al llarg d'aquests anys. Al meu "Doc", Juanjo Albuquerque, per fer tant fàcil el dia a dia al laboratori i per tots els bons consells, al meu profe Marcos Poncelas, per ensenyar-me a operar i estar al meu costat (encara que fos per cridar-me Laurita!!), a la Úrsula Vilardosa per anar amb mi a l'infern i al Jose Castellano per resoldre'm dubtes com un bon postdoc. He tingut la gran sort de poder compartir aquesta marató amb els meus "CoDocs", David Aluja i Marta Minguet, compartint pizzes sobre despatxos, ensurts i bromes telefòniques, o bé arribant tard a congressos tot cantant dins d'un cotxe. Agrair la companyia de tots els altres integrants del laboratori: Ángeles Rojas, Javier Inserte, Marisol Ruiz, Diana Bou, Teresa Fernández i

Marta Consegal a la que desitjo que gaudeixi tant com jo en aquest bonica etapa que ara comences.

Després de tantes hores invertides dins l'estabulari és necessari esmentar l'ajuda i col·laboració del seu personal, especialment als veterinaris i cuidadors: Albert, Àngel, Cristian i Marielle, juntament amb la "superjefa" Montse Molano.

No puc oblidar-me de tota la gent de fora del laboratori, a les meves "nenes" del màster, per les nostres quedades impossibles de quadrar i els cafès vigoritzants en època d'escriptura. A la meva Ana, per sobreviure juntes a un huracà caribeny, pels nostres sopars de reflexió, per estar a prop sense necessitat de veure'ns. A tots els bioquímics, per anar compartint les nostres experiències com a estudiants predoctorals i per adonar-nos que, de cop i volta, ja ens hem fet grans.

A la meva família per aguantar-me tots aquests anys, per resistir davant dels meus rotllos i monòlegs diaris, i per ajudar-me quan la tesi va començar a apoderar-se de mi. Al Jaume, per haver aparegut a la meva vida, pel seu suport durant els últims mesos i els dies freds a Cambridge; per més "English Breakfast" i passejades abans de dinar.

ABREVIATURES

8-OHdG	8-oxo-2'-deoxiguanosina
ANP	Pèptid natriurètic atrial
ANT	Transportador de nucleòtids d'adenina
ATP	Adenosin 5'- trisfosfat
BH4	Tetrahidropterina
BNP	Pèptid natriurètic cerebral
CABG	Cirurgia de revascularització coronària
CO₂	Diòxid de carboni
CsA	Ciclosporina A
CTE	Cadena de transport mitocondrial
Cx43	Conexina 43
Cyp D	Ciclofilina D
DA	Artèria coronària descendent anterior
DPP-4	Enzim dipeptidil-peptidasa 4
eNOS	Sintasa òxid nítric endotelial
ERK1/2	Quinasa regulada per senyals extracel·lulars
FGF-2	Factor de creixement de fibroblast 2
FMN	Flavin mononucleòtids
GIK	Glucosa-insulina-potassi
GLP-1	Pèptid similar al glucagó tipus 1
GLP-1R	Receptor del pèptid similar al glucagó tipus 1
GPCR	Receptor acoplat a proteïna G
GSK-3β	Glicogen sintasa quinasa
H₂O₂	Peròxid d'hidrogen
IGF-1	Factor de creixement insulínic de tipus 1
IL-6	Interleuquina 6
iNOS	Sintasa òxid nítric induïble
IPC	Precondicionament isquèmic
IPoC	Postcondicionament isquèmic
LTCC	Canals de calci de tipus L
MACCE	Esdeveniments cardíacs i cerebrovasculars adversos
MCU	Transportador mitocondrial de calci
MDA	Malondialdehid
MEK	Quinasa activada per factors mitogènics
mitoK_{ATP}	Canals de K ⁺ ATP-dependents del mitocondri
mPTP	Porus de transició mitocondrial
NCX	Intercanviador Na ⁺ /Ca ²⁺
NHE	Intercanviador Na ⁺ /H ⁺
nNOS	Sintasa òxid nítric neuronal

NO	Òxid nítric
NOS	Sintasa d'òxid nítric
NOX	NADPH oxidasa
O₂⁻	Ió superòxid
OH[·]	Radical hidroxil
ONOO⁻	Aniò peròxinitrit
PDE	Fosfodiesterases
pGC	Guanilat ciclasa particulada
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PiC	Transportador de fosfat inorgànic
PKB o Akt	Proteïna quinasa B
PKC	Proteïna quinasa C
PKG	Proteïna quinasa G
RET	Transferència reversa d'electrons
RIC	Condicionament isquèmic remot
RISK	Reperfusion Injury Salvage Kinase
RNS	Espècies reactives de nitrogen
ROS	Espècies reactives d'oxigen
RYR	Receptor de rianodina
SAFE	Survivor Activating Factor Enhancement
SCAEST	Infart agut de miocardi amb elevació del ST
SERCA	Bomba de calci del reticle sarcoplasmàtic
SfA	Sangliferina A
sGC	Guanilat ciclasa soluble
SOD	Superòxid dismutasa
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TNF-R	Receptor del TNF
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TPP	Trifenilfosfoni
VDAC	Canal d'anions voltatge dependents
XDH	Xantina deshidrogenasa
XO	Xantina oxidasa
XOR	Xantina oxidoreductasa

ÍNDIX

ABREVIATURES	7
RESUM	13
INTRODUCCIÓ	17
1. MECANISMES CEL·LULARS I MOLECULARS DEL DANY MIOCÀRDIC PER ISQUÈMIA-REPERFUSIÓ	21
1.a. Hipercontractura.....	22
1.a.1. <i>Canvis en les concentracions citosòliques de Na⁺ i Ca²⁺ i del pH intracel·lular</i>	22
1.a.2. <i>Edema</i>	23
1.a.3. <i>Fragilitat cel·lular. Calpaines</i>	24
1.a.4. <i>Propagació dels canvis iònics i de la mort cel·lular a través de les “gap junctions””: extensió del dany per reperfusió</i>	24
1.b. Obertura del mPTP.....	25
1.b.1. <i>Conseqüències de l’obertura del mPTP</i>	25
1.b.2. <i>Estructura del mPTP</i>	25
1.b.3. <i>Regulació de l’obertura del mPTP</i>	27
2. MECANISMES ENDÒGENS DE CARDIOPROTECCIÓ	27
2.a. Precondicionament isquèmic local.....	27
2.a.1. <i>Mecanismes d’acció de l’IPC</i>	28
2.a.2. <i>Evidència preclínica de l’efecte cardioprotector de l’IPC</i>	30
2.a.3. <i>Translació clínica de l’IPC</i>	30
2.b. Postcondicionament isquèmic local.....	30
2.b.1. <i>Mecanismes d’acció de l’IPoC</i>	31
2.b.2. <i>Evidència preclínica de l’efecte cardioprotector de l’IPoC</i>	31
2.b.3. <i>Translació clínica de l’IPoC</i>	31
2.c. Condicionament isquèmic remot.....	32
2.c.1. <i>Mecanismes d’acció del RIC</i>	32
2.c.2. <i>Evidència preclínica de l’efecte cardioprotector del RIC</i>	33
2.c.3. <i>Translació clínica del RIC</i>	34

3. ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES FARMACOLÒGIQUES ENFRONT EL DANY PER ISQUÈMIA-REPERFUSIÓ	35
3.a. Modulació del pH intracel·lular i de la sobrecàrrega de calci citosòlica durant la reperfusió.	35
3.a.1. <i>Inhibició dels LTCC</i>	36
3.a.2. <i>Inhibició del NHE</i>	36
3.a.3. <i>Inhibició del NCX</i>	37
3.b. Inhibidors del mPTP	38
3.c. Modulació de cascades citosòliques de cardioprotecció.....	40
3.c.1. <i>Via RISK</i>	40
3.c.2. <i>Via GMPc/PKG</i>	42
3.d. Modulació del metabolisme cardíac.....	43
3.d.1. <i>GIK</i>	43
3.d.2. <i>GLP-1</i>	45
3.e. Metoprolol	47
4. PAPER DELS ROS EN EL DANY PER ISQUÈMIA-REPERFUSIÓ	47
4.a. Font de ROS a nivell cardíac.....	49
4.a.1. <i>Xantines oxidoreductases</i>	49
4.a.2. <i>NADPH oxidases</i>	50
4.a.3. <i>NOS</i>	51
4.a.4. <i>Els mitocondris coma font de ROS</i>	52
4.b. Resposta cel·lular a la producció de ROS.....	54
4.c. Estratègies terapèutiques de detoxificació dels ROS.....	55
4.d. Inhibició de la CTE com a estratègia cardioprotectora enfront el dany miocàrdic per reperfusió.....	57
HIPÒTESI	61
OBJECTIUS	65
PUBLICACIONS	69
Succinate dehydrogenase inhibition with malonate during reperfusion reduces infarct size by preventing mitochondrial permeability transition	71
Selective Inhibition of Succinate Dehydrogenase in Reperfused Myocardium with Intracoronary Malonate Reduces Infarct Size	99

RESUM GLOBAL DE RESULTATS.....	115
DISCUSSIÓ GENERAL.....	121
CONCLUSIONS	135
LÍNIES DE FUTUR	139
BIBLIOGRAFIA	145
ANNEXOS	173

RESUM

La mort cel·lular que ocorre durant un episodi d'oclusió coronària és directament proporcional a la durada de la isquèmia. Tot i així, el restabliment del flux sanguini a l'àrea afectada s'associa amb un dany addicional, conegut com a dany per reperfusió. Encara que els seus mecanismes són complexos, hi destaca l'excessiva producció de radicals lliures d'oxigen que ocorre en el moment de la restauració del flux.

La font principal de radicals oxidants al miocardi reperfundit són els mitocondris, més concretament, els complexos I i III de la cadena de transport mitocondrial. Recentment, però, s'ha suggerit que també el complex II o succinat deshidrogenasa pot jugar un paper important en la producció de radicals oxidants durant la reperfusió, permetent la transferència reversa d'electrons des del complex II cap al complex I, que seria el productor final dels radicals lliures d'oxigen.

Perquè la transferència reversa d'electrons tingui lloc són necessàries unes condicions molt particulars, incloent una acumulació del substrat endogen de la succinat deshidrogenasa, el succinat, que ocorre durant la isquèmia prèvia. De fet, s'ha demostrat que quan es preveu l'acumulació de succinat durant la isquèmia, mitjançant inhibició reversible de la succinat deshidrogenasa realitzada abans de l'oclusió coronària, s'atenua la producció d'espècies reactives d'oxigen durant la reperfusió i es redueix la mida de l'infart. Ara bé, la inhibició del complex II abans de la isquèmia no és factible en pacients amb infart agut de miocardi. L'objectiu principal d'aquesta tesi ha estat investigar els efectes de la inhibició reversible de la succinat deshidrogenasa mitocondrial amb malonat disòdic, administrat únicament durant la restauració del flux sanguini, sobre el dany miocàrdic per reperfusió, i analitzar els mecanismes implicats en els seus efectes.

En un model de cor aïllat de ratolí, perfundit en sistema Langendorff, primerament es van analitzar els efectes de l'administració de l'inhibidor de la succinat deshidrogenasa, el malonat disòdic, en condicions normòxiques. El malonat va produir una reducció concentració-depenent de la pressió desenvolupada del ventricle esquerre, corroborant el seu efecte depressor de la respiració mitocondrial, amb una concentració efectiva 50 (EC50) al voltant de 8 mmol/L. Posteriorment, cors aïllats de ratolí addicionals van ser sotmesos a isquèmia global (35 minuts) seguida de reperfusió (60 minuts), i van ser tractats o no amb malonat 3 mM, administrat durant els primers 15 minuts de la reperfusió. El grup tractat amb l'inhibidor de la succinat deshidrogenasa va presentar una reducció significativa de la mida de l'infart ($39,84 \pm 2,78\%$ vs. $24,57 \pm 2,32\%$, $p=0,001$, $n=7-8/\text{grup}$), associada amb una menor alliberació de LDH després de la isquèmia i a una millora en la recuperació funcional al final de l'experiment. Per altra banda, estudis de ressonància magnètica nuclear van demostrar, en extractes de teixit cardíac, l'existència de canvis en el perfil metabòlic

dels cors tractats amb malonat, sent l'acumulació de succinat el tret més rellevant. A més, mitjançant tècniques d'immunofluorescència i marcatge amb MitoSOX Red de mostres de teixit miocàrdic es va poder observar que el tractament amb malonat produeix una reducció en la producció de radicals lliures d'oxigen. Aquesta disminució també es va observar en mitocondris aïllats de cors de ratolí, tractats in vitro tant amb succinat com amb malonat, juntament amb un menor consum d'oxigen i una reducció en l'obertura del porus de transició mitocondrial.

Realitzant un pas endavant, es va analitzar si els efectes protectors del malonat persisteixen en un model animal clínicament més rellevant, com és el model porcí d'oclusió coronària transitòria. En aquest model l'administració del malonat es va realitzar selectivament a l'àrea en risc, de manera intracoronària, per tal de limitar els possibles efectes adversos d'una infusió sistèmica. Primerament es van analitzar els efectes de la droga sobre la contractilitat cardíaca en condicions basals. Així, tan sols una concentració de malonat de 50 mmol/L, però no inferiors, va provocar una reducció significativa de l'escurçament miocàrdic a la regió irrigada per l'artèria d'interès, però no en regions distants. Per tal d'evitar efectes indesitjables, vam seleccionar una concentració de 10 mmol/L per analitzar els efectes de la inhibició reversible de la succinat deshidrogenasa durant la restauració del flux sanguini sobre el dany per reperfusió. Així, els animals van ser sotmesos a oclusió coronària de l'artèria descendent anterior durant 40 minuts, seguida de 2 hores de reperfusió, i van ser tractats o no amb malonat, administrat de forma intracoronària durant els 5 minuts inicials de la restauració del flux. L'administració selectiva de malonat a l'àrea en risc va reduir de manera significativa la mida de l'infart ($59,62 \pm 4,00\%$ vs. $36,46 \pm 5,35\%$, $p=0,001$, $n=11/\text{grup}$), sense veure's afectada la incidència d'arítmies ventriculars malignes durant la reperfusió, així com tampoc la contractilitat del miocardi distant. A més a més, en mostres de teixit miocàrdic, es va demostrar, mitjançant marcatge amb MitoSOX Red, que la protecció exercida pel malonat s'associava a una atenuació en la producció d'espècies reactives d'oxigen durant la reperfusió.

En conclusió, la inhibició reversible de la succinat deshidrogenasa amb malonat disòdic a l'inici de la reperfusió és cardioprotectora enfront l'infart de miocardi, tant en cors aïllats de ratolins com en un model porcí d'oclusió coronària transitòria, sense que apareguin efectes indesitjables sobre la incidència d'arítmies, ni sobre la funció del miocardi remot. Aquest efecte protector, que ocorre durant la reperfusió, és degut a una major acumulació de succinat al teixit tractat, a una reducció en el consum d'oxigen mitocondrial i una menor producció de radicals lliures d'oxigen (probablement causada per una menor transferència reversa d'electrons des del complex II), i amb una disminució en l'obertura del porus de transició mitocondrial durant aquesta fase. La inhibició de la respiració mitocondrial amb malonat pot esdevenir una nova estratègia terapèutica a utilitzar en pacients amb infart agut de miocardi amb elevació del segment ST sotmesos a revascularització coronària.

SUMMARY

Cell death occurring during coronary artery occlusion is directly proportional to ischemia duration. However, blood flow restoration to the ischemic area is associated with an additional cell damage known as reperfusion injury. Although the mechanisms or reperfusion injury are complex, the excessive production of reactive oxygen species occurring at the onset of reflow has been suggested to play a prominent role.

Mitochondria are the main source of reactive oxygen species in reperfused myocardium, particularly at complexes I and III within the mitochondrial respiratory chain. However, recent studies have suggested that complex II or succinate dehydrogenase may also play an important role in reactive oxygen species production during reperfusion, allowing reverse electron transfer from complex II to complex I, which would be the final responsible for producing these free radicals.

Reverse electron transfer needs, to happen, some particular conditions, including accumulation of succinate, the endogenous substrate of succinate dehydrogenase, that occurs during the ischemic phase. In fact, it has been shown that preventing succinate accumulation during ischemia, by reversible inhibition of succinate dehydrogenase before coronary occlusion, attenuates reactive oxygen species productions and significantly reduces infarct size. However, inhibition of complex II before myocardial ischemia is not feasible in patients with acute myocardial infarction. The main aim of this thesis has been to investigate the effects of reversible inhibition of mitochondrial succinate dehydrogenase with disodium malonate, administered at the time of flow restoration, on reperfusion injury, and to determine the mechanisms involved.

The effects of disodium malonate, a reversible succinate dehydrogenase inhibitor, were first analyzed in isolated mice hearts, perfused in a Langendorff system, under normoxic conditions. Malonate induced a concentration-dependent reduction in left ventricular developed pressure, confirming an inhibitory action on mitochondrial respiration, with a half maximal effective concentration (EC₅₀) around 8 mmol/L. Thereafter, additional isolated mice hearts were subjected to global ischemia (35 minutes) followed by reperfusion (60 minutes), and were treated or not with 3 mM malonate, given during the first 15 minutes of reperfusion. The group treated with the succinate dehydrogenase inhibitor had a significant reduction in infarct size ($39.84 \pm 2.78\%$ vs. $24.57 \pm 2.32\%$, $p=0.001$, $n=7-8/\text{group}$), that associated with a lower LDH release during reperfusion and with a better functional recovery at the end of the experiment. On the other hand, nuclear magnetic resonance studies demonstrated the existence of differences in the metabolic profile between hearts treated with malonate and those not treated with the drug, with increased succinate concentrations being the most relevant change. In addition, MitoSOX Red staining of myocardial tissue

samples revealed that malonate treatment was associated with a reduction in the production of reactive oxygen species. This decrease was also observed in isolated mitochondria obtained from mice hearts, treated in vitro with both succinate and malonate, that also depicted lower oxygen consumption and a reduction in mitochondrial permeability transition pore opening.

Moving forward, we analyzed whether the protective effects of malonate persist in a more clinically relevant animal model, the porcine model of transient coronary occlusion. In this model we selectively administer malonate into the area at risk, by an infusion through an intracoronary catheter, in order to limit the possible side effects of a systemic administration. First, we analyzed the effects of the drug on cardiac contractility under baseline conditions. Thus, only malonate of 50 mmol/L, but not lower concentrations, resulted in a significant reduction in systolic segment shortening in the myocardial region irrigated by the artery of interest, but not in distant regions. In order to avoid undesirable effects, we selected a concentration of 10 mmol/L to analyze the effects of reversible inhibition of succinate dehydrogenase on reperfusion injury. Animals were subjected to left anterior descending coronary artery occlusion for 40 minutes, followed by 2 hours of reperfusion, and they were treated or not with malonate, given through the intracoronary catheter, during the first 5 minutes of blood flow restoration. Selective administration of malonate into the risk area significantly reduced infarct size (from $59.62 \pm 4.00\%$ to $36.46 \pm 5.35\%$, $p=0.001$, $n=11/\text{group}$), without changes in the incidence of malignant ventricular tachyarrhythmias during reperfusion, or in the contractility of remote myocardium. Additionally, porcine samples of myocardial tissue marked with MitoSOX red showed a reduction in reactive oxygen species production during reperfusion.

In conclusion, reversible inhibition of succinate dehydrogenase with disodium malonate at the onset of the reperfusion has cardioprotective effects against myocardial infarction, both in isolated mice hearts and in a porcine model of transient coronary occlusion, without side effects in the incidence of malignant ventricular arrhythmias or contractile function in distant myocardium. This protective effect, which occurs during reperfusion, is due to a greater accumulation of succinate in the treated tissue, a reduction in mitochondrial oxygen consumption and a lower production of reactive oxygen species (probably caused by a lower reverse electron transfer from complex II), and a decrease in mitochondrial permeability transition pore opening during reperfusion. The inhibition of mitochondrial respiration with malonate may become a new therapeutic strategy to be used in patients with ST-segment elevation myocardial infarction subjected to coronary revascularization.

INTRODUCCIÓ

Les malalties cardiovasculars són la principal causa de mort i discapacitat a nivell mundial. Al 2015 van provocar més de 17 milions de morts a tot el món ¹, i la seva prevalença es troba en continu augment, fet associat amb l'envelliment de la població mundial. La cardiopatia isquèmica i l'accident cerebrovascular són les dues principals malalties cardiovasculars. Ambdues tenen un impacte social enorme, no tan sols per la mortalitat que causen, sinó per la seva alta morbiditat, la pèrdua de qualitat de vida dels pacients i l'elevat cost econòmic que suposen pels serveis sanitaris estatals ^{2,3}.

La causa inicial de la cardiopatia isquèmica és l'existència d'un desequilibri entre l'aportació d'oxigen per part del torrent circulatori i el seu consum pel teixit cardíac. Habitualment aquest desequilibri és degut a una reducció en el flux sanguini de les artèries coronàries, provocat per l'aparició d'arteriosclerosi. Aquesta patologia no és més que un procés inflamatori crònic que afecta a les parets vasculares, ocasionant un increment en el gruix de les mateixes i reduint l'elasticitat del territori vascular afectat. L'engruiximent de les capes íntimes i mitja dels vasos afectats és degut a una acumulació d'àcids grassos i molècules de colesterol, que juntament amb el reclutament de cèl·lules inflamatòries i el dipòsit de teixit fibrós, formen les denominades plaques arterioscleròtiques, que redueixen la llum del vas. A més, l'endoteli que cobreix aquestes plaques pot patir erosions o ruptures, provocant l'activació de la cascada de la coagulació i la formació d'un trombus, que pot donar lloc a una obstrucció parcial o total del vas en qüestió, conduint, en el cas de les artèries coronàries, a l'aparició d'angina de pit inestable o d'infart de miocardi, respectivament⁴.

Una oclusió aguda i completa de l'artèria coronària afectada provocarà, per tant, l'aparició d'un síndrome coronari agut amb elevació del segment ST a l'electrocardiograma (SCAEST). Tan sols en el cas de que el període d'isquèmia sigui suficientment llarg, donarà lloc a mort cel·lular i, per tant, a l'aparició d'un infart de miocardi. Aquests insults isquèmics, a més de posar en risc la viabilitat del teixit afectat, condicionarà la posterior aparició del remodelat advers del ventricle esquerre.

En un síndrome coronari agut, l'extensió de la mort cel·lular que es produeix (o la mida de l'àrea infartada) és directament proporcional a la duració del període d'isquèmia ⁵. Endemés, la dimensió final de l'infart de miocardi dependrà de la mida del territori distal a la placa coronària responsable (és a dir, de la mida de l'àrea en risc), de la magnitud de flux residual i de la presència o no d'irrigació col·lateral en relació a l'obstrucció arterial principal ⁶. Per tant, el tractament d'elecció actual per tal de reduir la mida de l'infart en un pacient amb síndrome coronari agut és la ràpida restauració del flux sanguini coronari o reperfusió. Una reperfusió precoç (menys de 30 minuts d'oclusió coronària), permetrà prevenir quasi totalment la mort cel·lular. En canvi, una demora en el tractament de reperfusió major a les 3 hores provocarà que sigui pràcticament impossible salvar res del teixit afectat. És en la finestra intermèdia, entre

els 30 minuts i les 3 hores des de l'inici de la isquèmia, quan el tractament de reperfusió permetrà reduir la mort cel·lular, millorant la supervivència hospitalària i l'esperança de vida ^{7,8}.

Tot i que l'aplicació de la reperfusió dins el temps de finestra terapèutica permet salvar una part del miocardi sotmès a isquèmia, existeix un proporció important de la mort cel·lular que és ocasionada per la pròpia restauració del flux, que ocorre principalment durant els minuts inicials de l'obertura de l'artèria, i que es produeix en forma de necrosis ⁹. Aquesta pèrdua cel·lular, afegida a la provocada pel propi període d'isquèmia s'anomena dany letal per reperfusió i ha esdevingut com una possible diana terapèutica per a reduir la mida de l'infart (**Fig. 1**). Així doncs, la investigació i el desenvolupament de noves teràpies per a reduir el dany per reperfusió ha estat una prioritat dins del món cardiovascular, amb l'objectiu final de reduir l'impacte de la cardiopatia isquèmica i millorar la progressió i condició mèdica dels pacients afectats en la societat ¹⁰.

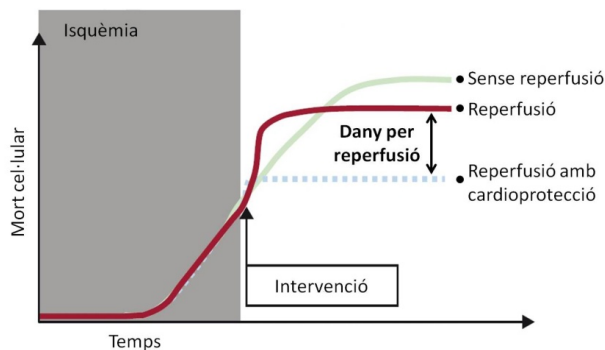


Fig. 1 – Il·lustració de la definició del dany per reperfusió. La mort cel·lular augmenta de manera proporcional a la durada de la isquèmia. La reperfusió limita aquest procés però alhora produeix un dany cel·lular addicional durant els minuts inicials de la mateixa. L'aplicació de tractaments a l'inici de la restauració del flux sanguini permet disminuir aquesta mort cel·lular inicial. Modificada de ¹¹.

El síndrome coronari agut o cardiopatia isquèmica té una sèrie de conseqüències tardanes, com són el remodelat ventricular advers, l'aparició d'arítmies ventriculars o la insuficiència cardíaca. Aquest seguit d'esdeveniments provoquen que la població afectada pateixi una pèrdua en la qualitat de vida, que juntament amb les comorbiditats de la patologia inicial, originen una incapacitat personal i alhora un augment del cost econòmic sanitari a destinar a aquest sector de la població ¹². Per aquest motiu, el laboratori de Malalties Cardiovasculars, en el qual s'ha realitzat la present Tesi doctoral, té com a objectiu la investigació de noves teràpies per a reduir la mort cel·lular, així com l'estudi dels mecanismes moleculars del dany per reperfusió.

1. MECANISMES CEL·LULARS I MOLECULARS DEL DANY MIOCÀRDIC PER ISQUÈMIA-REPERFUSIÓ.

El principal actor en l'infart de miocardi, és el cardiomiòcit. Aquest és la unitat cel·lular bàsica responsable de la contracció cardíaca, i per tant la seva mort comportarà una pèrdua de la capacitat funcional del cor, amb la conseqüent reducció en la qualitat de vida dels pacients afectats. Els mecanismes desencadenants de la mort cel·lular, que es posen en marxa després d'un episodi d'isquèmia-reperfusió, no són totalment coneguts, però entre ells destaquen dos principals: el desenvolupament d'hipercontractura cel·lular i l'obertura del porus de transició mitocondrial (mPTP). Ambdós són mecanismes complexos i interrelacionats i afavorits per les alteracions fisiopatològiques iniciades durant la isquèmia i continuades durant la reperfusió, com els canvis en el pH intracel·lular, la deprivació energètica o la pèrdua de l'homeòstasi iònica.

Durant el període d'isquèmia, el teixit afectat no rep una correcta irrigació, disminuint l'aportació d'oxigen i nutrients. Aquesta falta d'oxigenació provoca una aturada en la síntesi d'adenosin 5'-trifosfat (ATP) a nivell de la cadena de transport d'electrons mitocondrial, conduint a una major utilització del metabolisme anaerobi, concretament la via glucolítica, per a superar les mancances energètiques. Aquest canvi energètic, però, no està exempt de conseqüències. L'acumulació d'àcid làctic intracel·lular i de diòxid de carboni extracel·lular (CO_2), condueixen a l'aparició d'acidosis tissular^{13,14}. Endemés, degut a la disminució dels nivells d'ATP, els cardiomiòcits pateixen un escurçament marcat, fenomen conegut com a rigor isquèmic¹⁵.

El cardiomiòcit isquèmic intenta corregir l'acidosi intracel·lular mitjançant l'extrusió de protons des de l'interior de la cèl·lula, utilitzant tant l'intercanviador Na^+/H^+ (NHE) com el cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$. Aquest fet ocasiona una entrada massiva de Na^+ cap al citosol. A més a més, degut a la manca d'ATP, la bomba Na^+/K^+ ATPasa de la membrana plasmàtica no funciona correctament, la qual cosa impedeix la correcció de la sobrecàrrega citosòlica de Na^+ ¹⁶. Aquesta acumulació intracel·lular de Na^+ activa, al seu torn, el funcionament revers de l'intercanviador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), extraient ions sodi a canvi de l'entrada de ions calci, produint-se, com a conseqüència, una sobrecàrrega citosòlica d'aquest darrer ió. Aquesta situació s'agreuja pel fet de que les ATPases de calci del reticle sarcoplasmàtic, també dependents d'energia, no són capaces de retirar el calci cap a l'interior del reticle. Per tant, paulatinament s'arribarà a un episodi de desregulació de l'homeòstasi iònica, finalitzant amb un augment del calci i sodi intracel·lular juntament amb un ambient cel·lular marcat per un pH àcid^{9,14}. L'acidosi manté inhibida la obertura del mPTP i la hipercontractura dels cardiomiòcits (**Fig. 2**).

Durant la reperfusió, si el període d'isquèmia no ha estat massa llarg, la cèl·lula pot tornar a produir energia (ATP). Al mateix temps, el rentat de l'espai extracel·lular fa

que el pH es recuperi molt ràpidament. És en aquesta situació, en la que els mitocondris dels cardiomiòcits tornen a produir energia, en un ambient citosòlic de sobrecàrrega iònica de sodi i calci, i en el que el pH intracel·lular s'ha recuperat, en la qual es produeixen les condicions idònies per a que es produeixi la mort cel·lular per reperfusió, principalment mediada pels mecanismes d'hipercontractura i d'obertura del mPTP (Fig. 2).

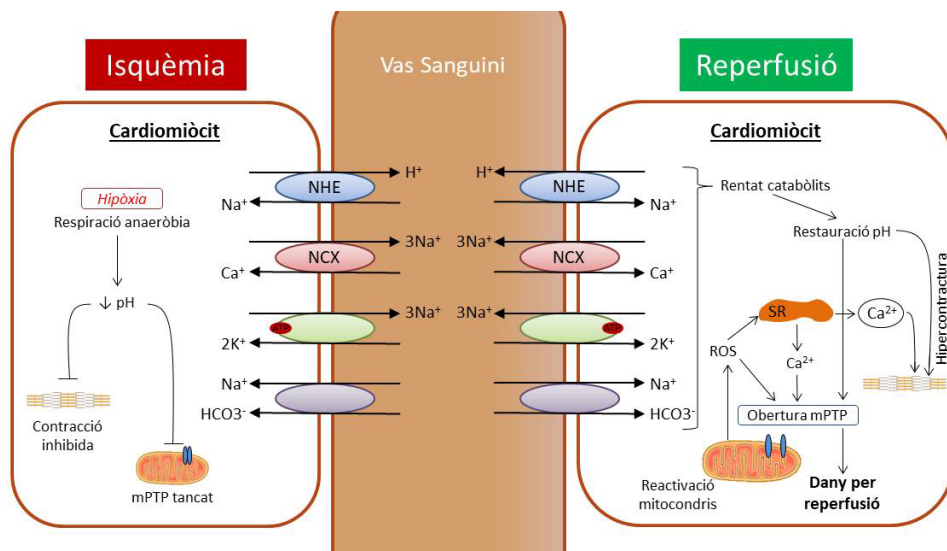


Fig. 2 –Representació esquemàtica dels diferents canvis intracel·lulars durant un episodi d'isquèmia-reperfusió. Explicació complerta en el text principal.

1.a. Hipercontractura.

La hipercontractura es defineix com una activació desmesurada de l'aparell contràctil dels cardiomiòcits. Aquesta acció provoca un augment en la tensió mecànica, desencadenant la ruptura de la membrana cel·lular dels cardiomiòcits (sarcolema) i la conseqüent mort cel·lular. A nivell histològic, la mort cel·lular per hipercontractura s'observa com un patró típic conegut com a necrosis en bandes de contracció^{9,17-19}. Els mecanismes que provoquen l'aparició de la hipercontractura són complexos i encara no estan totalment detallats i definits, però els principals candidats estan relacionats amb la desregulació de l'homeòstasi iònica.

1.a.1. Canvis en les concentracions citosòliques de Na⁺ i Ca²⁺ i del pH intracel·lular.

A l'inici de la reperfusió, la zona afectada per la isquèmia recupera la irrigació sanguínia, permetent als mitocondris dels cardiomiòcits supervivents reactivar la síntesi d'ATP. El retorn del flux sanguini permet, a més a més, el rentat dels catabòlits

acumulats a l'exterior de la cèl·lula com el lactat o els protons, produint-se un gradient de protons entre els espais intra i extracel·lulars. En aquest moment, les cèl·lules cardíaques intenten restablir el pH intracel·lular mitjançant l'activitat de l'intercanviador NHE i del cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$, tot i que sigui a costa de produir una sobrecàrrega intracel·lular addicional de Na^+ . Per altra banda, l'estructura i funcionalitat de l'ATPasa sarcolemal dels cardiomiòcits ha quedat danyada per l'activació de calpaïnes en el moment de la reperfusió²⁰, de manera que, tot i disposar d'ATP, no es pot reduir la concentració intracel·lular de Na^+ per aquesta via. L'única alternativa viable és l'activació en mode revers de l'intercanviador NCX, que a canvi incrementa, encara més, el contingut intracel·lular de calci, ja iniciat durant la fase d'isquèmia.

Per altra banda, la presència d'ATP permet la reactivació de l'ATPasa del reticle sarcoplasmàtic (SERCA), la qual intenta rebaixar la sobrecàrrega de calci citosòlic a través de la seva captació a l'interior d'aquest orgànul. Malauradament, la capacitat del propi reticle queda saturada ràpidament, alliberant calci novament a través del receptor de rianodina (RYR). Aquesta situació acaba produint, a l'inici de la reperfusió, una sèrie de processos de captació i extrusió de calci des del reticle i oscil·lacions cícliques en els nivells de calci citosòlic²¹. Tota aquesta situació s'agreuja per la íntima relació existent entre els mitocondris i el reticle sarcoplasmàtic, que juga un paper clau en l'homeòstasi del calci²².

És palès que una ràpida correcció del pH intracel·lular té un efecte perjudicial, ja que l'acidosi intracel·lular inhibeix, entre altres coses, la maquinària contràctil. La recuperació en la síntesi d'ATP i la sobrecàrrega citoplasmàtica de calci amb oscil·lacions cícliques que es donen durant la reperfusió, juntament amb la ràpida recuperació del pH intracel·lular que ocorre a l'inici d'aquesta fase, acaben desencadenant l'activació contràctil desmesurada de la miofibril·les musculars, conduint a l'aparició de la hipercontractura. Cal afegir que aquestes oscil·lacions de calci poden afectar al potencial de membrana, de manera que es poden originar postdespolaritzacions tardanes i activitats desencadenades, fenòmens associats amb l'aparició d'arrítmies ventriculars²³.

1.a.2. Edema.

La restauració del flux sanguini en el moment de la reperfusió provoca que les molècules provinents del metabolisme anaerobi, i acumulades durant el període d'isquèmia, siguin ràpidament rentades pel torrent circulatori, provocant un gradient osmòtic entre els espais intra i extracel·lulars del cardiomiòcit. Aquest gradient osmòtic, juntament amb l'anteriorment descrita acumulació de Na^+ intracel·lular, facilita l'entrada d'aigua a l'interior de la cèl·lula, desencadenant un augment del volum cel·lular, anomenat edema cel·lular^{9,18,24,24}. Aquest edema cel·lular provoca un

increment en la pressió osmòtica i un estrès mecànic en la membrana dels cardiomiòcits, que juntament amb el desenvolupament de la hipercontractura, pot conduir a la ruptura del sarcolema i a la mort cel·lular.

1.a.3. Fragilitat cel·lular. Calpaïnes.

L'efecte de la hipercontractura i l'edema es suma al produït per un increment en la fragilitat cel·lular, principalment deguda a l'activació de les calpaïnes durant la reperfusió. Les calpaïnes són una família de cisteïna proteases no lisosomals dependents de calci. Les calpaïnes romanen inactives abans de la reperfusió, degut al pH àcidic del medi intracel·lular isquèmic, però amb el retorn del flux sanguini, la normalització del pH intracel·lular i l'augment característic de calci d'aquest període, es produeix l'activació inapropiada d'aquestes proteases²⁵. L'activitat de les calpaïnes provoca la proteòlisis d'una extensa llista de proteïnes, majoritàriament integrants del citoesquelet i de l'aparell contràctil cel·lular, conduint a la disfunció contràctil, l'increment de la fragilitat del citoesquelet i de la membrana, la disfunció mitocondrial i la conseqüent mort cel·lular per necrosis^{26,27}.

Entre les múltiples dianes d'actuació de les calpaïnes en el citoesquelet cal destacar la degradació del complex format per anquirina- α -fodrina, el qual intervé en l'ancoratge de la bomba Na^+/K^+ ATPasa a la membrana, afectant la seva activitat i, per tant, de manera directa, participant en la desregulació de l'homeòstasi iònica^{20,28}. Altres proteïnes sensibles a degradació per l'activitat de les calpaïnes són la distrofina, la paxilina, la desmina, la vinculina o bé la tal·lina²⁷. Per altre banda també s'ha descrit l'actuació d'aquestes proteases sobre les troponines cardíques I i T i sobre la titina, una de les proteïnes cel·lulars més grans que forma part del sarcòmer.

Finalment, altres proteases com les metaloproteases, les catèpsines, les caspases i el sistema ubiquitina-proteosoma poden jugar també un paper com a mediadores o participants en el dany per isquèmia-reperfusió²⁹.

1.a.4. Propagació dels canvis iònics i de la mort cel·lular a través de les "gap junctions": extensió del dany per reperfusió.

Les "gap junctions" són unions intercel·lulars que permeten la comunicació elèctrica i química entre cèl·lules adjacents. S'estructuren en plaques formades per agregats de canals de membrana constituïts per una família de proteïnes transmembrana anomenades conexines. La unió de sis monòmers de conexina, al voltant d'un porus central, forma un hemicanal a la membrana cel·lular, sent la conexina 43 (Cx43) l'isoforma predominant al teixit cardíac. La interacció dels dominis extracel·lulars de dos hemicanals de dues cèl·lules veïnes, forma un canal intercel·lular, que posa en contacte el citoplasma de les dues cèl·lules connectades.

Els canals intercel·lulars s'agrupen formant plaques, principalment als extrems cel·lulars, dins dels discos intercalars de les fibres cardíques. La seva funció principal és la de permetre que es transmeti correctament l'impuls elèctric, per tal que es mantingui una contracció cardíaca coordinada ³⁰.

Endemés de participar en l'acoblament elèctric, les "gap junctions" participen en l'acoblament químic, permetent el moviment, entre les cèl·lules connectades, de metabòlits amb un pes molecular inferior a 1500 Da, així com de diversos ions. De fet, s'ha demostrat que la sobrecàrrega de Na⁺ que es dona durant la reperfusió pot propagar-se a les cèl·lules veïnes, provocant l'activació, en aquestes darreres, de la forma reversa de l'intercanviador NCX, i produint, per tant, una extensió del dany per isquèmia-reperfusió ^{7,31,32}. La propagació del dany miocàrdic ocorre majoritàriament durant la reperfusió, ja que l'acidosi que apareix durant la isquèmia produeix el tancament d'aquests canals ³³. Així, l'administració de desacoblants de les "gap junctions" a l'inici de la reperfusió permet reduir la mida de l'infart en models experimentals d'isquèmia miocàrdica en rates i porcs ^{34,35}.

1.b. Obertura del mPTP.

El segon mecanisme proposat responsable de la mort cel·lular durant la reperfusió és l'obertura del mPTP. El terme "transició mitocondrial" fa referència a un increment abrupte de la permeabilitat de la membrana mitocondrial interna, que permet el pas de soluts de fins a 1,5 kDa de pes molecular.

1.b.1. Conseqüències de l'obertura del mPTP.

L'obertura del mPTP ha estat relacionada tradicionalment amb la disfunció mitocondrial ja que té com a conseqüència l'aparició d'edema mitocondrial, la dissipació del potencial de membrana i per tant la despolarització mitocondrial, la pèrdua del gradient de pH, la inhibició de la respiració mitocondrial, l'aturada de la síntesis d'ATP i l'alliberació del contingut de calci, així com del citocrom C i altres factors pro-apoptòtics, al citosol ³⁶. Tots aquests efectes poden conduir a la mort cel·lular per necrosi o apoptosi ³⁷⁻³⁹.

1.b.2. Estructura del mPTP.

L'estructura del porus i la seva configuració molecular no són ben coneguts, havent estat objecte d'un intens debat des de fa, aproximadament, 30 anys. Actualment existeixen dues teories principals respecte a l'estructura del porus.

El primer model proposa que el porus no està format per una única proteïna, sinó que consisteix en una estructura supramolecular ⁴⁰. Les proteïnes presents en aquest conglomerat proteic serien: la ciclofilina D (Cyp D), ubicada en la matriu mitocondrial;

el transportador de nucleòtids d'adenina (ANT), integrat a la membrana mitocondrial interna, i el canal d'anions voltatge dependent (VDAC), localitzat en la membrana mitocondrial externa. A part, s'han descrit altres interaccions amb molècules mitocondrials tals com el transportador de fosfat inorgànic (PIC), proteïnes tals com BH₃, p53, Bax i Bcl-2, enzims com l'hexoquinasa i la creatina quinasa o bé receptors cel·lulars com el de les benzodiazepines, entre altres ⁴¹. Aquest model ha estat desacreditat per diversos estudis en models animals knock out que han analitzat la participació real dels diferents candidats proposats en la estructura o en la regulació del mPTP. Així, ni ANT ⁴², ni VDAC ⁴³, semblen tenir un paper estructural, encara que ANT podria tenir un paper regulador ⁴². Per altra banda, l'única proteïna del complex descrit que tindria un paper important en l'estructura i regulació mPTP és la Cyp D ⁴⁴⁻⁴⁶.

Estudis posteriors, publicats a partir del 2013, van proposar una nova teoria, en la que l'ATP sintasa mitocondrial seria el component estructural principal del porus ⁴⁷. L'ATP sintasa està formada pels dominis F₀ i F₁. El domini F₀ està constituït per 9 polipèptids diferents (a-g, F₆ i F₈) i es troba ancorat a la membrana mitocondrial interna. Per altra banda, la unitat F₁ és un domini soluble que roman en la matriu mitocondrial, i que està format per 5 subunitats (α, β, γ, δ/OSCP i ε) ⁴¹.

En relació a l'ATP sintasa hi ha dos corrents actuals de pensament. El primer postula que el mPTP estaria format per dímers de l'ATP sintasa ⁴⁸. En l'estudi citat, els autors van integrar en bicapes lipídiques dímers purificats de l'ATP sintasa. En presència de calci i altres molècules reguladores del mPTP, l'estructura formada va ser capaç de crear un corrent elèctric equivalent al que crea l'obertura del mPTP. A més a més, es va demostrar que la Cyp D, que com hem vist abans, sí es un important integrant, o al menys regulador, del mPTP, es troba associada a l'ATP sintasa. Concretament, aquesta associació sembla tenir lloc a la subunitat OSCP, sent inhibida per la presència de ciclosporina A (CsA), un inhibidor de les ciclofilines d'origen fúngic, amb activitat immunosupresora. La subunitat OSCP està involucrada en la unió de cations, intervenint en els canvis conformacionals induïts per la presència de calci, que influeixen en l'obertura del mPTP ⁴⁸.

Per altra banda, el segon corrent de pensament, iniciat amb els estudis d'Alavian al 2014, postula que el mPTP està format per monòmers de l'ATP sintasa, i més concretament per la subunitat c del domini F₁. La subunitat c o anell c, està constituït per 8 dominis, que formarien l'estructura de porus. En el treball original, Alavian i col·laboradors van purificar la subunitat c i la van reconstituir en liposomes, els quals van generar un corrent elèctric similar al produït per l'obertura del mPTP ⁴⁹. Altres estudis van demostrar que la deleció del gen codificant per la subunitat c inhibeix l'obertura del mPTP, mentre que la seva sobreexpressió incrementa la permeabilitat mitocondrial ^{50,51}.

1.b.3. Regulació de l'obertura del mPTP.

L'obertura del mPTP és un procés altament regulat. L'acidosis intracel·lular la inhibeix, mentre que concentracions elevades de calci i fosfat inorgànic intracel·lular, juntament amb una producció augmentada d'espècies reactives d'oxigen (ROS) l'afavoreix. Aquestes són precisament les condicions que ocorren durant l'infart de miocardi. Durant la isquèmia, el mPTP es troba tancat, principalment degut a l'acidosi present durant aquesta fase. És en els minuts inicials de la reperfusió quan es dona l'obertura massiva del mPTP, compromentent la viabilitat dels cardiomiòcits, provocada pels alts nivells mitocondrials de calci i fosfat inorgànic i la producció massiva de ROS⁵²⁻⁵⁴. En estreta relació, l'obertura del mPTP promou la sortida de més calci mitocondrial provocant més oscil·lacions d'aquest catió exacerbant el desenvolupament de la hipercontractura¹¹.

La relativa contribució de la hipercontractura i l'obertura del mPTP a la mort cel·lular durant la reperfusió és complexa. Ambdós processos estan interrelacionats, romanent inhibits durant la isquèmia pel baix pH existent durant aquesta fase, i sent afavorits per la seva ràpida recuperació durant la reperfusió, així com per les alteracions en les concentracions de calci. De fet, la duració de la isquèmia determina de forma crítica la importància del mPTP en el dany miocàrdic per reperfusió. Així, jugaria un paper clau després de períodes llargs d'isquèmia, mentre que seria la hipercontractura el mecanisme de mort més important després de períodes curts⁵⁵.

2. MECANISMES ENDÒGENS DE CARDIOPROTECCIÓ.

El teixit miocàrdic, juntament amb altres teixits, posseeix una sèrie de mecanismes adaptatius per fer front al dany per isquèmia-reperfusió. Aquests mecanismes endògens es poden activar mitjançant la realització de cicles curts d'isquèmia-reperfusió, els quals es coneixen com a maniobres de condicionament isquèmic⁵⁶. En funció del moment en el que s'apliquin aquests episodis breus d'isquèmia-reperfusió es pot diferenciar entre el preconditionament isquèmic (quan són aplicats abans de la isquèmia letal o isquèmia índex) o el postcondicionament isquèmic (a l'inici de la reperfusió). Per altre banda aquesta maniobra es pot realitzar en el mateix òrgan que patirà l'episodi d'isquèmia letal (condicionament local), o també, en un òrgan diferent al que s'intenta protegir, coneixent-se, en aquest cas, com a condicionament isquèmic remot⁵⁷.

2.a. Precondicionament isquèmic local.

El preconditionament isquèmic és una maniobra cardioprotectora consistent en l'aplicació d'episodis breus d'isquèmia-reperfusió previs a una isquèmia perllongada i potencialment letal.

En la protecció per preconditionament isquèmic local (IPC) hi ha certes consideracions temporals que s'han de tenir en compte. Primerament, una durada dels cicles d'isquèmia-reperfusió inferior als 1-2 minuts no resulta en efectes protectors ⁵⁸. Tanmateix, augmentar-ne el temps fins a 15-20 minuts tampoc resulta en cap benefici, i de fet podria ser contraproductiu ⁵⁹. Per altra banda, cal tenir en compte que l'interval de temps entre l'últim cicle preconditionant i l'inici de la isquèmia sostinguda ha de ser inferior a 5-15 minuts, havent-se demostrat que períodes superiors a una hora provoquen la pèrdua dels efectes cardioprotectors ⁶⁰. Finalment, si la durada de la isquèmia sostinguda és superior a 2-3h, el preconditionament isquèmic no té efectes protectors ^{61,61}.

2.a.1. Mecanismes d'acció de l'IPC.

Durant els últims 30 anys, la comunitat científica ha realitzat una intensa activitat investigadora al voltant dels mecanismes moleculars i cel·lulars responsables de la protecció per preconditionament isquèmic i ha desenvolupat una hipòtesi general sobre els mateixos ^{58,62}. Així, s'ha descrit que durant el protocol d'IPC s'alliberen al medi extracel·lular un o més desencadenants provinents de l'àrea de teixit sotmesa als cicles d'isquèmia-reperfusió. Aquests mediadors actuen mitjançant receptors de membrana acoblats a proteïna G, amb activitat proteïna quinasa, o bé de manera independentment de receptors, conduint, en qualsevol cas, a l'activació de múltiples i complexes cascades citosòliques ⁶³. Aquests cascades acaben actuant sobre un efector final, que és el responsable últim de la cardioprotecció.

Entre els desencadenants dependents de receptor, possiblement els màxims reguladors de la protecció endògena de l'IPC, destaquen l'adenosina, la bradiquinina i els opioides. Altres mediadors neurohormonals com la noradrenalina, l'endotelina i l'angiotensina, tindrien efectes cardioprotectors relacionats amb l'IPC principalment quan s'administren de manera exògena ⁵⁸. L'acció de tots aquests agonistes sobre els seus receptors provoca l'activació de proteïnes G, que al seu torn, activen cascades citosòliques de senyalització, que inclouen proteïnes quinases amb activitat sobre serines i treonines. A més a més, entre els desencadenants dependents de receptors trobem també els agonistes de receptors amb activitat tirosina quinasa directa, com els que s'activen en resposta a factors de creixement (TGF- β 1) o bé a insulina. Pel que fa a la protecció mediada de manera independent de receptors cal esmentar el paper dels radicals lliures ⁶⁴ i del NO ⁶⁵, els efectes dels quals depenen de la dosi: concentracions baixes produeixen efectes protectors, mentre que quantitats elevades tenen efectes contraproductius.

En conjunt, els diferents mediadors descrits tenen com a resultat final l'activació de vies citosòliques cardioprotectors, especialment les anomenades RISK (Reperfusion Injury Salvage Kinase) i SAFE (Survivor Activating Factor Enhancement). La via RISK

(Fig. 3-A) està formada per un grup de proteïnes quinases relacionades amb la supervivència cel·lular, les quals s'activen de manera seqüencial durant les estratègies que desencadenen la cardioprotecció endògena. Entre les més importants hi figuren la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), la proteïna quinasa B (PKB o Akt), la proteïna quinasa activada per factors mitogènics (MEK) i la quinasa regulada per senyals extracel·lulars (ERK1/2). L'activació de totes elles confereix una resposta cardioprotectora, sobretot quan es produeix a l'inici de la reperfusió⁶⁶. El concepte de la via RISK, però, és molt més ampli, i també inclou altres quinases que medien la cardioprotecció com la proteïna quinasa C (PKC, principalment l'isoforma PKC-ε)⁶⁷, la proteïna quinasa G (PKG)⁶⁸ i la glicogen sintasa quinasa 3β (GSK-3β)⁶⁹. Per altra banda, la via SAFE (Fig. 3-B) és una via citosòlica que intervé en la cardioprotecció, de forma independent de l'acció de PI3K-Akt. Aquesta cascada cel·lular es caracteritza per la participació del factor de necrosis tumoral α (TNF-α) i STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3)⁷⁰.

Independentment de l'origen dels diferents mediadors i de la via activada, tots ells acaben convergint en efectors finals comuns. Entre els candidats proposats s'han postulat els canals de K⁺ ATP-dependents del mitocondri (mitoK_{ATP}), així com la Cx43 mitocondrial⁷¹. Tot i així, hem de tenir present que l'efector final principal de les diferents cascades citosòliques pot ésser el propi mPTP, de forma que totes aquestes vies regularien la seva obertura⁶².

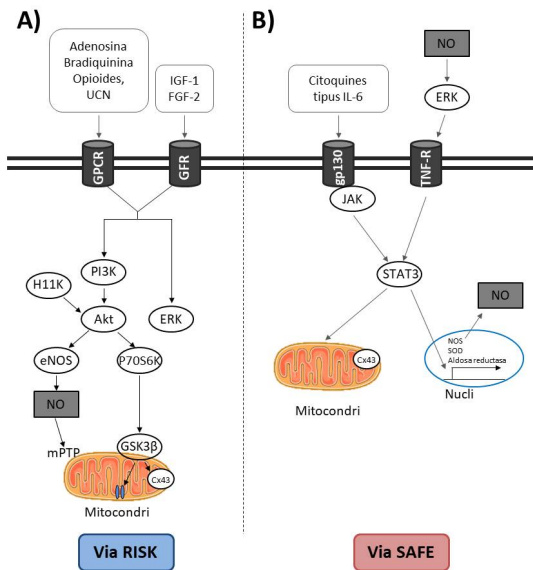


Fig. 3 – Principals vies citosòliques implicades en la cardioprotecció. **A**, Via RISK. **B**, via SAFE. GPCR, Receptor acoplat a proteïna G; IGF-1, Factor de creixement insulínic de tipus 1; FGF-2, Factor de creixement de fibroblast 2; IL-6, Interleuquina 6; TNF-R, receptor del TNF. Figura modificada de⁷².

2.a.2. Evidència preclínica de l'efecte cardioprotector de l'IPC.

La primera demostració de l'efecte cardioprotector d'aquesta estratègia va ser reportada per Murry i col·laboradors al 1986 en un model caní. Aquest grup va demostrar que l'aplicació de 4 cicles de 5 minuts d'isquèmia i 5 minuts de reperfusió consecutius, previs a una oclusió de 40 minuts d'una artèria coronària, reduïa en un 75% la mida de l'infart⁷³. L'eficàcia d'aquesta maniobra no s'ha observat tan sols al cor sinó també en altres òrgans i teixits incloent el fetge, retina, ronyons, múscul esquelètic i intestins⁶². A nivell cardíac, aquesta estratègia ha estat confirmada en diferents models experimentals, des de cardiomiòcits fins a cors aïllats, juntament amb models in vivo en un gran rang d'espècies, tals com ratolí, rata, conill, gos i porc⁶³. L'eficàcia de l'IPC ha estat clarament relacionada amb la reducció de la mida de l'infart. Tot i així, diferents estudis han demostrat efectes protectors en altres variables d'interès clínic tals com la disminució de l'aturdiment miocàrdic, provocant una millora de la recuperació de la funció cardíaca postisquèmica⁵⁸, o sobre la incidència d'arrítmies ventriculars⁷⁴.

2.a.3. Translació clínica de l'IPC.

Donat que el protocol d'IPC s'ha d'iniciar abans de l'aparició d'isquèmia miocàrdica, la seva utilitat clínica ha estat limitada a aquells pacients sotmesos a cirurgia cardíaca en els que l'aparició d'isquèmia és previsible. Aquest és el cas, per exemple, de pacients sotmesos a revascularització mitjançant bypass coronari⁷⁵. Així, en un estudi realitzat en 30 pacients, sotmesos a cirurgia de bypass, l'aplicació de cicles de preconditionament abans de la intervenció va suposar una disminució significativa de l'alliberació de troponina T a les 72 hores⁷⁶. Així doncs, degut a les seves limitacions temporals, aquesta maniobra no ha estat utilitzada en altres contextos clínics com poden ser els pacients amb SCAEST sotmesos a revascularització percutània o farmacològica. En qualsevol cas, la presència d'angina preinfart s'ha associat amb reduccions en l'alliberament de creatina quinasa i millores en la fracció d'ejecció en pacients amb SCAEST⁷⁷.

2.b. Postcondicionament isquèmic local.

A diferència de l'IPC, en el que els cicles breus d'isquèmia-reperfusió s'apliquen abans de la isquèmia perllongada o índex, en el postcondicionament isquèmic local (IPoC), aquests episodis s'efectuen just en el moment de la reperfusió. Per tal que aquesta maniobra sigui protectora, s'han de tenir en compte certes consideracions, sent imprescindible que la primera reclusió de l'artèria coronària es realitzi immediatament després de l'inici de la reperfusió. De fet, s'ha demostrat que una demora de tan sols un minut suposa la pèrdua de la protecció enfront la mida de l'infart⁷⁸. Un altre requisit del protocol és la durada dels cicles condicionants, els quals s'estipulen d'una duració d'entre 10-60 segons, repetits de 3-6 vegades⁶³.

2.b.1. Mecanismes d'acció de l'IPoC.

Les vies de protecció que s'activen en resposta a la maniobra de postcondicionament són molt similars a les anteriorment descrites per la maniobra de l'IPC. Així doncs, després de l'aplicació dels cicles curts d'IR s'alliberen una sèrie de mediadors, que actuen majoritàriament sobre receptors associats a proteïna G, tot desencadenant l'activació de cascades citosòliques de cardioprotecció. Aquestes es basen principalment en les vies RISK i SAFE, i altres com la via GMPc/PKG, que a nivell dels efectors finals intervenen en la preservació de la funció mitocondrial, tot reduint la càrrega de calci, l'estrès oxidatiu i inhibint l'obertura del mPTP ⁷⁹. No obstant, s'ha descrit que una part de la protecció exercida per la maniobra d'IPoC pot estar relacionada amb que es posposa la recuperació del pH intracel·lular durant la reperfusió, mantenint-se així l'acidosi intracel·lular existent durant la isquèmia ⁸⁰. De fet, l'administració de solucions àcides durant la reperfusió té efectes beneficiosos, reduint la mida de l'infart després d'isquèmia miocàrdica transitòria en models de cor aïllat de rata ¹³ i de cor in situ porcí ⁸¹.

2.b.2. Evidència preclínica de l'efecte cardioprotector de l'IPoC.

La primera demostració de l'eficàcia de l'IPoC data de 2003, quan Zhao et al. va demostrar que és possible protegir el teixit miocàrdic d'un episodi d'isquèmia tot interrompent la reperfusió amb diversos episodis curts d'isquèmia ⁸². En aquest estudi es va comprovar que l'aplicació de 3 cicles de 30 segons d'oclusió, seguits de 30 segons de reperfusió, sobre l'artèria coronària descendent anterior, permetia reduir la mida de l'infart un 44% en un model caní d'oclusió transitòria in vivo. L'efectivitat de la maniobra de postcondicionament isquèmic ha estat testada en múltiples models experimentals, reduint de manera significativa la mida de l'infart en rosegadors ^{83,84}, conills ⁸⁵ i porcs ⁸¹.

2.b.3. Translació clínica de l'IPoC.

Tan sols 2 anys després del descobriment de l'IPoC, es va publicar un primer estudi clínic pilot, incloent 38 pacients amb infart agut de miocardi sotmesos a angioplàstia primària. En aquest estudi, l'aplicació de la maniobra de IPoC, consistent en 4 episodis d'un minut d'isquèmia-reperfusió, mitjançant l'inflat d'un baló d'angioplàstia, posteriorment a la col·locació del stent miocàrdic, va permetre reduir de forma significativa l'alliberació de creatina quinasa ⁸⁶. Des d'aquest primer estudi, altres assajos clínics han pogut confirmar la reducció de la mida d'infart després de l'aplicació de la maniobra de IPoC per tècniques d'imatge tals com SPECT ^{87,88} i ressonància magnètica ⁸⁹. Per altra banda, la maniobra també ha demostrat produir beneficis a llarg termini. Així, s'ha observat que un any després de la intervenció, la maniobra de IPoC, aplicada durant la intervenció percutània, produeix un augment del 7% en la fracció d'ejecció ⁸⁷. Tot i els treballs mencionats, altres estudis no han estat capaços de

demostrar l'eficàcia d'aquesta maniobra cardioprotectora ⁹⁰⁻⁹². A més a més, en l'estudi multicèntric POST (n=700), l'aplicació de l'IPoC en pacients amb infart de miocardi sotmesos a revascularització percutània durant les primeres 12 hores des de l'aparició dels símptomes, no va resultar en una reducció de la mida de l'infart ni d'altres variables cardíaques, com la insuficiència cardíaca ⁹³. De manera similar, l'estudi POSTEMI (n=272), tampoc va mostrar una reducció de manera significativa en la mida de l'infart en pacients sotmesos a angioplàstia primària ⁹⁴.

Així doncs, són necessaris nous estudis per tal de confirmar l'eficàcia d'aquest tractament, i alhora determinar el millor moment per iniciar la maniobra de condicionament (després de la predilatació o posteriorment a la col·locació del stent cardíac), juntament amb la possible existència de microembolització que pugui tenir efectes deleteris ⁷⁹.

2.c. Condicionament isquèmic remot.

El condicionament isquèmic remot (RIC) consisteix en l'aplicació de cicles condicionants en un territori distant al que pateix la isquèmia índex. Una de les característiques més rellevants dels protocols de RIC és que els cicles curts d'isquèmia-reperfusió es poden realitzar en una extremitat corporal, mitjançant l'acció repetida d'un manigueta de pressió, permetent una aplicació més atractiva i pràctica a nivell clínic ⁵⁷. Així doncs, estem davant d'una maniobra no invasiva, fàcil de realitzar en la clínica o en el trasllat amb ambulància, segura, econòmica, i efectiva, la qual cosa la converteix en una estratègia prometedora per a la seva translació a la pràctica clínica en el tractament de pacients amb infart agut de miocardi ⁹⁵. Pel que fa al protocol estàndard, els diferents estudis coincideixen en la realització de 3-4 cicles d'isquèmia i reperfusió de 5 minuts de durada, respectivament, realitzats en la zona remota d'elecció ⁶³.

Els cicles d'isquèmia transitòria es poden aplicar en diferents moments temporals: abans de la isquèmia índex miocàrdica perllongada (precondicionament isquèmic remot) ^{96,96}, durant la mateixa (percondicionament isquèmic remot) ⁹⁷ o bé durant la reperfusió (postcondicionament isquèmic remot) ⁹⁸.

2.c.1. Mecanismes d'acció del RIC.

Des del descobriment de l'efecte beneficiós del RIC, s'han proposat dues teories principals per tal d'explicar els mecanismes de transport de les senyals cardioprotectores des del teixit condicionat fins al cor: la teoria humoral i la teoria nerviosa. En la primera teoria, el teixit condicionat alliberaria factors humorals al torrent sanguini, que serien transportats fins al teixit cardíac on exercirien la seva acció. Per altra banda, la segona teoria implicaria l'activació de fibres nervioses sensorials en el teixit perifèric condicionat que, mitjançant un arc reflex, activarien la

innervació autonòmica cardíaca a través del sistema nerviós central ⁹⁹. Un cop els senyals arriben al cor, per qualsevol d'aquests vies, s'activen cascades citosòliques bastant similars a les prèviament descrites per l'IPC ^{100,101}.

La teoria dels factors humorals neix a partir d'estudis que van demostrar que l'administració d'efluent coronari d'un cor preconditionat confereix protecció enfront l'infart de miocardi en un altre cor sotmès a isquèmia-reperfusió ¹⁰². L'efecte beneficiós d'aquest suposat element circulant protector sembla mantenir-se fins i tot entre espècies diferents, ja que plasma sanguini humà procedent de pacients sotmesos a cicles de RIC és capaç de conferir protecció enfront de l'infart en cors aïllats de conill ¹⁰³. Entre els candidats a ser el factor humoral alliberat s'inclouen diferents pèptids ⁹⁵, els nitrïts ¹⁰⁴, alguns microRNA (com el microRNA-144) ¹⁰⁵, o la glicina ¹⁰⁶. A més, s'ha proposat que molts d'aquests senyals humorals poden ser transportats fins al cor en exosomes o vesícules extracel·lulars, que contindrien en el seu interior els mediadors cardioprotectors, impeding la seva digestió per RNAases o bé altres enzims degradatius ^{107,108}.

Pel altra banda, la segona teoria es basa en la hipòtesi que el cicles de RIC activen un reflex neural que pot ser protector a nivell del teixit miocàrdic després de sotmetre'l a una isquèmia perllongada. La transducció del senyal des de l'òrgan remot fins al cor es transmetria, segons aquesta teoria, gràcies al sistema somatosensorial, la medul·la espinal i el sistema nerviós autònom ⁹⁵. Corroborant aquesta hipòtesi, l'administració d'un bloquejant nerviós sensorial ^{95,109} o bé la secció dels nervis femoral, ciàtic o vague, o de la medul·la espinal ^{95,110}, ocasionen la pèrdua de protecció induïda pel RIC sobre la mida de l'infart. A més, s'ha descrit que l'activació del nervi vague, provoca la secreció d'acetilcolina, que a la seva vegada estimularia l'activació de la via eNOS i per tant la producció de GMPc ^{95,111}. Així doncs, el dany local provocat per la maniobra RIC activaria vies aferents sensorials que alhora activarien el nervi vague i la medul·la espinal, desencadenant l'alliberació de substàncies cardioprotectors amb actuació sobre l'òrgan cardíac ¹⁰¹.

Totes dues teories no són mútuament excloents. De fet, s'ha demostrat que dialitzats plasmàtics obtinguts de pacients sotmesos a protocols de RIC no poden exercir efectes cardioprotectors en cors aïllats de conill, quan el plasma prové de pacients diabètics amb neuropatia perifèrica ¹¹². A més, altres autors han suggerit que els factors circulants produïts per l'aplicació de la maniobra de RIC a les extremitats serien produïts a nivell visceral, i que les senyals protectores serien transportades fins el destí a través de la seva innervació per la branca gàstrica posterior del nervi vague ¹¹³.

2.c.2. Evidència preclínica de l'efecte cardioprotector del RIC.

La primera evidència de l'existència del RIC prové d'estudis realitzats per Przyklenk i col·laboradors que van descriure, en un model caní de cor in situ, que l'aplicació

d'episodis breus d'isquèmia transitòria en el territori d'una artèria coronària tenia efectes cardioprotectors sobre el dany ocasionat per una isquèmia més perllongada en una altre artèria coronària ¹¹⁴. Estudis posteriors van permetre confirmar que aquesta protecció es manté quan els cicles d'isquèmia-reperfusió transitòria s'apliquen en teixits no cardíacs. Així doncs, l'aplicació d'isquèmies transitòries en òrgans distants, tals com el ronyó o el territori intestinal, exerceixen protecció a nivell cardíac, tot reduint la mida de l'infart ^{115,116}. Cal destacar que estudis més recents apliquen la maniobra de RIC en una extremitat de l'animal. L'eficàcia d'aquests protocols ha estat testada en diferents models animals, incloent tant rosegadors ^{117,118} com models més propers a la clínica, com pot ser el porcí ^{119,120}. En tots ells, el condicionament remot va reduir la mida de l'infart induït mitjançant oclusió coronària transitòria.

2.c.3. Translació clínica del RIC.

En la pràctica clínica, el preconditionament isquèmic remot ha mostrat tenir efectes beneficiosos, al reduir de manera significativa l'alliberació de troponina T en les hores posteriors a la cirurgia en pacients sotmesos a revascularització mitjançant bypass coronari ¹²¹. Estudis posteriors incloent un major nombre de pacients (n=329) van demostrar que, a part d'una reducció dels nivells de troponina I perioperativa, el condicionament remot s'associava també amb una disminució de la mortalitat cardíaca i la incidència d'esdeveniments cardíacs i cerebrovasculars adversos (MACCE), tot avaluant la progressió dels pacients després d'1,5 anys de seguiment ¹²². Tot i els bons resultats dels estudis previs, dos darrers metanàlisis no van ser capaços d'identificar una millora en la variable combinada formada per esdeveniments cardíacs adversos, mort per múltiples causes i infart de miocardi no fatal o bé aparició d'accidents cerebrovasculars, en pacients sotmesos a cirurgia cardíaca als que s'havia aplicat els cicles remots preconditionants a una extremitat ^{123,124}.

L'eficàcia del preconditionament isquèmic remot, on els episodis de RIC s'inicien durant el període d'oclusió coronària, ha estat testada durant el trasllat en ambulància cap a l'hospital dels pacients amb infart de miocardi, tot utilitzant l'inflat i desinflat d'una maniguet de pressió col·locat a l'avantbraç dels malalts. L'aplicació de la maniobra RIC, juntament amb la realització posterior de l'angioplàstia primària, va millorar, en aquest estudi, la quantitat de teixit miocàrdic salvat, analitzat als 30 dies de la intervenció amb la tècnica de SPECT ¹²⁵. L'avaluació dels mateixos pacients als 4 anys, va resultar en una reducció de la variable combinada formada per taxa de mortalitat, mida de l'infart, readmissió hospitalària per insuficiència cardíaca i infart cerebral o cardíac ¹²⁶. De forma similar, en l'estudi CRISP-Stent (n=192), la realització de cicles condicionants abans de l'angioplàstia cardíaca va resultar en una disminució significativa dels nivells de troponina cardíaca, i al seguiment a 6 anys, el grup de pacients tractat mostrava una reducció dels esdeveniments cardíacs a llarg termini ^{127,128}. Un altre estudi, aleatoritzat, que utilitzava el mateix protocol de RIC en pacients

amb infart de miocardi, va demostrar una reducció significativa de la mida de l'infart, avaluada per ressonància magnètica als 3-6 dies¹²⁹. Així, a la vista d'aquestes dades, el percondicionament isquèmic remot es postula com una teràpia efectiva per reduir el dany per isquèmia-reperfusió, a més de ser no invasiva i segura i tenir un baix cost econòmic¹³⁰. En un recent assaig clínic, la realització de 3 cicles condicionants en una extremitat inferior va reduir la variable primària combinada formada per mortalitat d'origen cardíac i hospitalització per insuficiència cardíaca, així com altres variables analitzades, incloent la fracció d'ejecció als 12 mesos de seguiment¹³¹.

Finalment, l'eficàcia del postcondicionament isquèmic remot en la pràctica clínica és més discutida, existint resultats contradictoris en els diferents assajos clínics. En un dels estudis, l'aplicació de cicles condicionants a l'inici de la reperfusió, en pacients diagnosticats amb infart de miocardi a la regió anterior del cor, va permetre reduir l'alliberació de creatina quinasa¹³². Per altra banda però, altres estudis amb el mateix protocol d'actuació no van concloure amb una reducció de l'alliberació de troponina T¹³³ o de la mida de l'infart⁹⁴.

3. ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES FARMACOLÒGIQUES ENFRONT EL DANY PER ISQUÈMIA-REPERFUSIÓ.

El coneixement adquirit sobre els mecanismes moleculars i cel·lulars responsables del dany per isquèmia-reperfusió i de la cardioprotecció endògena ha permès identificar noves dianes terapèutiques d'utilitat per tal de reduir la mort cel·lular que es produeix durant l'infart de miocardi. A continuació es detallen tan sols aquelles estratègies que han pogut ser testades, per la seva aplicabilitat, en pacients amb SCAEST. Altres estratègies com la modulació de la recuperació del pH intracel·lular durant la reperfusió^{25,134,135}, la del reticle sarcoplasmàtic¹³⁶, els inhibidors contràctils^{137,138}, i de les proteases^{20,139}, i els bloquejants de les "gap junctions"^{34,35}, han mostrat ser eficaces en estudis experimentals, però no han estat testades o difícilment ho seran en pacients.

3.a. Modulació del pH intracel·lular i de la sobrecàrrega de calci citosòlica durant la reperfusió.

La sobrecàrrega de calci que ocorre a l'inici de la reperfusió té diferents orígens. Els més importants, però, involucren els canals de calci de tipus L (LTCC), els intercanviadors NHE i NCX, la bomba SERCA del reticle sarcoplasmàtic i l'activitat del RYR, així com altres com el fosfolamban i el transportador mitocondrial de calci (MCU)¹⁴⁰.

3.a.1. Inhibició dels LTCC.

En relació als LTCC, la seva inhibició amb diltiazem va reduir l'aturdiment miocàrdic i la mida de l'infart de miocàrdic en gossos i porcs sotmesos a oclusió coronària transitòria, tant si la seva administració era prèvia com posterior al període d'isquèmia^{141,142}. Per altre banda, el magnesi, que posseeix propietats inhibidores dels LTCC, quan s'administra en el moment de la reperfusió, també redueix la mida de l'infart, tal i com s'ha demostrat en diferents espècies animals¹⁴³⁻¹⁴⁶. Tanmateix, l'efectivitat descrita pels tractaments amb sulfat de magnesi podrien estar relacionats amb els seus efectes sobre la producció de ROS^{147,148}.

A nivell clínic, s'han realitzat pocs estudis amb inhibidors dels LTCC en pacients amb infart agut de miocardi. Així, l'administració intracoronària, a l'inici de la reperfusió, de nisoldipina (n=36)¹⁴⁹ i l'administració intravenosa de diltiazem (n=90), prèvia a la reperfusió mitjançant trombòlisi¹⁵⁰, va millorar la funció del ventricle esquerre i va reduir el pic de creatina quinasa, efectes associats amb una reducció de la mida de l'infart. Tot i així, l'estudi DATA (n=59) no va confirmar la disminució dels marcadors cardíacs, utilitzant també una solució intravenosa de diltiazem, administrada simultàniament amb la trombòlisi en pacients amb SCAEST¹⁵¹.

L'aplicació del magnesi a nivell de la pràctica clínica ha donat lloc a resultats discordants. L'estudi LIMIT-2 (n=2316) va demostrar que l'administració de MgSO₄ prèvia a la reperfusió, reduïa la mortalitat als 28 dies, tot i mostrar una alliberació d'enzims cardíacs similar a la del grup tractat amb placebo¹⁵². No obstant, els estudis ISIS-4 (n=58050)¹⁵³ i MAGIC (n=6213)¹⁵⁴ no van observar cap benefici en la taxa de mortalitat en els pacients tractats amb magnesi, i a més a més, van denotar un augment en la incidència d'hipotensió i de insuficiència cardíaca¹⁵⁵.

3.a.2. Inhibició del NHE.

La utilització d'inhibidors de l'intercanviador NHE tals com l'amilorida (primer inhibidor descrit), la zoniporida, i altres més selectius com la cariporida (HOE 642) i l'eniporida¹⁵⁶, permet retardar la normalització del pH durant la reperfusió, disminuint també la sobrecàrrega intracel·lular de Na⁺ i Ca⁺ i les conseqüències posteriors. Tot i així, la cardioprotecció exercida per aquests inhibidors sembla ser que tan sols s'obté quan l'administració és prèvia al període d'isquèmia^{157,158}. De fet, l'ús de cariporida pot tenir un cert efecte anti-isquèmic, ja que la seva administració abans de la isquèmia va permetre retardar l'aparició del rigor i reduir la mida de l'infart en cors aïllats de rata, efectes possiblement relacionats amb una preservació del gradient de protons mitocondrial i dels nivells cel·lulars d'ATP, degut a una possible inhibició del NHE mitocondrial¹⁵⁹.

En vista dels resultats positius obtinguts en diferents models experimentals, alguns investigadors van prendre la decisió de testar la utilitat dels inhibidors del NHE en pacients amb infart agut de miocardi. Un dels primers treballs va ser un petit estudi multicèntric (n=100) que va mostrar que l'administració de cariporida abans de la reperfusió augmentava la fracció d'ejecció, millorava alguns índexs de funció cardíaca, i reduïa l'alliberament d'enzims cardíacs (CK, CK-MB, i LDH) en pacients amb infart agut de miocardi sotmesos a reperfusió coronària mitjançant angioplàstia ¹⁶⁰. Aquests bons resultats, van promoure altres assajos clínics incloent un major nombre de pacients. El major d'ells, l'estudi GUARDIAN (n=11.590) va resultar neutre, no observant-se canvis en la incidència de mort o d'infart de miocardi als 36 dies de seguiment, en pacients amb angina inestable, infart de miocardi sense elevació del segment ST, o pacients d'alt risc, sotmesos a revascularització percutània o quirúrgica, tractats, entre 15 minuts i 12 hores abans d'aquesta, amb placebo o tres dosis diferents de cariporida ¹⁶¹. Ara bé, en aquest assaig, el subgrup de pacients sotmesos a cirurgia de revascularització coronària (CABG) i tractats amb la concentració més alta del fàrmac (120 mg) va mostrar una reducció significativa del risc relatiu de mort o infart ¹⁶¹. Desafortunadament, l'estudi l'EXPEDITION (n=5.761), realitzat en pacients sotmesos a cirurgia CABG, va mostrar un augment en la mortalitat, associat a un increment en la incidència d'esdeveniments cerebrovasculars, en el grup tractat amb cariporida, tot i que el tractament va reduir la incidència d'infart de miocardi ¹⁶². La utilització d'altres inhibidors del NHE, com l'eniporida, testada en l'estudi ESCAMI (n=1.389), no va limitar la mida de l'infart ni millorar les variables clíniques, quan s'administrava durant la reperfusió, en pacients amb infart de miocardi amb elevació del segment ST sotmesos a fibrinòlisi o angioplàstia primària, tot i que si que es va comprovar que el tractament, a nivell farmacològic, era segur ¹⁶³.

En conjunt, les diferències d'efectivitat observades en els diferents assaigs clínics, semblen estar relacionades amb la pauta temporal d'administració, observant-se eficàcia si l'inhibidor s'administrava abans de la isquèmia, fet que ja s'havia posat de manifest en els models experimentals ^{158,164}.

3.a.3. Inhibició del NCX.

La inhibició de l'intercanviador NCX ha estat un dels abordatges més estudiats per tal de reduir la sobrecàrrega citosòlica de calci que es produeix a l'inici de la reperfusió. Així, la utilització d'inhibidors selectius, com el KB-R7943, que inhibeix el mode revers de l'intercanviador durant la reperfusió, va permetre reduir la mida de l'infart, la taxa d'hipercontractura cel·lular i les oscil·lacions de calci en cardiomiòcits aïllats, cors aïllats de rata i en el model de cor porcí in situ ¹⁶⁵⁻¹⁶⁸. Altres estudis van demostrar l'eficàcia de la inhibició de l'intercanviador NCX enfront l'aparició d'arrítmies, tant en cors aïllats de conill amb administració prèvia a la isquèmia de KB-R7943 ¹⁶⁶, com amb altres inhibidors, com SEA-0400, donat abans i després de la oclusió, en el mateix

model animal ¹⁶⁹, o com CGP-37157 administrat prèviament a la isquèmia en un model de cor porcí in situ ¹⁷⁰.

Desafortunadament, els estudis clínics relacionats amb la inhibició del NCX no han donat lloc a resultats positius, en part degut a la manca de fàrmacs apropiats per a ser utilitzats en pacients. L'assaig CASTEMI (n=387) va testar l'administració del caldaret, un modulador del calci cardíac que inhibeix la forma reversa de l'intercanviador NCX i possiblement l'entrada de calci al reticle sarcoplasmàtic. L'administració de caldaret, prèvia a l'obertura de l'artèria mitjançant angioplàstia primària, no va mostrar cap eficàcia enfront a la mida de l'infart ni va millorar la fracció d'ejecció ¹⁷¹. Posteriorment, l'estudi EVOLVE (n=141) amb les mateixes condicions d'estudi, i utilitzant el mateix fàrmac, va confirmar la falta d'eficàcia del mateix per tal de reduir la mida de l'infart i de millorar la funció del ventricle esquerre ¹⁷².

3.b. Inhibidors del mPTP.

Tenint en compte el paper fonamental del mPTP en el dany per isquèmia-reperfusió, diferents estudis han centrat el seu interès en trobar agents farmacològics per tal d'evitar la seva obertura i la conseqüent mort cel·lular.

La ciclosporina A va ser un dels primers inhibidors del porus de transició mitocondrial descrits. Es tracta d'un pèptid lipofílic cíclic, d'origen fúngic, actualment utilitzat a la clínica com a immunosupressor per a reduir el risc de rebuig posterior a un transplantament d'un òrgan ¹⁷³. La CsA té una alta afinitat per les ciclofilines, proteïnes amb activitat enzimàtica peptidil-prolil isomerasa, la qual és essencial pel bon plegament de les proteïnes in vivo. La seva activitat immunosupressora és deu a la unió entre CsA i ciclofilina A, inhibint la calcineurina, una fosfatasa dependent de calci i calmodulina que regula la resposta immunitària ¹⁷⁴. L'actuació de la CsA sobre la inhibició de l'obertura del mPTP està relacionada amb la seva interacció amb la Cyp D, una isoforma mitocondrial. Segons el que s'ha esmentat en capítols anteriors, la Cyp D podria modular la funcionalitat del mPTP ¹⁷⁵.

El primer estudi que va demostrar un efecte cardioprotector de la CsA enfront del dany per isquèmia-reperfusió es va realitzar en cardiomiòcits aïllats de rata sotmesos a un episodi d'isquèmia-reperfusió simulada. En aquest estudi es va observar una reducció en la mort cel·lular quan les cèl·lules eren tractades amb una concentració d'entre 200 i 400 nM de CsA ¹⁷⁶. A nivell in vivo, el primer estudi es va realitzar en un model d'oclusió d'una artèria coronària en rata, el qual va permetre demostrar que el pretractament amb CsA reduïa la incidència d'arrítmies ventriculars, efecte associat amb una disminució en els nivells plasmàtics de lactat deshidrogenasa i creatina quinasa, tot indicant una millora en la supervivència cel·lular ¹⁷⁷. Altres estudis van observar una millora en la funció ventricular postisquèmia i un augment en el contingut d'ATP en un model de cor aïllat de rata ¹⁷⁸.

Donat que en els pacients amb SCAEST no és possible realitzar cap pretractament, l'ideal és administrar qualsevol droga, incloent la CsA, en el moment de la reperfusió. De fet, és en els primers minuts d'aquesta quan es produeix l'obertura del mPTP. Així, estudis subsegüents van administrar la CsA durant els minuts inicials de la restauració del flux. Aquests treballs van demostrar que l'administració de CsA a l'inici de la reperfusió redueix la mida de l'infart en cors aïllats de rata¹⁷⁹, conill¹⁸⁰, ratolí¹⁸¹ i porc¹⁸².

Al mateix temps, s'ha demostrat que la inhibició del mPTP en mostres de teixit humà és també eficaç. D'aquesta manera, mostres de teixit auricular de pacients que havien estat sotmesos a cirurgia de bypass coronari, tractades amb CsA, van tenir menys necrosi que les mostres control, després de períodes d'isquèmia-reperfusió simulada^{183,184}.

Un altre fàrmac efectiu per a reduir l'obertura del mPTP és la sangliferina A (SfA), una droga que també inhibeix la Cyp D mitocondrial sense afectar l'activitat de la calcineurina. L'administració de SfA a l'inici de la reperfusió va ser capaç de reduir la mida de l'infart en cors aïllats de rata sotmesos a isquèmia transitòria¹⁸⁴. Aquest efecte protector però, es perd si l'administració es posposava fins els 15 minuts de la reperfusió, indicant la importància d'intervenir en els primers instants d'aquesta. L'eficàcia de la SfA també s'ha demostrat en cardiomiòcits aïllats obtinguts a partir de mostres auriculars de pacients sotmesos a cirurgia cardíaca¹⁸³.

Actualment es troben en fase d'estudi altres fàrmacs amb capacitat inhibidora de l'obertura del mPTP. És el cas de l'inhibidor TRO4303, el qual, en un model d'oclusió coronària in vivo en rata, va limitar la mida de l'infart, efecte associat amb inhibició de l'obertura del mPTP en cardiomiòcits aïllats, però no en preparacions de mitocondris aïllats¹⁸⁵. Tot i així, la seva utilització en un model clínicament més rellevant com el model d'oclusió transitòria en porc no va ser capaç de reduir de manera significativa la mida de l'infart¹⁸⁶.

L'eficàcia de la CsA ha estat testada en pacients amb SCAEST. Així, un primer assaig pilot (n=58) va demostrar que l'administració de CsA en aquests pacients reduïa la mida de l'infart quan s'administrava en el moment de la reperfusió¹⁸⁷. En el seguiment d'aquests pacients als 6 mesos, es va comprovar que la reducció de l'infart persistia i, a més a més, existia una menor progressió cap a remodelat advers del ventricle esquerre¹⁸⁸. Malauradament, un estudi multicèntric randomitzat posterior, de fase II, l'assaig CYCLE (n=410), no va poder demostrar canvis en la fracció d'ejecció ni en la mida de l'infart, determinada pels nivells de troponina T i la resolució del segment ST, en pacients amb infart tractats de forma intravenosa amb CsA en el moment de la reperfusió¹⁸⁹. De forma similar, l'estudi multicèntric CIRCUS (n=970), que va analitzar els efectes de l'administració intravenosa de CsA en pacients amb SCAEST sotmesos a

intervenció percutània tampoc va poder demostrar una reducció en la variable combinada de mort, rehospitalització per insuficiència cardíaca o remodelat advers del ventricle esquerre a l'any de seguiment ¹⁹⁰. Per altre banda, en l'assaig clínic MITOCARE (n=163), l'administració de TRO4303 per via intravenosa, abans de realitzar el cateterisme percutani, no va ser capaç de reduir la mida de l'infart o produir una millorar en la funció cardíaca ¹⁹¹. La falta d'eficàcia del tractament en els darrers treballs, comparada amb la que tenia en els estudis experimentals i la que va tenir en el primer estudi clínic, pot ser deguda a la inclusió de pacients amb infarts previs, al fet que la taxa d'aspiració de trombus en aquests darrers estudis fou superior a la de l'estudi pilot, o bé a que la CsA utilitzada estava diluïda en un vehicle lipídic que podia afectar a la funcionalitat del mPTP i la respiració mitocondrial ^{192,193}.

3.c. Modulació de cascades citosòliques de cardioprotecció.

Des del descobriment de les maniobres de condicionament isquèmic ⁹⁹ se sap que al cardiomiòcit existeixen una sèrie de mecanismes endògens de cardioprotecció, que consisteixen en l'activació seqüencial d'una sèrie de quinases citosòliques, que són les responsables d'activar els efectors finals responsables de la protecció. Entre aquestes vies destaquen les cascades RISK o bé la GMPc/PKG (**Fig. 4**). Totes elles poden ser activades de forma exògena mitjançant diferents fàrmacs, tant de forma dependent, com independent de receptors.

3.c.1. Via RISK.

La via RISK pot ser activada de forma dependent de receptors de membrana, a través de la seva interacció amb agonistes específics. Aquests inclouen l'adenosina i altres agonistes del seu receptor, la bradiquina, els opioïdes i la insulina⁶⁶. Així, diferents estudis han demostrat el paper cardioprotector de l'adenosina, administrada a l'inici de la reperfusió, tot reduint la mida de l'infart, tant en models de cor aïllat de rata sotmesos a isquèmia-reperfusió ¹⁹⁴, com en models d'oclusió coronària transitòria in vivo en conills ¹⁹⁵. Per altra banda, la bradiquina, administrada després de la isquèmia, també va ser capaç de reduir la mida de l'infart en models de cor aïllat de ratolí ¹⁹⁶. Respecte als opioïdes, també han demostrat la seva eficàcia en la reducció de l'infart quan eren administrats intravenosament, prèviament a la reperfusió, en un model d'oclusió coronària in vivo en rata ¹⁹⁷. Finalment, l'efecte cardioprotector de la insulina ha estat demostrat en cardiomiòcits neonatals de rata tractats durant el període de reoxigenació ¹⁹⁸, així com en models de cor aïllat de rata sotmesos a isquèmia-reperfusió ¹⁹⁹, i en models d'isquèmia transitòria in vivo en rata ²⁰⁰, on la seva administració a l'inici de la reperfusió va ser capaç de reduir la mort cel·lular.

Diferents assajos clínics han testat l'efecte de l'adenosina intravenosa en pacients amb infart agut de miocardi. Així, l'estudi AMISTAD (n=236) va investigar els efectes a llarg termini de la infusió intravenosa d'adenosina, juntament amb lidocaïna, en pacients

amb infart de miocardi que eren sotmesos a tractament trombolític ²⁰¹. En aquest estudi, tot i que no va haver benefici en las variables clíniques, es va observar una reducció significativa en la mida de l'infart, especialment en aquells pacients amb infart en la regió anterior. De forma similar, en un estudi en 54 pacients, l'administració intracoronària d'un bolus d'adenosina va reduir la incidència de "no-reflow" i va millorar la funció cardíaca, efectes associats amb disminucions en la mortalitat i millora en les variables clíniques ²⁰². Estudis posteriors però, tals com l'ADMIRE (n=311) ²⁰³, l'ATTACC (n=608) ²⁰⁴ i l'AMISTAD-II (n=2118) ²⁰⁵, no van ser capaços de confirmar l'efecte beneficiós de l'adenosina, ni sobre els nivells d'enzims cardíacs alliberats, ni sobre la funció cardíaca o sobre altres criteris clínics. Tan sols l'estudi AMISTAD-II, va suggerir un efecte positiu en pacients amb infart de miocardi en la regió anterior a la dosi major emprada. Malauradament, l'estudi més recent PROMISE (n=201), amb administració intracoronària d'adenosina, tampoc va ser capaç de demostrar una reducció en la mida de l'infart en el global de pacients, encara que si va poder-se observar benefici en un subgrup preespecificat de pacients en els que la durada de la isquèmia havia estat inferior a 200 minuts ²⁰⁶. A dia d'avui, i a la vista de la controvèrsia existent, l'adenosina no s'utilitza de forma rutinària en la pràctica clínica per a reduir la mida de l'infart.

Per altre banda, la via RISK pot ser activada de forma independent de receptor. Les estatines, fàrmacs comunament utilitzats per a reduir la concentració de colesterol en sang, han demostrat exercir un efecte cardioprotector quan són administrades durant la reperfusió ²⁰⁷. Aquest efecte, ha estat relacionat amb activació de la via PI3K-Akt (RISK) i amb fosforilació d'eNOS (enzim que sintetitza NO, isoforma endotelial) ²⁰⁸.

A la pràctica clínica, l'efecte beneficiós de les estatines ha estat testat en varis assajos clínics amb resultants contradictoris en funció de la dosis i l'estatina triada. En l'estudi ARMYDA (n=153) el pretractament amb atorvastatina en pacients amb síndrome coronari agut sotmesos a intervencionisme coronari va reduir el dany miocàrdic, mesurat com a alliberació de creatina quinasa ²⁰⁹. De forma similar, en l'estudi NAPLES-II (n=668) també es va observar que el pretractament amb atorvastatina reduïa la incidència d'infart després del procediment percutani, amb reducció en els nivells de creatina quinasa ²¹⁰. Paral·lelament l'estudi ARMYDA-ACS (n=171) (Patti et al., 2007) va demostrar que inclús el tractament a curt termini amb atorvastatina millorava les variables clíniques i reduïa l'alliberació de CK i troponina I en pacients amb síndrome coronari agut. Altres estudis però, no van ser capaços de confirmar l'efecte beneficiós del tractament amb atorvastatina, sense que existissin diferències en l'alliberació de CK ni de troponina I ²¹¹.

L'efecte les estatines sobre el dany per isquèmia-reperfusió ha estat extensament investigat en múltiples assajos clínics, però l'ús generalitzat d'aquesta família de fàrmacs en el tractament de pacients amb patologia cardiovascular fa difícil la

interpretació dels resultats dels estudis en els que el fàrmac s'ha utilitzat com a tractament per a reduir el dany miocardi postinfart ²¹².

3.c.2. Via GMPC/PKG.

La tercera via que intervé en algunes estratègies de cardioprotecció, i que pot ser modulada farmacològicament, és la via GMPC/PKG (**Fig. 4**). A efectes generals, s'ha demostrat la implicació d'aquesta via en la recuperació del pH intracel·lular i la contractilitat durant la reperfusió, en les oscil·lacions del calci intracel·lular i en la modulació de l'activitat del mPTP ²¹³. El GMPC és el derivat cíclic del nucleòtid trifosfat GTP, que pot ser sintetitzat, al cardiomiòcit, tant per la guanilat ciclasa soluble (sGC), com per la particulada o unida a membrana (pGC). L'activitat de la sGC requereix la presència d'òxid nítric(NO)endogen, sintetitzat per la sintasa d'òxid nítric (NOS). Per altre banda, la pGC és un enzim estructural de la membrana plasmàtica que s'activa en presència dels pèptids natriurètics ANP (pèptid natriurètic atrial) i BNP (pèptid natriurètic cerebral) ²¹⁴. Les dos vies de síntesi de GMPC, convergeixen en l'activació posterior de la PKG que serà la responsable d'actuar sobre els efectors finals de la cardioprotecció. La regulació de la via es basa en la modulació de la síntesi de GMPC, o bé de la seva degradació via l'activitat hidrolítica de les fosfodiesterases (PDE) ^{213,214}.

De forma experimental, una aproximació per tal d'estimular aquesta via ha estat promovent l'activació de la guanilat ciclasa soluble mitjançant l'administració indirecta de NO. Així doncs, s'ha demostrat que l'administració de L-arginina (el substrat que utilitza la NOS), provoca una reducció de la mida de l'infart en un model d'oclusió coronària transitòria en porcs ²¹⁵. Efectes similars s'han descrit amb la utilització de nitrats o nitrits, els quals generen NO, en un model murí d'oclusió transitòria ^{216,217}.

Una altre temptativa és actuar sobre la pGC, mitjançant l'administració de pèptids natriurètics. L'administració de BNP, iniciada 5 minuts després del període d'isquèmia, en un model d'oclusió transitòria en rata, va ser capaç de reduir la mida de l'infart ²¹⁸. Per altra banda, en un model porcí d'oclusió coronària transitòria, l'administració a l'inici de la reperfusió d'urodilatina, un pèptid natriurètic, va reduir la mida de l'infart ^{218,219}.

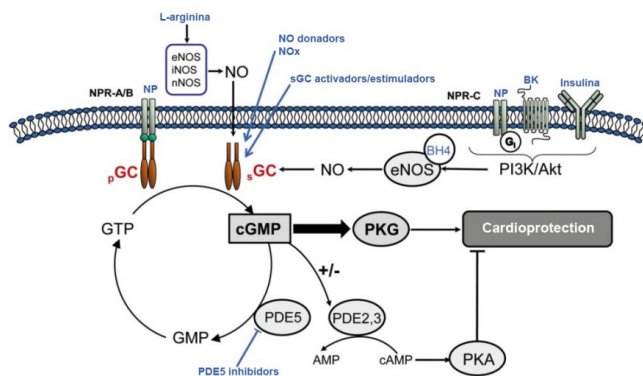


Fig. 4 – Representació de la via GMPC/PKG. El GMPC es sintetitza per l'activació de les vies NO/sGC i la NP/pGC. En blau es detallen algunes estratègies farmacològiques per estimular la via. Figura modificada de ²¹³.

En l'entorn clínic, l'administració intravenosa o intracoronària de pèptids natriurètics en el moment de l'angioplastia primària, ha permès millorar la funció cardíaca postinfart al mes de la intervenció ²²⁰ i als sis mesos ²²¹, efectes associats amb reducció del remodelat advers del ventricle esquerre i de la incidència d'arrítmies ventriculars. Gràcies a aquests resultats prometedors inicials, es va dur a terme l'estudi multicèntric J-WIND-ANP (n=1216), el qual va testar l'eficàcia de l'administració intravenosa d'ANP en pacients amb infart agut de miocardi sotmesos a teràpia de reperfusió. En aquest estudi, el tractament amb ANP va promoure una menor alliberació de CK i un increment en la fracció d'ejecció del ventricle esquerre ²²². Són necessaris nous estudis amb un major volum de pacients per tal de confirmar l'efecte beneficiós dels pèptids natriurètics.

3.d. Modulació del metabolisme cardíac.

El cor té la capacitat de metabolitzar diferents tipus de substrats, incloent glucosa i àcids grassos. El metabolisme de la glucosa, per la via de la glicòlisis, produeix 38 molècules d'ATP per mol de substrat. Per contra, la degradació d'àcids grassos produeix més energia (129 molècules d'ATP/ per mol de substrat), però amb un major consum d'oxigen ²²³. En condicions normals, el substrat d'elecció del cor són els àcids grassos circulants. Ara bé, en condicions isquèmiques, desplaçar el metabolisme cardíac cap al consum de glucosa podria ser beneficiós, degut a la menor disponibilitat d'oxigen existent durant aquesta fase, per tal de perllongar la síntesis d'ATP i reduir el dany per isquèmia-reperfusió.

Entre les principals estratègies per a redirigir el metabolisme del miocardi cap al consum de glucosa destaquen l'administració de la solució GIK (glucosa-insulina-potassi) i l'administració d'agonistes del receptor del pèptid GLP-1 (pèptid similar al glucagó tipus 1).

3.d.1. GIK.

A principis del segle XXI van aparèixer els primers estudis que relacionaven l'administració de glucosa i insulina, de manera separada o conjunta, amb efectes beneficiosos sobre la funció cardíaca i la incidència d'arrítmies en diferents patologies ²²⁴. Tot i així, no va ser fins al 1962, quan Sodi-Pallarés i col·laboradors van demostrar que la utilització d'una solució que combinava glucosa, insulina i potassi millorava els signes electrocardiogràfics en pacients amb infart de miocardi ²²⁵. De fet, la solució GIK, administrada en pacients amb infart agut de miocardi, va mostrar-se útil per a reduir la incidència d'arrítmies durant el període d'isquèmia i va permetre augmentar la fosforilació oxidativa en el teixit isquèmic ²²⁶. Aquests efectes electrofisiològics es van atribuir amb l'entrada de potassi en els cardiomiòcits, i a que la insulina promovia la captació i el consum preferent de glucosa per part de la cèl·lula ^{227,228}.

Estudis posteriors en un model caní d'oclusió coronària permanent van permetre demostrar que l'administració de GIK, començada 30 minuts després de l'inici de la isquèmia, reduïa l'extensió de l'àrea necròtica²²⁹. Per altre banda, altres estudis van observar que la interferència metabòlica mitjançant l'administració d'una solució de glucosa-insulina en un model d'oclusió coronària en conill reduïa la taxa d'hipercontractura²³⁰. Les accions protectores de la solució GIK, s'han associat amb una reducció dels nivells d'àcids grassos lliures en plasma²³¹, amb una millora de l'estat energètic del miocardi²³², i amb un augment en la taxa de glicòlisi i de l'ús de la glucosa com a metabòlit d'elecció²³³, suggerint, per tant, un desplaçament en el metabolisme energètic cardíac. Tot i així, els mecanismes protectors no estan del tot clars. A més a més, han sorgit estudis contradictoris, en els quals l'administració de GIK no va ser capaç de reduir la mida de l'infart, com en un estudi en un model d'oclusió coronària transitòria in vivo en conill²³⁴. Aquesta disparitat entre els resultats dels diferents estudis pot venir donada per les diferents concentracions d'insulina utilitzades, pel moment d'administració de la solució i per la via d'infusió escollida, tot dificultant la correcta interpretació dels resultats²³⁵.

Certs autors han postulat que la insulina seria la principal responsable de la protecció exercida per la solució GIK^{200,236}. En aquesta línia, en un model de cor aïllat de rata sotmès a isquèmia transitòria, l'administració únicament d'insulina en el moment de la reperfusió va permetre reduir de manera significativa la mida de l'infart¹⁹⁹. Efectes similars s'han demostrat en altres models animals d'isquèmia miocàrdica i reperfusió, com els de cor in situ de gos i conill^{237,238}. L'efecte protector de la insulina pot explicar-se, a més a més de pels efectes metabòlics descrits anteriorment, per la seva capacitat d'activar diferents cascades citosòliques de cardioprotecció, al interactuar amb els seus receptors. Així, s'ha descrit que la insulina activa la via RISK, ja que la unió amb el seu receptor de membrana promou la seva activitat tirosina quinasa, conduint a l'activació de la via PI3K/Akt²³⁹. Aquest efecte dual de la GIK s'ha confirmat en un estudi més recent en porcs, en el que l'efecte beneficiós de la solució de GIK front l'infart de miocardi s'ha associat tant amb modulació del metabolisme energètic cardíac, estudiat mitjançant ressonància magnètica nuclear, com amb l'activació de la via RISK, amb una major fosforilació d'Akt i d'eNOS¹²⁰.

A nivell clínic, el tractament amb GIK ha estat objecte de diferents assajos en pacients amb infart agut de miocardi sotmesos a revascularització coronària. L'estudi ECLA (n=407) va demostrar una reducció en la mortalitat dels pacients sotmesos a una infusió de GIK durant les 10 hores posteriors als símptomes cardíacs²⁴⁰. Tot i així, la revascularització coronària tan sols va ser possible en el 60% dels pacients, sent més freqüent en el subgrup que rebia GIK, fet que podria haver afectat la correcta interpretació dels resultats. Per contra, l'estudi Pol-GIK (n=954)²⁴¹, no va trobar diferències en la mortalitat ni en la incidència d'esdeveniments cardíacs. De manera similar, els estudis GIPS (n=940)²⁴² i REVIVAL (n=312)²⁴³ tampoc van poder demostrar

la suposada eficàcia protectora del tractament amb GIK. Posteriorment, en un metanàlisi realitzat en 4992 pacients, es va poder detectar una reducció en la mortalitat hospitalària, quan la teràpia amb GIK era administrada en altes dosis a l'inici de la reperfusió. Decebedorament, en el posterior assaig GIPS-II (n=889) ²⁴⁴, l'administració de GIK no va ser capaç de reduir la mortalitat ni l'alliberació d'enzims cardíacs, en pacients sense símptomes d'insuficiència cardíaca, igual que va passar en l'estudi CREATE-ECLA, que incloïa un major nombre de pacients (n=20.201) ²⁴⁵.

Tot i els resultats negatius de molts dels assajos previs, el més recent estudi IMMEDIATE (n=871) va incorporar diferències qualitatives en la pauta i en el temps d'administració del tractament amb GIK que poden ser importants per la seva eficàcia ²⁴⁶. En aquest assaig, els pacients sospitosos de patir un infart de miocardi van rebre la solució de GIK durant el trasllat amb ambulància i fins arribar a l'hospital, reduint-se així el retard temporal en l'aplicació del tractament. Amb aquest protocol, el tractament amb GIK sí va ser eficaç, reduint de manera significativa la variable composta mortalitat hospitalària i parada cardíaca. A més a més, en un subgrup de pacients on es va poder quantificar la mida de l'infart, aquesta va ser inferior en el grup tractat amb GIK ²⁴⁷. Malgrat tot, la teràpia amb GIK segueix sent controvertida i no és utilitzada de forma habitual a la pràctica clínica.

3.d.2. GLP-1.

Una altra molècula candidata per a reduir el dany per reperfusió, tot modulant el metabolisme miocàrdic, és el GLP-1. Aquesta molècula, és una hormona de tipus incretina, alliberada al torrent sanguini per les cèl·lules L de l'intestí prim i gruixut en resposta a la ingesta alimentària ²⁴⁸. Degut a les seves accions insulino-mimètiques, insulino-tròpiques i glucagonostàtiques intervé en l'augment de la glucèmia postprandial, estimulant l'alliberació d'insulina dependent de glucosa i inhibint la secreció de glucagó ²⁴⁹. Així doncs, es tracta d'una hormona que participa en el manteniment de l'homeòstasi de la glucosa en l'organisme.

L'ús d'agonistes del receptor de GLP-1 es va centrar, inicialment, en el tractament de la diabetis mellitus tipus 2 ²⁵⁰. Tot i així, i malgrat una certa controvèrsia inicial, sembla que, a nivell cardíac, els agonistes de GLP-1 tenen efectes directes sobre el cor, relacionats amb la presència del seu receptor (GLP-1R), tant en les quatre cavitats cardíques, com en la vasculatura circumdant ²⁵¹. La seva activitat a nivell cardíac ha estat relacionada amb el control de la freqüència cardíaca, la millora de l'eficiència energètica durant la isquèmia i l'activació de vies citosòliques de cardioprotecció, entre les quals destaquen la via PI3K/Akt, juntament amb la cascada de senyalització del GMPc ^{252,253}.

L'efecte del GLP-1 sobre el dany per isquèmia-reperfusió ha estat testat en diferents models animals. Així, en cors aïllats de rata sotmesos a protocols d'isquèmia-

reperfusió, l'administració de GLP-1 prèvia a la isquèmia va millorar la funció cardíaca i l'absorció de glucosa durant la reperfusió posterior ²⁵⁴, efectes associats amb una reducció en la mida de l'infart ^{255,256}. Altres estudis també van demostrar un efecte beneficiós sobre l'aturdiment miocàrdic en un model clínicament més rellevant com és el d'oclusió coronària transitòria in vivo en gossos ²⁵⁷.

Tot i els bons resultats, cal remarcar que el GLP-1 és un pèptid amb una vida mitja curta, inferior a 2 minuts, ja que es degradat de manera natural per l'enzim dipeptidil-peptidasa 4 (DPP-4) ²⁵³. Per a solucionar aquest problema, s'han desenvolupat una sèrie d'agonistes del receptor GLP-1R més resistents a la degradació per DPP-4. L'administració d'aquests agonistes en models animals d'infart de miocardi ha donat lloc a resultats positius en quan a millorar la funció cardíaca postisquèmia, la captació de glucosa i en reduir la mida de l'infart. Així, l'albiglutida, administrada de manera prèvia a la isquèmia en un model d'oclusió coronària transitòria in vivo en rata, va reduir la mida de l'infart, efecte associat amb una millora de la funció cardíaca i dels paràmetres energètics ²⁵⁸. Per altra banda, l'administració d'exenatida en el moment de la reperfusió en un model porcí d'oclusió coronària transitòria va ser capaç de reduir la mida de l'infart ^{120,259} i de millorar la funció cardíaca postisquèmica ²⁵⁹. L'efecte beneficiós de l'exenatida en el model porcí s'ha associat amb la modulació del metabolisme energètic cardíac, fet demostrat amb estudis de ressonància magnètica nuclear ¹²⁰. A més a més, l'efectivitat dels agonistes de GLP-1 s'estén més enllà de la fase aguda de l'infart. D'aquesta manera, l'administració, dos dies després de l'infart, d'exendina-4, en un model d'oclusió coronària in vivo en ratolí, va reduir la fibrosis i el remodelat postinfart a les dues setmanes ²⁶⁰. Aquest efecte antifibròtic dels agonistes del receptor del GLP-1 s'ha relacionat amb un augment dels nivells d'AMPc en els teixits miocàrdics de ratolí després de l'infart ²⁶¹.

A nivell clínic, la infusió intravenosa d'exenatida durant la reperfusió va ser capaç de reduir la mida de l'infart en pacients amb infart agut de miocardi (n=172) sotmesos a angioplàstia primària ²⁶²⁻²⁶⁴. De forma similar, l'administració d'aquest mateix agonista dels receptors GLP-1, tant per via subcutània com intravenosa, també va ser efectiva reduint la mida de l'infart i millorant la funció del ventricle esquerre en el mateix tipus de pacients ²⁶⁵. Per contra, l'estudi EXAMI (n=39), tot i confirmar que l'administració intravenosa d'exenatida era farmacològicament segura, tants sols va poder observar una tendència no significativa a la reducció de la mida de l'infart en pacients sotmesos a revascularització coronària percutània ⁵⁶. De la mateixa manera, un estudi recent, incloent 191 pacients amb infart de miocardi sotmesos a intervenció percutània, en els que l'exenatida era administrada prèviament a la intervenció, tampoc va poder demostrar una disminució significativa de la mida de l'infart ²⁶⁶. Degut a aquests resultats contradictoris, la teràpia amb agonistes GLP-1 no ha estat inclosa, de moment, com coadjuvant a la de reperfusió en la pràctica clínica habitual.

3.e. Metoprolol.

Una altre alternativa farmacològica amb efectes positius sobre el dany per isquèmia-reperfusió ha estat el beta-bloquejant metoprolol. Així, recentment s'ha demostrat que l'administració intravenosa de metoprolol, prèvia al moment de la reperfusió, en un model porcí d'oclusió coronària transitòria, és capaç de reduir de manera significativa la mida de l'infart ²⁶⁷. Els mecanismes d'acció d'aquest fàrmac estan sent investigats i semblen que s'estenen més enllà dels seus efectes sobre les variables hemodinàmiques i el consum d'oxigen del miocardi ^{268,269}. De fet, en un estudi recent, s'ha suggerit que l'efecte protector del metoprolol sobre la mida de l'infart pot ser degut a les seves accions sobre els neutròfils, inhibint la seva migració i la seva interacció amb les plaquetes ²⁷⁰. En estreta relació, l'assaig clínic METOCARD-CNIC (n=270) va demostrar que l'administració intravenosa de metoprolol, realitzada durant el trasllat en ambulància, en pacients amb símptomes d'infart de miocardi de menys de 6 hores d'evolució sotmesos a angioplàstia primària, permetia reduir la mida de l'infart, quantificat per ressonància magnètica nuclear, i la progressió cap a remodelat ventricular advers, efectes associats amb preservació de la funció del ventricle esquerre i disminució de la taxa de rehospitalització per insuficiència cardíaca ^{271,272}. Desafortunadament, en l'estudi clínic més recent EARLY-BAMI (n=683) el tractament amb metoprolol intravenós no es va poder associar amb una reducció en la mida de l'infart, encara que sí amb una disminució en la incidència d'arítmies malignes durant la fase aguda, en una cohort menys restrictiva de pacients, en la que s'inclouïen malalts fins a 12 hores després de l'inici de la simptomatologia ²⁷³. A la vista d'aquesta discrepància, són necessaris nous estudis aleatoritzats per tal de confirmar o desmentir l'eficàcia del metoprolol. De fet, l'assaig clínic de fase 3 MOVE ON!, que es troba en període de reclutament, investigarà els efectes del tractament sobre la mortalitat i la taxa d'insuficiència cardíaca durant la hospitalització dels pacients seleccionats ²⁶⁹.

4. PAPER DELS ROS EN EL DANY PER ISQUÈMIA-REPERFUSIÓ.

Com es desprèn dels capítols anteriors, el coneixement adquirit sobre els mecanismes del dany per isquèmia-reperfusió i dels mecanismes endògens de protecció ha permès proposar diverses estratègies terapèutiques per tal de reduir la mida de l'infart. Moltes d'aquestes estratègies han donat lloc a resultats experimentals prometedors. Malgrat aquests avenços, la translació a la pràctica clínica de moltes d'aquestes teràpies ha estat descoratjadora i tan sols un petit nombre d'assajos clínics han demostrat tenir benefici en pacients amb infart agut de miocardi sotmesos a revascularització coronària. Per aquest motiu, el dany per isquèmia-reperfusió és encara avui en dia una diana orfe, i és necessari seguir investigant per descobrir noves estratègies terapèutiques capaces de millorar el pronòstic d'aquests pacients. Una d'aquestes estratègies pot ser, sens dubte, actuar sobre la producció de ROS, que s'alliberen en

grans quantitats durant els minuts inicials de la reperfusió i que juguen un paper clau en la mort cel·lular que es produeix durant aquesta fase. Entre les espècies més reactives trobem el peròxid d'hidrogen (H_2O_2), l'ió superòxid (O_2^-) i el radical hidroxil (OH \cdot). A més a més, la reacció entre l'ió superòxid i l'òxid nítric (NO) pot donar lloc a l'anió peròxinitrit (ONOO $^-$).

L'estrès oxidatiu provoca diferents efectes en l'estructura cel·lular, tals com canvis en l'estructura del DNA, i modificacions en proteïnes i lípids, juntament amb l'activació de factors de transcripció i citoquines implicades en vies pro i antiinflamatòries ²⁷⁴. A nivell del DNA una de les modificacions més comuns és la formació de 8-oxo-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), la qual pot provocar mutagènesis ²⁷⁵ o produir afectacions a nivell epigenètic, alterant la metilació dels promotors de cert gens, sobretot en les illes CpG (regions riques en citosina i guanosina) ²⁷⁶. Per altra banda, la integritat de la membrana cel·lular es veu afectada per la peroxidació lipídica, la qual produeix aldehyds insaturats, malondialdehid (MDA) ²⁷⁷ i altres metabòlits amb efectes citotòxics i mutagènics, a més a més d'alterar-se l'anclatge de receptors i enzims a la pròpia membrana ²⁷⁸. A nivell proteic, els radicals oxidants poden provocar fragmentació de les pròpies cadenes polipeptídiques, alteració de la càrrega elèctrica de les proteïnes, encreuaments de diferents proteïnes, o oxidació d'aminoàcids específics. Tot això resulta en un augment de la susceptibilitat a la proteòlisis, i la degradació de les proteïnes afectades per proteases específiques ²⁷⁹. Una de les modificacions més comuns és l'oxidació de residus de cisteïna i metionina, provocant canvis conformacionals, mal plegament de la proteïna i per tant desencadenant un mal funcionament i la seva degradació ²⁸⁰.

Un dels efectes més nocius dels ROS, però, és l'obertura del mPTP. La massiva producció de ROS que ocorre a l'inici de la reperfusió és un dels principals factors que afavoreixen, junt amb l'elevació dels nivells de calci i la ràpida recuperació del pH citosòlic, entre altres, l'obertura del porus. Com prèviament s'ha descrit, l'obertura del mPTP ha estat proposada com un dels principals mecanismes del dany cel·lular que ocorre durant un episodi d'isquèmia-reperfusió, ja que condueix a l'aparició d'edema mitocondrial, disfunció de l'òrganul, ruptura de la membrana mitocondrial externa i a la mort cel·lular ²⁸¹.

La importància dels ROS en el dany per isquèmia-reperfusió ha fet que hagin estat considerats com una diana terapèutica interessant per tal de reduir la mida de l'infart. En aquest sentit, s'han emprat, com veurem més endavant, dues estratègies diferents: promoure l'eliminació o degradació dels ROS produïts, mitjançant l'ús d'antioxidants, o bé reduir-ne la producció massiva durant els minuts inicials de la restauració del flux.

4.a. Fonts de ROS a nivell cardíac.

L'estrès oxidatiu que ocorre en una cèl·lula ve donat per un desequilibri entre la generació de ROS i un sistema de detoxificació insuficient, provocant una acumulació nociva de radicals oxidants. A nivell miocàrdic els ROS poden tenir múltiples orígens. Existeixen una sèrie de fonts no enzimàtiques, com la mioglobina i l'hemoglobina, que augmenten les seves concentracions després d'un episodi d'isquèmia-reperfusió, per la qual cosa han estat postulades com un possible mediador de l'estrès oxidatiu²⁸². Tot i així, la majoria dels estudis han atribuït l'augment de ROS que ocorre després d'un episodi d'isquèmia miocàrdic a una varietat d'enzims que són capaços de produir derivats de l'oxigen, com el superòxid i el peròxid d'hidrogen. Els enzims més estudiats per explicar la ràpida producció de ROS al miocardi reperfundit són les xantines oxidoreductases, les NADPH oxidases, la NOS, i el conjunt de reaccions que es donen en la cadena de transport mitocondrial²⁸². Aquestes darreres, com veurem més endavant, són les principals responsables de l'elevada producció de ROS durant els minuts inicials de la reperfusió.

4.a.1. Xantines oxidoreductases.

Les xantines oxidoreductases (XOR), són enzims de la via de les purines, que catabolitzen la reacció d'hidroxilació de la hipoxantina a àcid úric (**Fig. 5**). Existeixen dos isoformes interconvertibles, les xantines oxidases (XO), les quals utilitzen oxigen com a acceptor d'electrons i les xantines deshidrogenases (XDH), les quals utilitzen NAD^+ i són la forma predominant en condicions fisiològiques²⁸¹. Durant la isquèmia, i com a resultat de la degradació de l'ATP, es produeix un acúmul tissular d'hipoxantina. Durant la reperfusió, amb la recuperació dels nivells d'oxigen, les XOR actuen sobre aquest acúmul, produint xantina i àcid úric, i generant, com a subproducte de la reacció, O_2^- . Aquests radicals poden interaccionar amb altres molècules d'oxigen, produint H_2O_2 i OH^- ²⁸³, o bé amb NO, produint peroxinitrit²⁸⁴, podent estar relacionats amb efectes sobre la resposta immunitària i inflamatòria.

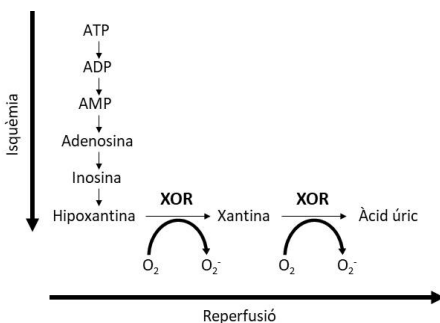


Fig. 5 – Funcionament de les XOR durant la isquèmia-reperfusió. Modificada de²⁸¹

Per tal d'estudiar la implicació dels enzims XOR en la producció de ROS després d'un episodi d'isquèmia-reperfusió s'han utilitzat diferents inhibidors com l'allopurinol i

l'oxipurinol (la seva forma activa), o el febuxostat, els quals han donat lloc a resultats contradictoris. Així doncs, trobem alguns estudis positius, en els que els inhibidors esmentats han estat capaços de reduir la mida de l'infart ²⁸⁵ o la progressió cap a insuficiència cardíaca ²⁸⁶, però també altres que no van poder demostrar una reducció significativa de la mida de l'infart ²⁸⁷. Per altra banda, l'administració crònica de febuxostat, en un model d'oclusió coronària en conill, va permetre millorar la funció ventricular quan la droga era administrada ràpidament després de l'inici de la isquèmia ²⁸⁸. A nivell clínic, i malgrat els escassos estudis en models animals, s'ha realitzat una gran varietat d'assajos clínics que van analitzar l'eficàcia de diferents inhibidors de les XOR en pacients amb infart agut de miocardi ²⁸¹. Tot i així, la conclusió d'un metanàlisis recent no ha estat favorable ²⁸⁹. Una possible explicació de la ineficàcia dels inhibidors de les XOR està relacionada amb l'administració de l'allopurinol a dosis massa altes. Aquestes drogues a concentracions elevades, en comptes d'actuar com un antioxidant, es comporten tot el contrari, promovent un estat pro-oxidatiu ²⁹⁰.

4.a.2. NADPH oxidases.

Les NADPH oxidases (NOX) també han estat extensament estudiades com a enzims productors de ROS després d'un episodi d'isquèmia-reperfusió. La família d'enzims NOXs està composta per 7 membres, Nox1-Nox5, que produeixen superòxid, i les oxidases duals Duox1 i Duox2, que juntament amb Nox4 produeixen H₂O₂ (**Fig. 6**) ²⁹¹. Les diferents isoformes presenten diferents patrons d'expressió en els teixits cardiovasculars. En particular, Nox1 s'expressa en cèl·lules endotelials, cèl·lules de múscul llis i cardiomiòcits, mentre que Nox2 també es troba present en fibroblast cardíacs i leucòcits i Nox4 s'expressa majoritàriament en cardiomiòcits ²⁹². La implicació de les NOXs en el dany oxidatiu per isquèmia-reperfusió està basat en l'augment observat de l'activitat i expressió d'aquests enzims en teixits postisquèmics ²⁹³, tot produint un augment marcat de ROS, que provocaran efectes citotòxics incloent peroxidació lipídica, obertura del mPTP i activació de la resposta inflamatòria. Per altra banda, en la fase post-reperfusió, l'activitat de les NOXs s'ha relacionat amb modulació de les vies de proliferació i diferenciació cel·lular, les quals són necessàries per la progressió cap a remodelat cardíac ^{282,294}.

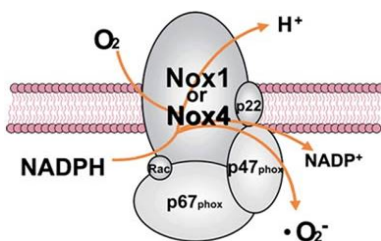


Fig. 6 – Estructura i funcionament general dels enzims NOX. Extret de ²⁹⁵.

Per tal d'estudiar el paper d'aquests enzims en el dany per isquèmia-reperfusió, s'han utilitzat inhibidors com l'apocinina, la qual interfereix amb la translocació a membrana

de certes subunitats dels propis enzims, o bé el difeniliodonium, una flavoproteïna inhibidora que afecta la capacitat que tenen les NOXs per transportar electrons²⁸². La utilització d'aquests inhibidors ha permès reduir la peroxidació lipídica i la mort cel·lular en línies cel·lulars H9c2 sotmeses a protocols d'isquèmia-reperfusió simulada^{296,297}. Tot i així, cal interpretar aquests resultats amb cautela donat que els inhibidors citats no són totalment específics i podrien tenir altres efectes^{298,299}. Per altra banda, també s'han utilitzat models murins de deleció genètica de les diferents oxidases, conduint a una reducció significativa de la mida de l'infart en cors aïllats de ratolí²⁹². A nivell cardíac, l'isoforma Nox2 sembla la més implicada en la progressió de l'infart de miocardi^{282,300,301}. Estudis recents s'han centrat en la deleció de certes subunitats d'aquesta isoforma, com per exemple la p47phox, la qual va permetre reduir la fibrosis i millorar la funció del ventricle esquerre en un model murí d'oclusió coronària^{282,293}. A part de les estratègies citades, actualment s'està investigant la creació de pèptids inhibitoris selectius per les diferents isoformes, els quals poden ser més adequats per l'ús en assajos clínics amb pacients²⁹⁴.

4.a.3. NOS.

Existeixen quatre isoformes de l'enzim NOS, la NOS neuronal (nNOS), l'endotelial (eNOS), la induïble (iNOS) i la NOS mitocondrial. Totes elles, encara que presents en diferents localitzacions cel·lulars i activades en diferents circumstàncies, catalitzen la transformació de L-arginina a L-citrulina fins a l'obtenció de NO (**Fig. 7**)³⁰². L'òxid nítric s'ha definit com un mediador amb poder antioxidant i que pot desencadenar funcions antiinflamàtores³⁰². No obstant, durant un episodi d'isquèmia, l'enzim pot trobar-se desacoblat respecte als seus cofactors o substrats, situació en la que l'oxigen reduït de l'oxidació de l'arginina és alliberat en forma de superòxid. A nivell estructural, l'enzim està format per un domini amb activitat oxidasa, el qual conté un grup hemo i tetrahydrobiopterina (BH4), i un domini amb activitat reductasa, que conté FAD i FMN que s'uneixen al NADPH. La molècula BH4 actua com un cofactor de la reacció i la seva concentració és un factor limitant per la producció de NO i per la pròpia regulació de l'enzim. Durant la reperfusió, el dany oxidatiu pot provocar una disminució en la concentració útil d'aquest cofactor, desencadenant un mal funcionament de l'enzim, disminuint l'oxidació d'arginina i augmentant l'activitat desacoblant de l'enzim, originant-se, per tant, O₂⁻³⁰³. Diferents estudis han avaluat la capacitat protectora de l'administració externa de BH4. En models d'oclusió coronària en rata i porc, l'administració intravenosa de BH4, prèvia a la isquèmia, va permetre reduir de manera significativa la mida de l'infart^{304,305}. De manera similar, l'administració del mateix cofactor, prèviament a la realització de l'oclusió coronària en un model de rata, va permetre detectar una reducció en les dimensions del ventricle esquerre i una preservació de la funció cardíaca, efectes associats amb una millora de l'activitat de NOS³⁰⁶.

En darrer terme, cal tenir en compte que el O_2^- pot reaccionar amb el NO i formar $ONOO^-$, sent un dels principals radicals que produeixen dany nitroxidatiu ³⁰⁷. Les espècies reactives de nitrogen (RNS) actuen sobre diferents dianes moleculars, podent modular la respiració mitocondrial a partir de la nitració dels complexos I i IV de la cadena de transport mitocondrial (CTE) ³⁰⁸, o bé afectant a diferents cascades que intervenen com a mediadors de la fibrosi cardíaca ³⁰⁹.

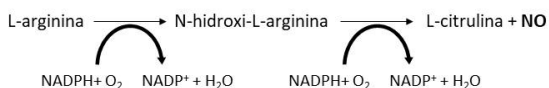


Fig. 7 – Reacció general de la NOS.

4.a.4. Els mitocondris com a font de ROS.

Els mitocondris són orgànuls summament actius en el teixit cardíac, i han estat definits com la font primària responsable de la producció de ROS en el miocàrdi durant la reperfusió. De fet, és durant la fosforilació oxidativa on es produeixen la majoria d'aquestes espècies reactives, havent-se descrit més d'11 emplaçaments diferents dins la CTE on es poden formar ²⁸².

La cadena de transport electrònic està formada per un conjunt de complexos proteics (complex I - IV), inserits en la membrana mitocondrial interna, i acoblats a una sèrie de transportadors d'electrons mòbils (coenzim Q i citocrom c). Per tal d'iniciar el mecanisme de la respiració mitocondrial, es requereix l'existència de poder reductor, el qual s'obté del NADH i del FADH₂. Ambdós promouen el transport i entrada d'electrons en la CTE, a través dels complexos I i II, respectivament. Seguidament els electrons viatgen a través dels diferents complexos i cofactors mòbils fins possibilitar la producció d'ATP per part de l'ATP sintasa ²⁸² (**Fig. 8**).

En realitat, els diferents complexos mitocondrials es troben organitzats en supercomplexes o respirosomes, permetent unions estructurals i funcionals entre ells per tal de facilitar el millor acoblament electrònic, reduint la pèrdua d'electrons. En condicions fisiològiques, els electrons que entren en la CTE són conduïts fins a la citocrom c oxidasa (complex IV), on s'obté aigua a partir de la reducció de l'oxigen. S'ha observat que la integritat i manteniment de l'estructura dels complexos es dependent de la cardiolipina, un fosfolípid present en l'estructura de la membrana interna mitocondrial ²⁸². Durant la reperfusió, l'elevat estat oxidatiu indueix la peroxidació i oxidació de la cardiolipina, provocant la dissociació del complex IV de la resta del respirosoma, disminuint l'activitat energètica i conduint a disfunció mitocondrial ²⁸².

Mitjançant la utilització d'inhibidors selectius de cadascun dels complexos mitocondrials, s'ha pogut demostrar que els complexos I i III són els majors productors d'espècies reactives d'oxigen ²⁸². Els ROS produïts pel complex I són alliberats a la

matriu mitocondrial, mentre que el complex III els allibera a l'espai intermembrana majoritàriament, tot i que també ho pot fer a la matriu mitocondrial³¹⁰. El complex I conté flavinmononucleòtids (FMN), que són els responsables d'acceptar els electrons del NADH, i de traspasar-los a proteïnes que contenen nuclis ferro-sofre fins arribar al coenzim Q. La producció de ROS es pot produir en el domini d'unió entre NADH i FMN (domini I_F), o bé en el lloc d'unió de la quinona, afavorida per l'elevada força protómotriu i una producció baixa d'ATP²⁸². Respecte a la producció de ROS per part del complex III, està relacionada amb certs dominis del coenzim Q, quan aquest es troba altament reduït³¹¹.

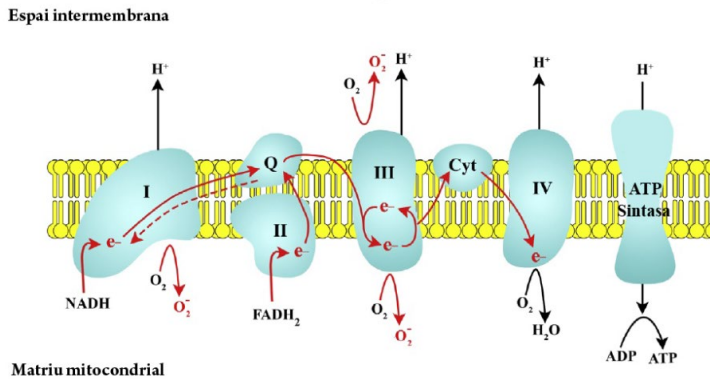


Fig. 8 – Estructura de la CTE amb els diferents complexos. Representació dels diferents llocs de producció ROS i punts d'entrada de les molècules amb poder reductor. Modificada de²⁸².

Alguns estudis recents han postulat que el complex II també pot tenir un paper en la producció de ROS durant la reperfusió miocàrdica^{312,313}. Aquest complex està format per l'enzim succinat deshidrogenasa que alhora participa en el cicle de Krebs, catalitzant l'oxidació de succinat a fumarat. La producció de radicals per part d'aquest complex ha estat relacionada amb el domini Q_o de la ubiquinona i amb la possible existència d'una transferència reversa d'electrons (RET) cap al complex I³¹⁰. Per que aquesta pugui ocórrer, el coenzim Q ha d'estar reduït, de tal manera que els electrons no poden avançar cap al complex III, i són obligats a retrocedir cap al complex I, el qual serà l'últim responsable de produir l'increment en la producció de ROS^{314,315}. Aquest mecanisme ha estat relacionat amb nivells elevats de força protómotriu, a més d'un estat altament reduït del coenzim Q^{310,316}.

Un altre factor a tenir en compte en la producció de ROS per part dels diferents complexos és la seva regulació. Així, s'ha observat que existeixen múltiples dominis que són potencialment fosforilables³¹⁶. Per exemple la δ PKC i la PKA, ambdues actives durant la reperfusió, podent fosforilar al complex IV i afectar la seva activitat, fet associat amb un augment en la producció de superòxid^{316,317}.

En condicions fisiològiques, el mitocondri compta amb un sistema antioxidant endogen que s'encarrega de controlar i degradar l'excés de ROS. La superòxid dismutasa (SOD) mitocondrial s'encarrega de transformar el O_2^- fins a H_2O_2 , mentre la glutatió peroxidasa el descompon a aigua. Aquest sistema enzimàtic necessita pel seu correcte funcionament una ratio NADPH/NADP⁺ elevada, juntament amb una força protó motriu constant. Aquests requisits energètics no es compleixen després d'un episodi d'isquèmia, la qual cosa provoca que el sistema antioxidant mitocondrial no sigui capaç d'eliminar l'alt nivell de ROS produïts ³¹⁷.

A part de la CTE, altres enzims mitocondrials també es troben involucrats en la producció ROS. Per exemple, la monoamina oxidasa, un enzim relacionat amb la degradació de diferents neurotransmissors, i localitzat a la membrana mitocondrial externa, produeix H_2O_2 , havent-se demostrat que la seva inhibició farmacològica millora el dany per reperfusió ³¹⁸. Per altra banda, la piruvat deshidrogenasa i l' α -cetoglutarat deshidrogenasa es troben involucrades en el manteniment de la ratio NADH/NADP⁺^{310,319-321}, mentre que alguns enzims del cicle de Krebs, com l'aconitasa, s'han utilitzat com a marcador d'estrès oxidatiu ³¹⁰.

4.b. Resposta cel·lular a la producció de ROS.

Les cèl·lules cardíaques compten amb un sistema antioxidant endogen, que serveix per a detoxificar els radicals produïts durant la reducció de l'oxigen en el metabolisme aeròbic ³²². Aquest sistema detoxificant, el qual s'ha anat desenvolupant i perfeccionant durant l'evolució, es troba principalment al mitocondri i al citosol cel·lular. Dins del mateix s'inclouen els enzims detoxificants, amb activitat antioxidant, com la SOD, la peroxiredoxina o la catalasa, que són els encarregats de la degradació directa dels ROS. A més, molècules com el glutatió o la glutatió peroxidasa redueixen de manera indirecta els nivells de radicals oxidants. Ara bé, durant el dany per isquèmia-reperfusió existeix un mal funcionament i una pèrdua d'aquests sistemes protectors cap al fluid extracel·lular, que seran rentats durant la reperfusió. Aquests fets provoquen una resposta ineficaç del sistema, el qual no pot fer front al bruscat augment de ROS produïts durant la restauració del flux sanguini.

No obstant, la resposta cel·lular serà molt diferent en funció dels nivells de ROS produïts. Així, s'ha descrit que nivells baixos poden actuar com molècules de senyalització involucrades en funcions fisiològiques tals com el creixement cel·lular, la fosforilació proteica o la migració cel·lular, a més a més de participar en maniobres cardioprotectores com el preconditionament isquèmic ³²³. Per contra, nivells alts s'han associat a dany cel·lular. Per aquest motiu, existeix una extensa recerca centrada en la reducció de les concentracions exagerades de ROS produïdes durant la reperfusió i que són culpables d'accionar les rutes d'inflamació i de condicionar i promoure mecanismes de mort cel·lular ³²⁴.

Aquesta recerca s'ha centrat en dues estratègies diferents: promoure la degradació dels radicals un cop formats, amb molècules antioxidants o enzims detoxificants, o per altra banda, inhibir directament la seva producció.

4.c. Estratègies terapèutiques de detoxificació dels ROS.

Diferents molècules amb activitat antioxidant han estat utilitzades per tal de reduir l'excés de ROS produïts durant la reperfusió i per tant el dany associat a aquesta fase. Entre elles, destaquen, per un costat, els antioxidants enzimàtics, que degraden els radicals oxidants, primer fins a H_2O_2 , i després fins a aigua. Entre els enzims antioxidants trobem la catalasa, la SOD i la glutatió peroxidasa, necessitant, tots ells, de la presència de diferents cofactors, tals com coure, zinc, o magnesi. Per altra banda, també s'han emprat antioxidants no enzimàtics, de baix pes molecular, incloent les vitamines C i E, els derivats polifenòlics i els carotenoides. Tots ells neutralitzen els efectes dels ROS, al segrestar-los i disminuir-ne la seva reactivitat a partir de l'oxidació del propi compost antioxidant ³²⁵.

Mentre que a nivell experimental, l'estratègia d'eliminar els ROS produïts s'ha associat, en general, a efectes beneficiosos ³²⁶, la utilització d'antioxidants a la pràctica clínica ha donat lloc a resultats clarament contradictoris. En una revisió dels assajos clínics realitzats en pacients amb malaltia cardiovascular que van rebre suplementació amb antioxidants es va posar de manifest que existeixen una bona selecció d'estudis tant amb resultats positius, en quant a reducció de mortalitat o d'infart de miocardi, com amb resultats neutres o inclús amb efectes contraproduents, amb un augment en la mortalitat o d'ictus hemorràgic ³²⁷. En conseqüència, aquesta estratègia no s'ha estès a la pràctica clínica habitual.

Entre els antioxidants no enzimàtics, de baix pes molecular, un dels més utilitzats ha estat l'àcid ascòrbic o vitamina C. El seu mecanisme d'acció sembla ser el segrest directe dels ROS. En qualsevol cas, també s'ha postulat que podria modular la transcripció i expressió de NADPH oxidasa i augmentar la síntesi d'eNOS, reduint, conseqüentment, la formació de ROS ³²⁸⁻³³⁰. A més, l'ascorbat, juntament amb el glutatió, eviten l'oxidació de lípids, proteïnes i DNA, protegint per tant la seva estructura i funció. A la pràctica clínica, l'administració d'ascorbat previ a l'angioplàstia primària, en pacients amb infart de miocardi, va permetre millorar la fracció d'ejecció als 2-3 mesos, tot i no observar-se canvis en la mida de l'infart ^{331,332}.

L'ascorbat requereix glutatió per a desenvolupar la seva activitat antioxidant. Per aquest motiu, la n-acetilcisteïna, un conegut donador de glutatió, pot tenir efectes sinèrgics amb l'ascorbat ³³³. A part de ser un precursor de la síntesi del glutatió, la n-acetilcisteïna pot tenir també activitat antioxidant per se, ja que pot actuar com a quelant d'ions metàl·lics, com el ferro, el qual pot provocar peroxidació lipídica ³³⁴.

En un estudi recent realitzat en un model d'isquèmia-reperfusió en rata, l'administració de n-acetilcisteïna, iniciada 30 minuts abans de l'oclusió coronària, i mantinguda durant les 2 hores de reperfusió, va ser capaç de reduir la mida de l'infart i de recuperar els nivells de glutatió, en comparació amb el grup control ³³⁵. Desafortunadament, a nivell clínic, l'administració de n-acetilcisteïna prèvia a la realització d'angioplàstia primària en pacients amb infart agut de miocardi, encara que va reduir l'estrès oxidatiu ³³⁶, no va mostrar cap efecte sobre la mida i progressió de l'infart. Per contra però, al recent estudi NACIAM, l'administració conjunta de n-acetilcisteïna i nitroglicerina, un donador de NO, sí que va mostrar efectes cardioprotectors, tot reduint la mida de l'infart i l'alliberació de creatina quinasa ³³⁷.

Respecte als quelants de ferro, el més utilitzat ha estat la deferoxamina. Estudis en models d'oclusió coronària transitòria en conills i gossos van demostrar el seu efecte beneficiós, reduint la mida de l'infart ³³⁸⁻³⁴⁰. A nivell clínic, la infusió de deferoxamina en pacients sotmesos a cirurgia de bypass coronari va permetre reduir l'aturdiment miocàrdic i augmentar la fracció d'ejecció ³⁴¹. En pacients amb infart agut de miocardi, l'administració de deferoxamina prèviament a la realització de l'angioplàstia coronària va exercir un efecte protector, tot reduint els nivells de ferro i els marcadors de peroxidació lipídica, però sense produir una reducció en la mida de l'infart ³⁴². Una estratègia terapèutica que podria ser interessant analitzar seria la combinació de deferoxamina amb vitamina C, ja que s'ha descrit que redueix la incidència d'arrítmies durant la reperfusió ³⁴³.

Altres antioxidants exògens utilitzats han estat la vitamina E, majoritàriament com el seu derivat α -tocoferol, el qual ha estat altament relacionat amb una reducció de la peroxidació lipídica ³⁴⁴, els carotenoides com el β -caroté, i el VitaePro (compost de diferents carotenoides) ³⁴⁵. Finalment, també la melatonina, una hormona que controla el ritme circadià, ha estat proposada com un nou agent antioxidant. S'ha comprovat que la melatonina es troba en altes concentracions en els mitocondris, on pot detoxificar els ROS, estimulando l'activitat d'altres molècules antioxidantso inhibint la capacitat pro-oxidant d'altres enzims ^{346,347}.

Respecte als antioxidants enzimàtics d'alt pes molecular, existeixen dades a nivell experimental que confirmen la seva efectivitat. Així, l'administració de la forma recombinant humana de SOD, en el moment de la reperfusió, va permetre millorar la funció ventricular, tant en cors aïllats i perfundits de conills, sotmesos a 30 minuts d'isquèmia global seguida de reperfusió ³⁴⁸, com en un model in vivo d'oclusió coronària transitòria en conill ³⁴⁹, efectes associats amb una disminució en la producció de ROS. Estudis posteriors van poder constatar una reducció en la mida de l'infart, quan el tractament era administrat a l'inici de la reperfusió en un model caní d'oclusió coronària in vivo ³⁵⁰. Degut als bons resultats obtinguts en models experimentals, alguns autors van decidir testar la seva eficàcia en pacients amb infart

agut de miocardi transmural, sotmesos a angioplàstia primària. Malauradament, en aquest estudi multicèntric i doble-cec (n=61), l'administració de la forma recombinant humana de SOD no va millorar ni la funció regional del ventricle esquerre al seguiment, ni altres paràmetres hemodinàmics ³⁵¹.

Un nou enfocament està constituït per l'ús d'antioxidants específics per al mitocondri. Un d'ell és el MitoQ, una molècula de tipus ubiquinol que en la seva estructura conté un catió lipofílic trifenilfosfoni (TPP) que dirigeix la seva actuació a aquest orgànu ³⁵². La seva eficàcia cardioprotectora es va demostrar en cors aïllats de rata sotmesos a isquèmia-reperfusió, en el que els animals van ser tractats durant els 14 dies previs al sacrifici. Els cors dels animals tractats amb MitoQ van presentar una menor alliberació de lactat deshidrogenasa, indicant una reducció en el dany cel·lular, efecte associat amb una millor recuperació funcional durant la reperfusió i menor disrupció de la funció mitocondrial ³⁵³. L'eficàcia del MitoQ ha estat testada més recentment en un model murí de transplantament cardíac heterotòpic, demostrant-se que la seva administració abans de la preservació en fred del cor redueix els nivells de troponina I, efecte associat amb una menor producció de ROS ³⁵⁴. Un altre antioxidant específic del mitocondri és el fàrmac Bendavia (SS31), un pèptid que pot travessar tant la membrana plasmàtica com la mitocondrial, reduint la producció de ROS i l'obertura del mPTP ³⁵⁵. La seva eficàcia ha estat testada en múltiples models animals: rosegadors, porcs, conills i ovelles ³⁵⁶⁻³⁵⁸. A més a més, el fàrmac SS31 està sent objecte d'un assaig clínic de fase 2, pendent de finalització ³⁵⁹.

Com s'ha comentat abans, l'existència de dades contradictòries a nivell clínic ha fet que l'estratègia terapèutica d'eliminació dels ROS no hagi tingut, pel moment, repercussió a la pràctica mèdica habitual. És per aquest motiu que, en la recerca de noves dianes, s'ha proposat actuar abans de que els ROS es sintetitzin, principalment buscant estratègies encaminades a reduir la seva producció a nivell de la CTE.

4.d. Inhibició de la CTE com a estratègia cardioprotectora enfront el dany miocàrdic per reperfusió.

La segona estratègia per a reduir l'excessiu estrès oxidatiu que ocorre a l'inici de la reperfusió és inhibir directament la producció de ROS. Com s'ha comentat abans, el dany oxidatiu que ocorre a l'inici de la reperfusió està relacionat amb una producció massiva de ROS, i amb un mal funcionament del sistema de detoxificació. En el miocardi reperfundit, el principal responsable d'aquesta producció massiva de radicals són els mitocondris, relacionat amb un mal funcionament de la CTE i a l'elevada taxa de transferència d'electrons que té lloc en el miocardi. Així doncs, la modulació del funcionament o la inhibició de l'activitat de la CTE s'ha establert com una possible estratègia cardioprotectora per a disminuir la producció de radicals oxidants i, per tant, el dany per isquèmia-reperfusió.

Tal com s'ha esmentat anteriorment, els complexos I i III han estat descrits com els majors productors de ROS en el miocardi reperfundit, contenint cadascun d'ells varis llocs estructurals on es poden produir ^{310,311,360-362}. L'estudi del paper dels diferents complexos en el dany per reperfusió i en la producció massiva de ROS durant aquesta fase s'ha realitzat amb l'administració d'inhibidors selectius, permetent entendre la localització i l'origen dels radicals oxidants.

Respecte al complex I s'ha descrit que l'administració de rotenona, un inhibidor irreversible del mateix, permet reduir la producció de ROS en mitocondris aïllats ³⁶¹ i mantenir la viabilitat cel·lular en un model de cardiomiòcits sotmesos a isquèmia simulada sense reperfusió ³⁶³. A més a més, l'aplicació de rotenona en un model de cor aïllat de conill just abans de l'inici de la isquèmia va ser capaç de reduir la producció de ROS i l'alliberació de citocrom c ³⁶⁴. Tot i així, el fet que aquest inhibidor sigui irreversible ha limitat la seva aplicació durant la reperfusió. En aquest sentit, la utilització d'un inhibidor reversible com l'amobarbital va significar un gran avanç, permetent reprendre el metabolisme oxidatiu de la CTE durant la reperfusió. L'amobarbital és un agent anestèsic de tipus barbitúric, de curta durada, que competeix pel domini d'unió de la rotenona, en la transició dels electrons des de les proteïnes ferro-sofre a la ubiquinona, de manera reversible. Així, l'administració d'amobarbital a l'inici de la isquèmia, en un model de cor aïllat de rata sotmés a isquèmia-reperfusió, va permetre reduir la mida de l'infart, efecte associat amb una millora de les taxes de respiració mitocondrial i una reducció de l'alliberació de citocrom c en preparacions de mitocondris aïllats ^{362,365}. Per altra banda, el tractament durant la reperfusió va millorar la contractilitat cardíaca en cors aïllats de conill ³⁶⁶ i de rata ³⁶⁷, i va ser capaç de reduir la mida de l'infart i la producció de ROS en cors aïllats de rata sotmesos a isquèmia-reperfusió ³⁶⁸.

Està descrit que el complex I pot adoptar dos conformacions, la no activa, durant la isquèmia, i l'activa, durant la reperfusió ³⁶⁹. El canvi entre aquests estats està relacionat amb una modificació de tipus s-nitrosació en el residu de la cisteïna 39 (localitzada al domini ND3, encarregat del bombeig de protons) ³⁷⁰. Aquest residu no es troba accessible de forma normal, però durant la isquèmia, la inactivació del complex I provoca la seva exposició. La reperfusió ocasiona, per contra, la ràpida reactivació del complex i la producció de ROS. El que resulta d'interès des del punt de vista terapèutic és que la presència d'espècies s-nitrosants durant la reperfusió fixa el complex en l'estat inactiu, a l'interaccionar amb la cisteïna 39, i inhibeix la producció de ROS ³⁶⁹. Per tant, aquesta modificació reversible pot esdevenir una diana farmacològica d'interès per inhibir la reactivació del complex I durant la reperfusió i d'aquesta manera limitar la producció de ROS ³⁷¹. En aquest sentit, el Mito-SNO (S-nitrosotiol), una molècula de nova síntesi, dirigida per actuar en el mitocondri al contenir en la seva estructura l'anell TPP, permet modificar i s-nitrosar la cisteïna 39. De fet, en un model murí d'oclusió coronària in vivo s'ha demostrat que l'administració

de Mito-SNO a l'inici de la reperfusió redueix la mida de l'infart de miocardi, mesurada a les 24 hores de l'oclusió coronària, i millora la funció ventricular i la fibrosis als 28 dies^{369,370}, efectes associats amb una reducció de la producció de ROS³⁶⁹.

El complex III, anomenat citocrom c-reductasa, s'encarrega de l'oxidació del coenzim Q utilitzant el citocrom c com a acceptor d'electrons³⁷². A més, participa de manera activa en les diferents reaccions que intervenen en el cicle de la ubiquinona (cicle Q), i alhora intervé en el manteniment del potencial de membrana mitocondrial mitjançant l'extrusió de protons des de la matriu. És el segon complex de la CTE que té la taxa de producció de ROS més alta, ja que en la seva estructura interna s'integren dos molècules en estat de semiquinona (Q_i i Q_o), d'estructura inestable. La utilització d'inhibidors, com antimicina A, mixotiazol o stigmatelina, tot i que actuen en diferents regions del complex III, ha permès demostrar que la font principal de ROS prové de la zona Q_o , i que són alliberats tant a l'espai intermembranós, com a la matriu mitocondrial^{310,373}. Cal afegir, que la producció de ROS pel complex III ha estat relacionada amb funcions fisiològiques i amb el seu paper protector en el preconditionament isquèmic³⁷⁴.

Recentment, alguns autors han postulat que el complex II, constituït per l'enzim succinat deshidrogenasa, que forma part del cicle de Krebs, també pot jugar un paper important en la producció de ROS i en la mort cel·lular que ocorre durant la reperfusió^{312,313}. De fet, la seva inhibició mitjançant diferents fàrmacs ha demostrat tenir efectes ambivalents, depenent de les condicions, sobre la producció de ROS en mitocondris aïllats, accions relacionades amb canvis en el potencial de membrana mitocondrial i amb l'oxidació del conjunt d'ubiquinones^{374,375}. A més, l'administració d'atpenina A5, un suposat potent inhibidor del complex II, administrat abans de la isquèmia en cors aïllats de rata, va permetre reduir de manera significativa la mida de l'infart, millorant la contractilitat cardíaca postisquèmia i reduint l'edema mitocondrial³⁷⁶. Ara bé, els mecanismes d'acció de l'atpenina A5 no estan del tot clarificats, i en realitat poden estar relacionats amb efectes sobre l'obertura dels mitoK_{ATP}³⁷⁷.

En aquest mateix context, cal destacar la relació entre la inhibició del complex II i la producció de ROS deguda a RET cap al complex I. A part de la presència de condicions reductores i d'una elevada força protó motriu, l'acumulació del substrat endogen de la succinat deshidrogenasa, el succinat, s'ha proposat com un tercer factor important per a l'establiment de la RET. Precisament, en un estudi publicat recentment s'ha demostrat que és durant la isquèmia miocàrdica quan es produeix una gran acumulació de succinat al teixit, degut a la reversió de l'activitat de la succinat deshidrogenasa³⁷⁸. Aquests autors, a més, van proposar que a l'inici de la reperfusió, el succinat acumulat en grans quantitats durant la isquèmia és ràpidament oxidat a fumarat per la normalització de l'activitat de l'enzim, provocant que almenys una part dels electrons siguin transportats en la direcció reversa, cap al complex I, que seria el

responsable últim de la producció massiva de ROS que es dona durant la reperfusió. De fet, aquests mateixos autors van demostrar que quan es prevenia l'acumulació de succinat durant la isquèmia, mitjançant inhibició reversible de la succinat deshidrogenasa amb malonat, administrat abans de la isquèmia en un model d'oclusió coronària transitòria en ratolí, s'atenuava la producció de ROS durant la reperfusió, de forma depenent de rotenona, i es reduïa de manera significativa la mida de l'infart³⁷⁸.

Tot i així, la inhibició del complex II de la CTE amb malonat disòdic abans de l'establiment de la isquèmia cardíaca no és factible en pacients amb infart de miocardi sotmesos a intervencions de revascularització coronària, ja que arriben a l'hospital amb la isquèmia ja instaurada. En aquest sentit, i donat que, hipotèticament, hauria de ser possible protegir enfront l'infart de miocardi tant inhibint l'acumulació de succinat abans de la isquèmia, com reduint la seva ràpida oxidació durant la reperfusió, en aquest treball ens proposem analitzar l'eficàcia de la inhibició reversible de la succinat deshidrogenasa amb malonat únicament durant la reperfusió, i investigar els mecanismes implicats.

HIPÒTESI

HIPÒTESI

La inhibició reversible de la succinat deshidrogenasa mitocondrial a l'inici de la reperfusió permet reduir de manera significativa la mida de l'infart en models experimentals sotmesos a isquèmia miocàrdica transitòria mitjançant canvis en el perfil metabòlic tissular, amb afectació de la funció mitocondrial, i amb una reducció en la producció de radicals lliures d'oxigen i en l'obertura del mPTP.

OBJECTIUS

OBJECTIUS

Els objectius d'aquesta tesi es poden dividir en un de principal i tres intermedis:

Objectiu principal:

Posar a prova la hipòtesi de l'estudi, investigant els efectes de la inhibició reversible de la succinat deshidrogenasa mitocondrial amb malonat disòdic sobre el dany miocàrdic per reperfusió.

Objectius intermedis:

1. Determinar les condicions òptimes d'administració del malonat disòdic, incloent la concentració, el moment més oportú i la duració del tractament en un model de cor aïllat de ratolí.
2. Estudiar els mecanismes implicats en els efectes del malonat disòdic, incloent:
 - Els canvis en el perfil metabòlic i la seva influència sobre l'infart.
 - L'afectació de la funció mitocondrial i la producció de ROS.
 - El grau d'obertura del mPTP.
 - L'activació de cascades citosòliques cardioprotectores.
3. Analitzar si l'administració selectiva de malonat disòdic a l'àrea en risc, mitjançant infusió intracoronària a l'inici de la reperfusió, manté els seus efectes sobre la mida de l'infart en un model porcí d'oclusió coronària transitòria, així com avaluar la possible existència d'accions indesitjables sobre la incidència d'arrítmies ventriculars o la funció del miocardi remot.

PUBLICACIONES

ARTICLE 1

Succinate dehydrogenase inhibition with malonate during reperfusion reduces infarct size by preventing mitochondrial permeability transition.

Valls-Lacalle,L., Barba,I., Miro-Casas,E., Albuquerque-Bejar,J.J., Ruiz-Meana,M., Fuertes-Agudo,M., Rodriguez-Sinovas,A., and Garcia-Dorado,D.

Cardiovasc Res. 2016 Mar 1;109(3):374-84. doi: 10.1093/cvr/cvv279. Epub 2015 Dec 23.

Factor d'impacte (2016): 5,878, Q1.

Succinate dehydrogenase inhibition with malonate during reperfusion reduces infarct size by preventing mitochondrial permeability transition

Laura Valls-Lacalle, Ignasi Barba, Elisabet Miró-Casas, Juan José Alburquerque-Béjar, Marisol Ruiz-Meana, Marina Fuertes-Agudo, Antonio Rodríguez-Sinovas*, and David García-Dorado*

Laboratory of Experimental Cardiology, Department of Cardiology, Vall d'Hebron University Hospital and Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Pg. Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain

Received 24 July 2015; revised 17 December 2015; accepted 22 December 2015; online publish-ahead-of-print 23 December 2015

Time for primary review: 24 days

Aims

Previous studies demonstrated that pre-treatment with malonate, a reversible inhibitor of succinate dehydrogenase, given before ischaemia, reduces infarct size. However, it is unknown whether administration of malonate may reduce reperfusion injury.

Methods and results

Isolated mice hearts were treated, under normoxic conditions, with increasing concentrations of disodium malonate (0.03–30 mmol/L, $n = 4$). Malonate induced a concentration-dependent decrease in left ventricular developed pressure (LVdevP) ($EC_{50} = 8.05 \pm 2.11$ mmol/L). In isolated hearts submitted to global ischaemia (35 min) followed by reperfusion (60 min), malonate 3 mmol/L given only during the first 15 min of reperfusion reduced lactate dehydrogenase release (125.41 ± 16.82 vs. 189.20 ± 13.74 U/g dry tissue/15 min in controls, $P = 0.015$) and infarct size (24.57 ± 2.32 vs. $39.84 \pm 2.78\%$, $P = 0.001$, $n = 7-8$ per group) and improved recovery of LVdevP (20.06 ± 3.82 vs $7.76 \pm 2.53\%$ of baseline LVdevP, $P = 0.017$). 1H NMR spectroscopy demonstrated marked changes in the metabolic profile of malonate-treated hearts, including increased accumulation of succinate. Furthermore, malonate reduced reactive oxygen species (ROS) production, as measured by MitoSOX staining in myocardial samples obtained after 5 min of reperfusion and in mitochondrial preparations from these samples, preserved mitochondrial respiration, and reduced mitochondrial permeabilization, assessed by calcein retention. Treatment with malonate did not result in activation of RISK or SAFE signalling pathways in tissue extracts obtained 5 min after reperfusion.

Conclusion

Succinate dehydrogenase inhibition with malonate at the onset of reperfusion reduces infarct size in isolated mice hearts through reduction in ROS production and mitochondrial permeability transition pore opening.

Keywords

Malonate • Succinate dehydrogenase • Reperfusion injury • ROS

1. Introduction

Rapid blood flow restoration, either by thrombolysis or percutaneous coronary interventions, has substantially improved prognosis of patients with ST segment elevation myocardial infarction (STEMI). However, a large proportion of patients with STEMI develops large infarcts, post-infarction remodelling, and heart failure, despite state-of-the-art reperfusion therapy.

A significant proportion of cell death during myocardial ischaemia–reperfusion injury occurs during reperfusion, in the form of necrosis,

and that can be prevented by manoeuvres applied at the onset of flow restoration.^{1,2} Cardiomyocyte hypercontracture and mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening are interrelated mechanisms contributing to cell death.^{3,4} Both hypercontracture and MPTP opening are prevented during the ischaemic phase by the low cytosolic pH and are triggered by altered calcium handling during reperfusion.^{3–5}

Increased reactive oxygen species (ROS) production importantly contributes to MPTP.³ The protective effect of ischaemic post-conditioning⁶ and remote ischaemic conditioning⁷ has been explained

* Corresponding author. Tel: +34 934894038; fax: +34 934894032, Email: antonio.rodriguez.sinovas@vhir.org (A.R.-S.); dgdorado@vhebron.net (D.G.-D.)

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2015. For permissions please email: journals.permissions@oup.com.

in part by attenuation of oxidative stress, and ROS scavengers have been shown to reduce infarct size in different experimental models.⁸ However, translation of these treatments to the clinical arena has not been successful. Clinical trials using superoxide dismutase or edaravone, two ROS scavengers, have provided negative results.⁹ An alternative approach to the use of ROS scavengers is to interfere with ROS production. Mitochondrial complex I inhibition with amobarbital has been shown to reduce ROS production and infarct size in isolated rat or mice hearts submitted to ischaemia–reperfusion, when given at the onset of reperfusion.^{10,11}

Although the main sources of ROS in the myocardial mitochondria are mitochondrial complexes I and III,¹² some studies have suggested that inhibition of succinate dehydrogenase (mitochondrial complex II) may also reduce ROS production.^{13,14} Atpenin A5, a proposed potent inhibitor of succinate dehydrogenase, was protective against simulated ischaemia–reperfusion in isolated rat cardiomyocytes and hearts.¹⁵ However, the mechanisms of action of atpenin A5 are not clear and could be related to actions on mitochondrial ATP-dependent K⁺ channels.¹⁵ In a recent work, Chouchani *et al.*¹⁴ have demonstrated that reversible succinate dehydrogenase inhibition with malonate before ischaemia results in a reduction in infarct size in an *in situ*, open-chest, mice model of cardiac ischaemia–reperfusion, an effect associated with a reduction in ROS production.¹⁴ However, administration before ischaemia does not allow to discriminate the effects on ischaemia from those on reperfusion, and is not possible in patients with STEMI. The aim of this work was to determine whether reversible inhibition of succinate dehydrogenase with malonate during reperfusion may reduce reperfusion injury in isolated mice hearts and to study the mechanisms involved.

2. Methods

This study conforms to European legislation (Directive 2010/63/EU) on the protection of animals used for scientific purposes and the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publications no. 85-23, revised 1996, updated in 2011) and was approved by the Ethics Committee of our institution (reference 31/15 CEEA). A complete description of the methods can be found in Supplementary material.

2.1. Experimental preparation and study protocols

Adult male C57BL/6j mice (25–30 g) were anaesthetized with sodium pentobarbital (1.5 g/kg, *i.p.*) and submitted to a bilateral thoracotomy. Whole hearts were quickly excised and retrogradely perfused through the aorta with an oxygenated (95% O₂; 5% CO₂) Krebs solution at 37°C in a constant flow Langendorff system, as described previously.¹⁶

2.1.1. Concentration–response curves to disodium malonate during normoxia

After 15 min of equilibration, four hearts were treated, under normoxic conditions, with increasing concentrations of disodium malonate (C₃H₂O₄Na₂, Sigma-Aldrich, reference M4795), ranging from 0.03 to 30 mmol/L (each concentration applied for 15 min). Lactate dehydrogenase (LDH) release was determined at the end of each concentration, and infarct size was measured at the end of the experiments. Concentration–response curves for left ventricular developed pressure (LVdvp), LV end-diastolic pressure, heart rate, and perfusion pressure were adjusted to sigmoid curves ($y = y_0 + a/[1 + \exp(-x - x_0)/b]$) to determine the concentration causing the half-maximal effect (EC50) and the maximal effect (Emax).

2.1.2. Effects of disodium malonate on ischaemia–reperfusion injury

Forty-four hearts were submitted, after a period of 30 min of equilibration, to 35 min of global ischaemia followed by 60 min of reperfusion, as described previously.¹⁶ In a first set of experiments, hearts were pre-treated, for 15 min before ischaemia, without ($n = 8$) or with 1 ($n = 7$), 3 ($n = 7$), or 10 ($n = 7$) mmol/L of malonate, which was continued for the entire reperfusion. In a second set of experiments, the effects of malonate given only during reperfusion were assessed, in hearts treated with either control buffer ($n = 8$) or Krebs containing malonate 3 mmol/L ($n = 7$), during its first 15 min. This concentration was in the range of the EC50 determined in the concentration–response curves under normoxic conditions. In eight additional experiments, and in order to test a possible involvement of MPTP opening on malonate actions, the effects of cyclosporine A (0.5 μmol/L), administered during the first 5 min of reperfusion, on infarct size were compared with results obtained in a control group ($n = 4$ per group).

2.2. LDH release and infarct size measurement

LDH release and infarct size were determined by spectrophotometry and 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining, respectively, as described previously.¹⁷ The relative contribution of necrosis and apoptosis to final infarct size in our protocol was assessed in two additional hearts after 1 h of reperfusion and compared with that found in two normoxic hearts, by propidium iodide or terminal deoxynucleotidyl transferase nick end labelling (TUNEL) staining, respectively.

2.3. Quantification of ROS production in cardiac tissue

To quantify ROS production in cardiac tissue, 12 additional mice hearts were submitted to 40 min of normoxia or to 35 min of global ischaemia followed by 5 or 60 min of reperfusion and treated or not with malonate 3 mmol/L during the last 15 min of normoxia or during the first 15 min of reperfusion. Myocardial, paraformaldehyde-fixed sections (5 μm) were incubated with MitoSOX Red (5 μM, Invitrogen) for 15 min (room temperature and darkness) to assess ROS production by confocal microscopy, as described previously (excitation wavelength 488 nm and emission wavelength 520 nm).¹⁸ Nuclei were stained with Hoechst 33342 (10 μg/mL).

2.4. Analysis of myocardial metabolism

In general, experiments aimed to assess the mechanisms of malonate protection were terminated after 5 min of reperfusion. This time was selected to maximize differences in the variables analysed.¹⁶ Cardiac metabolites were analysed by ¹H NMR spectroscopy in 21 additional mice hearts submitted to 40 min of normoxia or to 35 min of global ischaemia followed by 5 min of reperfusion and treated or not with malonate 3 mmol/L during the last 15 min of normoxia or only during the 5 min of reperfusion ($n = 5–6$ per group). Cardiac metabolites were extracted using the methanol:chloroform method, as previously described.¹⁹ Thirty-two additional mice hearts were used to assess kinetics of succinate recovery during ischaemia–reperfusion, in preparations treated or not with malonate 3 mmol/L during the first 15 min of reperfusion. Four additional hearts were treated before ischaemia with malonate 3 mmol/L, for 15 min, to assess the effects of pre-treatment on succinate concentrations at the end of the ischaemic period.

2.5. Analysis of mitochondrial function

Mouse mitochondria were isolated from whole hearts as described previously.²⁰ Mitochondrial respiration, H₂O₂ production, and permeabilization were assessed with a Clark-type oxygen electrode (Hansatech, UK) at room temperature after addition of respiration substrates, by assessing changes in fluorescence after supplementation with homovanillic acid (0.1 mmol/L) and horseradish peroxidase (5 U/mL) (excitation at 320 nm and emission at 440 nm), and fluorometrically after loading with

10 $\mu\text{mol/L}$ calcein-AM for 5 min (excitation at 485 nm and emission at 530 nm) (a decrease in fluorescence indicating mitochondrial permeabilization, suggestive of MPTP opening), respectively, as described previously.²⁰

2.6. Activation of cytosolic signalling pathways

Activation of the RISK pathway was determined by standard western blot analysis¹⁶ of the phosphorylation state of Akt, ERK1/2, and GSK3 β in myocardial samples obtained from 16 additional hearts submitted to 40 min of normoxia or to 35 min of global ischaemia followed by 5 min of reperfusion and treated or not with malonate 3 mmol/L during the last 15 min of normoxia or only during the 5 min of reperfusion [$n = 4$ per group (four groups: normoxia, normoxia + malonate, ischaemia–reperfusion, ischaemia–reperfusion + malonate)]. STAT3 phosphorylation was used to assess an involvement of the SAFE protective pathway.¹⁶

2.7. Statistics

Data are expressed as mean \pm SEM. Differences were assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) (infarct size, cumulative LDH release, and analysis of mitochondrial calcein retention and mitochondrial respiration) or repeated-measures ANOVA (MANOVA) (changes in LVdevP, heart rate, EDLVP, or perfusion pressure during reperfusion or ROS production in isolated mitochondria) and Dunnett's *post hoc* test. Metabolic and western blot data were analysed by two-way ANOVA test. Differences were considered significant when $P < 0.05$. For pattern recognition purposes, NMR spectra were imported into Simca V13 software (Umetrics) where both unsupervised (principal component analysis) and supervised orthogonal partial least squares (OPLS) methods were applied.

3. Results

3.1. Concentration–response curves to disodium malonate during normoxia in isolated mice hearts

Under normoxic conditions, malonate induced a concentration-dependent decrease in LVdevP. Adjustment to sigmoid curves gave good correlation coefficients, with an EC50 of 8.05 ± 2.11 mmol/L and an Emax of 23.4 ± 7.46 mmHg (Figure 1). No changes in heart rate, EDLVP, or perfusion pressure were observed at any tested concentration. Application of malonate to normoxic mice hearts did not induce injury at any concentration, as denoted by the absence of LDH release and negligible infarct size at the end of the experiment.

3.2. Effects of disodium malonate against reperfusion injury in isolated mice hearts

Myocardial cell death 1 h after reperfusion occurred in our model predominantly by necrosis, as denoted by extensive propidium iodide staining of cardiac slices, whereas contribution of apoptosis was negligible (Supplementary material online, Figure S1). Neither propidium iodide nor TUNEL staining was observed in samples from normoxic hearts (Supplementary material online, Figure S1).

Hearts pre-treated with malonate 3 and 10 mmol/L, but not with 1 mmol/L, depicted a significant reduction in the infarct size when compared with controls (see Supplementary results and Supplementary material online, Figure S2). Furthermore, administration of malonate 3 mmol/L only during reperfusion significantly reduced the infarct size in isolated mice hearts submitted to 35 min of global ischaemia (Figure 2A). Furthermore, malonate tended to reduce maximal hypercontracture during reperfusion (Figure 2B), significantly attenuated

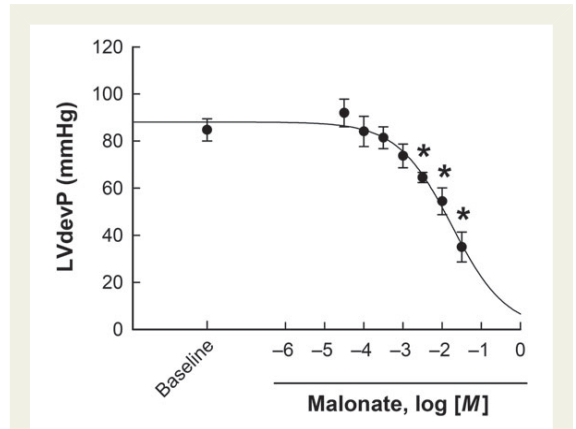


Figure 1 Disodium malonate reduces LVdevP in a concentration-dependent manner in four isolated mice hearts perfused under normoxic conditions. * $P < 0.01$ indicates significant differences vs. baseline values.

LDH release during reperfusion (Figure 2C and D), and improved functional recovery at the end of experiment (Figure 2E). Cardioprotection by malonate was similar to that observed when cyclosporine A (0.5 $\mu\text{mol/L}$) was given during the first 5 min of reperfusion: infarct size was reduced from $70.75 \pm 8.00\%$ in controls to $52.24 \pm 3.67\%$ in cyclosporine-treated hearts ($P < 0.05$, Student's *t*-test).

3.3. ROS production in cardiac tissue during reperfusion

Confocal fluorescence microscopy showed a marked increase in MitoSOX staining after 5 min of reperfusion, in hearts submitted to ischaemia–reperfusion, when compared with those perfused under normoxic conditions. In contrast, malonate, given during initial reperfusion, attenuated this enhanced MitoSOX staining (Figure 3). One hour after reperfusion, MitoSOX staining was lower than that after 5 min, with no differences between groups (Figure 3).

3.4. Myocardial metabolism during reperfusion

Figure 4A and B shows representative ¹H NMR spectra obtained from myocardial extracts from isolated mice hearts. Supervised classification was able to discriminate not only between myocardial samples obtained from normoxic or ischaemic hearts ($P < 0.001$, $Q^2 = 0.836$, data not shown), but also between samples taken from hearts treated or not with malonate, both including or not malonate in the analysis ($Q^2 = 0.707$ and 0.399 , respectively) (Figure 4C and D). These results suggested that groups treated or not with malonate have a different cardiac metabolic profile.

Reperused myocardium showed a significant decrease in ADP, AMP, carnitine, glutamate, NADP⁺, and taurine and increases in alanine, glutamine, and succinate when compared with myocardium from normoxic hearts (Table 1 and Figure 5A and B). Importantly, hearts treated with malonate, both under normoxic conditions or during reperfusion after ischaemia, had significantly increased malonate and succinate concentrations (Figures 4B and 5C and D). No significant

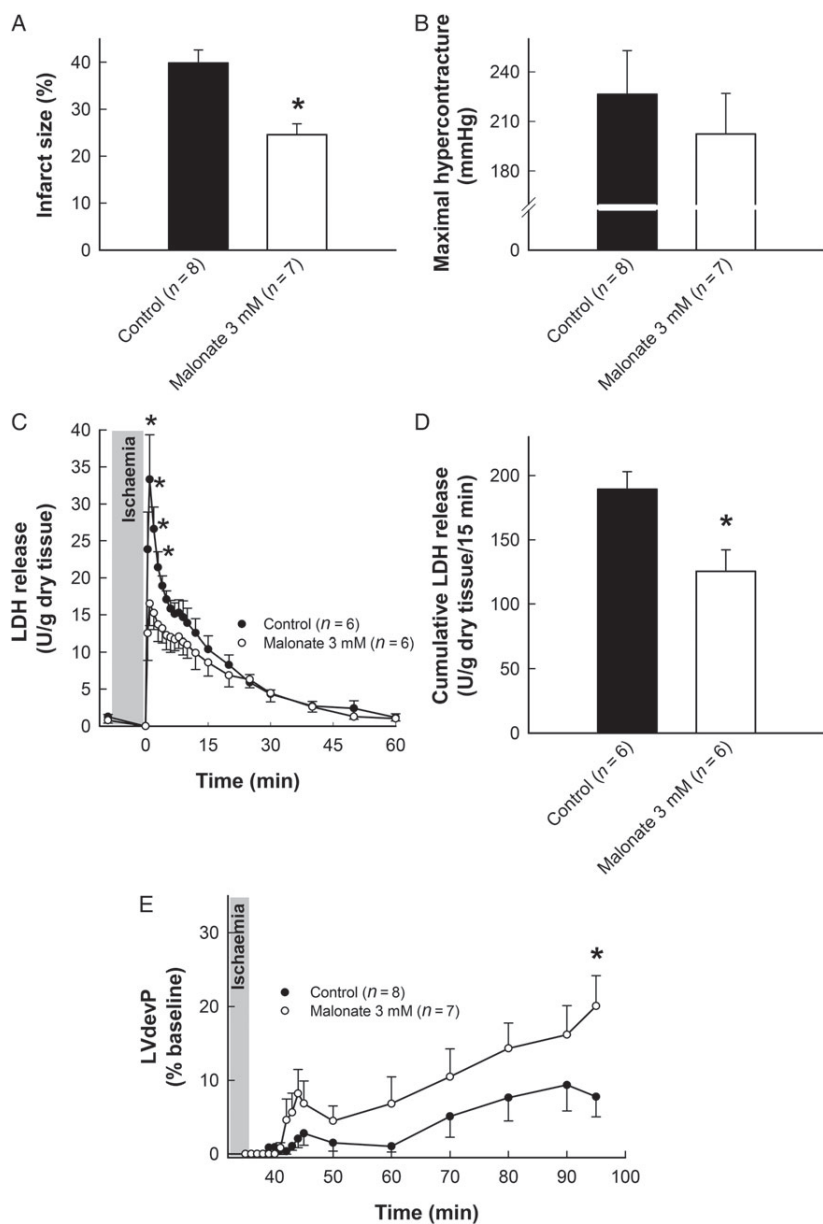


Figure 2 Cardioprotective effects of disodium malonate given at reperfusion. Effects of disodium malonate (3 mmol/L) given during the first 15 min of reperfusion on infarct size (A), maximal hypercontracture during reperfusion (B), LDH release during the entire post-ischaemic period (C) (MANOVA, time: $P = 0.005$, group: $P = 0.006$, interaction time vs. group: $P = 0.049$), cumulative LDH release during the first 15 min of reperfusion (D), and functional recovery during reperfusion (E, MANOVA, time: $P < 0.001$, group: $P = 0.039$, interaction time vs. group: $P = 0.044$) in isolated mice hearts submitted to 35 min of ischaemia followed by 60 min of reperfusion. * $P < 0.05$ indicates significant differences vs. control hearts ($n = 7-8$ per group).

interaction between treatment and the protocol used (normoxia or ischaemia–reperfusion) was detected in any case by two-way ANOVA. In fact, malonate slowed recovery of succinate levels during reperfusion, from the high peak seen at the end of ischaemia, when compared with control hearts (Figure 5E). In contrast, pre-treatment with malonate 3 mmol/L reduced succinate concentrations at the end of the

ischaemic period (Supplementary material online, Figure S3), as previously demonstrated by Chouchani *et al.*¹⁴

3.5. Mitochondrial function

Respiration was monitored in mitochondria isolated from normoxic hearts using substrates of complex I (glutamate and malate)

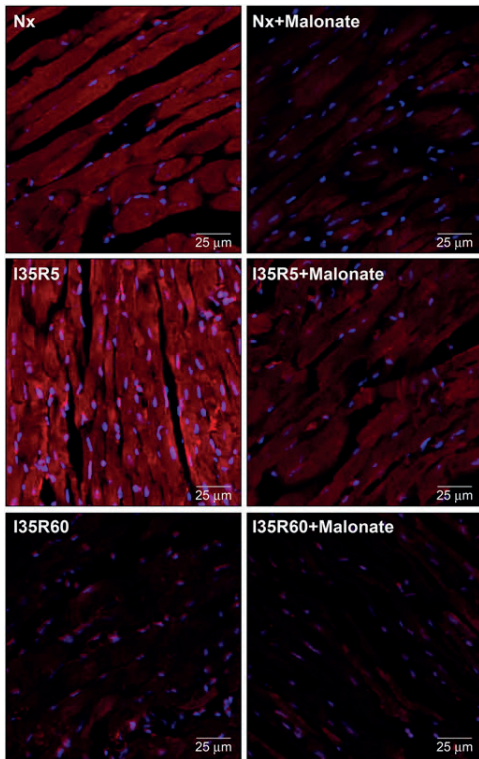


Figure 3 Malonate, given during reperfusion, reduces myocardial ROS production. Representative confocal images depicting MitoSOX staining (in red) (excitation wavelength 488 nm and emission wavelength 520 nm) in hearts perfused under normoxic conditions (40 min, Nx) or submitted to ischaemia (35 min) and 5 or 60 min of reperfusion (I35R5 or I35R60, respectively), both in the absence and presence of malonate 3 mmol/L during the last 15 min of normoxia or only during the first 15 min of reperfusion. This experiment was repeated twice per group. Nuclei are stained in blue.

(Figure 6A). When succinate was also present in the oxygen chamber, an increase in oxygen consumption rates was observed ($P < 0.001$), which was reverted by *in vitro* incubation with malonate ($P < 0.001$). Malonate itself, in the absence of succinate, also induced a small reduction in respiratory rates ($P < 0.001$). Similar results were observed when mitochondria were isolated from hearts submitted to 35 min of ischaemia followed by 5 min of reperfusion (Supplementary material online, Figure S4). Moreover, mitochondria isolated 60 min after reperfusion in hearts treated with malonate during initial reperfusion had significantly increased state 3 respiration rates, when succinate was present in the oxygen chamber, when compared with hearts treated with control Krebs during reperfusion (Figure 6B), confirming a protective effect of malonate in the Langendorff system. Incubation with succinate and rotenone (0.5 $\mu\text{mol/L}$) to assess complex II function resulted in significantly reduced state 2 respiration rates in these hearts (Figure 6C, left) and higher respiratory control rates (Figure 6C, right).

Hydrogen peroxide production increased in mitochondria isolated from normoxic hearts and incubated with complex I substrates and

succinate, and this effect was reverted by *in vitro* incubation with malonate (Figure 6D). The same result was observed when mitochondria were isolated from hearts submitted to 35 min of ischaemia followed by 5 min of reperfusion (Supplementary material online, Figure S4). Retention of calcein within the mitochondrial matrix was decreased by succinate (indicating an increase in mitochondrial permeability), and it was reverted by malonate (Figure 6E). Incubation with cyclosporine A (1 μM) mimicked the effects of malonate (Figure 6E).

3.6. Activation of cytosolic signalling pathways during reperfusion

Total levels of Akt, GSK3 β , and STAT3 were not significantly modified in any experimental group, but a significant reduction in total ERK1/2 signal was observed in extracts from hearts submitted to ischaemia–reperfusion, either treated or not with malonate (Supplemental material online, Table S1). Phosphorylation of ERK1/2 and GSK3 β was significantly increased in extracts obtained from hearts submitted to ischaemia–reperfusion (Figure 7), an effect that was not modified by malonate administered during reperfusion. Phosphorylation of STAT3 was very low in all cases.

4. Discussion

This study demonstrates that transient reversible inhibition of succinate dehydrogenase with malonate at the onset of reperfusion is protective against reperfusion injury, as denoted by significant reductions in the infarct size and LDH release and improved functional recovery. These data correlate with marked changes in the metabolic profile of malonate-treated hearts, including an increased accumulation of succinate, with a reduction in ROS production, both *in vivo* and *in vitro*, in isolated mitochondria, and with preserved mitochondrial function and increased calcein retention in isolated mitochondria.

Chouchani *et al.*¹⁴ have recently demonstrated that succinate is a universal metabolic signature of ischaemia in a variety of tissues. Succinate accumulates in the area at risk due to conversion of fumarate by reversal of succinate dehydrogenase during ischaemia.¹⁴ Rapid succinate re-oxidation during reperfusion by forward succinate dehydrogenase activity was proposed to induce a massive ROS production by reverse electron transport from mitochondrial complex II to complex I.¹⁴ Our present findings demonstrate that the protective effect of malonate is due to reduced reperfusion injury and that damage is, at least in part, mediated by opening of the MPTP. The concentration used in this study, 3 mmol/L, induced modest reductions in LVdevP in the normoxic myocardium, but caused almost a 50% reduction in the infarct size and significant improvements in the LV function. In fact, the magnitude of protection was similar to that obtained when malonate was applied before ischaemia (Supplementary material online, Figure S2), demonstrating that most of the protective effect, if not all, takes place during reperfusion.

Metabolomic analysis of tissue extracts obtained from isolated mice hearts, using ¹H NMR spectroscopy, demonstrated that malonate-treated hearts had significantly increased concentrations of succinate, both when malonate was given under normoxic conditions and during initial reperfusion. These results are apparently in contrast to the reduction in succinate described by Chouchani *et al.*¹⁴ However, these discrepancies can be explained by differences, depending on the timing of administration. Pre-treatment with malonate before ischaemia attenuated succinate accumulation during the ischaemic phase, whereas

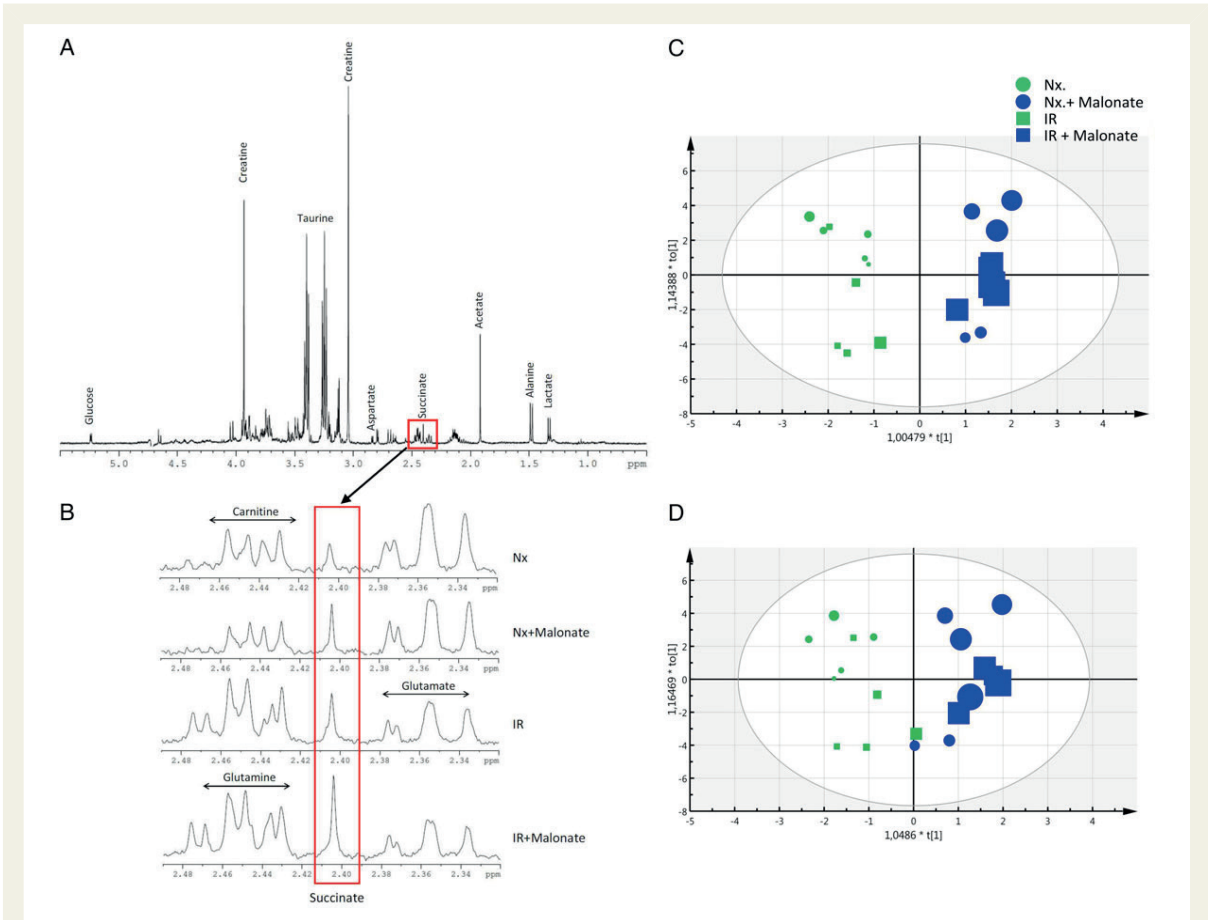


Figure 4 Malonate modifies cardiac metabolism. (A) Representative ^1H NMR spectra obtained from myocardial extracts from an isolated mice heart. (B) Magnification of the area around succinate peak in extracts from hearts perfused under normoxic conditions (40 min, Nx) or submitted to ischaemia (35 min) and reperfusion (5 min) (IR), both in the absence and presence of malonate 3 mmol/L during the last 15 min of normoxia or only during the 5 min of reperfusion. Score plots corresponding to discriminating analysis (OPLS-DA) between samples lacking malonate and those perfused with malonate, both including (C) and excluding (D) malonate itself from the analysis. Dot size indicates succinate concentration ($n = 5-6$ per group).

administration at the onset of reperfusion in this study inhibited their re-oxidation to fumarate during this phase and increased the tissue concentrations of this metabolite. Similar findings were obtained when malonate was administered under normoxic conditions. This result shows that inhibition of re-oxidation of succinate, and not changes in myocardial succinate concentration, is responsible for cardioprotection.

As commented before, malonate would lead to reduced ROS production at the mitochondrial respiratory chain and thus to reduced MPTP opening and infarct size. The hypothesis is supported by the correlation between protection against infarction and reduction in MitoSOX staining in myocardial samples obtained during initial reperfusion. However, MitoSOX is a cationic probe that incorporates to mitochondria maintaining membrane potential. In order to measure mitochondrial ROS production in cardiac tissue, MitoSOX staining should be performed before tissue fixation. However, in cardiac tissue, this approach presents several technical limitations that preclude its use, particularly the exposure of the samples to ischaemia while they

are incubated with the probe. For this reason, we performed MitoSOX staining after fixation. This method provides us information on total rather than mitochondrial ROS production. However, our data in isolated mitochondria support the interpretation that malonate reduces ROS production at the mitochondrial level. In this regard, it is important to point out that although some authors have suggested that ROS production induced by succinate was due to reverse transport of electrons from complex II to I, as it can be inhibited by rotenone, a complex I inhibitor, in C2C12 myoblasts,¹⁴ others have suggested that mitochondrial complex II itself should be considered as a potential source of mitochondrial ROS,^{21,22} with its generation occurring potentially in both the forward and reverse reactions.²² The importance of ROS production by reverse electron transfer from complex II to complex I in MPTP opening, as suggested by our present data and by those reported by Chouchani *et al.*,¹⁴ is further supported by the fact that calcium sensitivity of the MPTP is higher when electrons are provided to complex I rather than to complex II by feeding with malate/glutamate or

Table 1 Quantification of myocardial metabolites ($\mu\text{mol/g}$ fresh tissue) analysed by ^1H NMR spectroscopy in tissue extracts obtained from hearts perfused under normoxic conditions (40 min) or submitted to ischaemia (35 min) and reperfusion (5 min) (IR), both in the absence and in the presence of malonate 3 mmol/L during the last 15 min of normoxia or only during the 5 min of reperfusion

	Normoxia (n = 5)	Normoxia + malonate (n = 6, except for ADP where n = 5)	IR (n = 5)	IR + malonate (n = 5)
ADP	0.28 \pm 0.45	0.27 \pm 0.78	0.08 \pm 0.23*	0.10 \pm 0.00*
AMP	1.29 \pm 0.09	0.900 \pm 0.11	0.29 \pm 0.07*	0.32 \pm 0.02*
ATP	0.17 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01	0.17 \pm 0.05	0.16 \pm 0.02
Acetate	3.11 \pm 0.31	2.01 \pm 0.25	3.52 \pm 0.87	3.36 \pm 0.48
Alanine	0.30 \pm 0.03	0.28 \pm 0.04	0.90 \pm 0.14*	1.04 \pm 0.06*
Aspartate	2.23 \pm 0.22	1.80 \pm 0.34	1.38 \pm 0.17	1.54 \pm 0.12
Betaine	0.17 \pm 0.04	0.11 \pm 0.3	0.10 \pm 0.02	0.12 \pm 0.03
Carnitine	0.63 \pm 0.04	0.51 \pm 0.08	0.32 \pm 0.05*	0.31 \pm 0.05*
Choline	0.17 \pm 0.02	0.12 \pm 0.02	0.19 \pm 0.02	0.18 \pm 0.05
Creatine	7.02 \pm 0.47	5.70 \pm 0.89	4.83 \pm 0.67	4.98 \pm 0.26
Creatine phosphate	0.84 \pm 0.15	1.02 \pm 0.27	0.63 \pm 0.10	0.92 \pm 0.20
Creatinine	0.50 \pm 0.10	0.38 \pm 0.07	0.53 \pm 0.05	0.60 \pm 0.08
Glucose	2.72 \pm 0.26	2.51 \pm 0.60	3.44 \pm 0.70	3.72 \pm 0.25
Glutamate	1.38 \pm 0.09	1.15 \pm 0.14	0.92 \pm 0.31*	1.00 \pm 0.03*
Glutamine	0.28 \pm 0.07	0.27 \pm 0.10	0.76 \pm 0.19*	0.86 \pm 0.22*
Glycine	0.27 \pm 0.04	0.25 \pm 0.07	0.22 \pm 0.05	0.23 \pm 0.04
IMP	0.28 \pm 0.03	0.12 \pm 0.02	0.13 \pm 0.02	0.15 \pm 0.02
Lactate	0.72 \pm 0.05	0.55 \pm 0.06	0.70 \pm 0.15	0.66 \pm 0.06
Malonate	1.04 \pm 0.10	14.92 \pm 2.47**	1.22 \pm 0.23	16.57 \pm 2.44**
NADP ⁺	0.44 \pm 0.04	0.39 \pm 0.06	0.29 \pm 0.03*	0.29 \pm 0.04*
Propionate	0.22 \pm 0.02	0.18 \pm 0.01	0.25 \pm 0.09	0.22 \pm 0.03
Succinate	0.05 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01**	0.06 \pm 0.01*	0.14 \pm 0.01**
Taurine	20.03 \pm 1.13	15.68 \pm 2.49	11.89 \pm 1.68*	11.91 \pm 0.86*
Threonine	0.26 \pm 0.05	0.21 \pm 0.03	0.19 \pm 0.03	0.19 \pm 0.02

Statistical analysis was performed by two-way ANOVA.

* $P < 0.05$ indicates a significant difference between hearts perfused under normoxic conditions and those submitted to ischaemia–reperfusion.

** $P < 0.05$ indicates a significant effect of treatment (malonate vs. control buffer). No interaction between both variables was observed in any case.

succinate/rotenone, respectively.²³ Moreover, in mitochondria respiring on succinate, calcium-dependent MPTP opening is desensitized by rotenone.²⁴

Succinate induced a marked increase in ROS production in isolated mice mitochondria, which was inhibited by malonate. Oxidative stress is known to be a key player in ischaemia–reperfusion injury, in part mediating MPTP opening.^{12,14,25} It has been demonstrated that treatment with *N*-(2-mercaptopropionyl)-glycine, an ROS scavenger, applied at the onset of reperfusion, was able to reduce infarct size in isolated rat hearts⁹ and *in situ* rat and rabbit hearts,²⁶ whereas treatment with amobarbital, a complex I inhibitor, has been shown to reduce infarct size and ROS production in rat hearts.¹⁰ Furthermore, several cardioprotective manoeuvres might work, at least in part, by reducing oxidative or nitrooxidative stress, including ischaemic post-conditioning, whose mechanism of action included activation of the cGMP/protein kinase pathway,²⁷ or remote ischaemic conditioning.⁷

MPTP opening is a key player in ischaemia–reperfusion injury,^{3,28–30} especially after long periods of ischaemia.³¹ Our present results in isolated mice mitochondria show that ROS production correlates with changes in mitochondrial respiration and mitochondrial calcein retention. In our model, succinate depresses mitochondrial function and reduces mitochondrial calcein retention in a cyclosporine A-sensitive

manner, which is suggestive of MPTP opening, whereas malonate counteracts these effects. In fact, it is well known that mitochondrial respiratory chain is the main source of mitochondrial ROS and that MPTP opening is facilitated by ROS during reperfusion.³² These findings, thus, suggest that attenuation of MPTP opening might play a role in the protective effects of malonate.

A large number of studies have demonstrated the involvement of either the RISK or SAFE pathway in cardioprotection elicited by several therapeutic strategies, including ischaemic and pharmacological preconditioning and post-conditioning^{33–37} or remote ischaemic conditioning.^{38,39} Both pathways, which become activated by sequential phosphorylation of several protein kinases (including Akt, ERK1/2, and GSK3 β for the RISK pathway and STAT3 for the SAFE pathway), converge at the mitochondria, where they have been suggested to interfere with MPTP.^{35,40} Our present data show that cardioprotection induced by malonate administered during initial reperfusion did not modify phosphorylation of any of the proteins analysed, indicating that its effects occur downstream of these signalling cascades and supporting a direct action on cardiac mitochondria. Previous studies from our group have demonstrated that cardioprotective interventions may act directly preserving mitochondrial function, without the participation of cytosolic signalling.^{16,20}

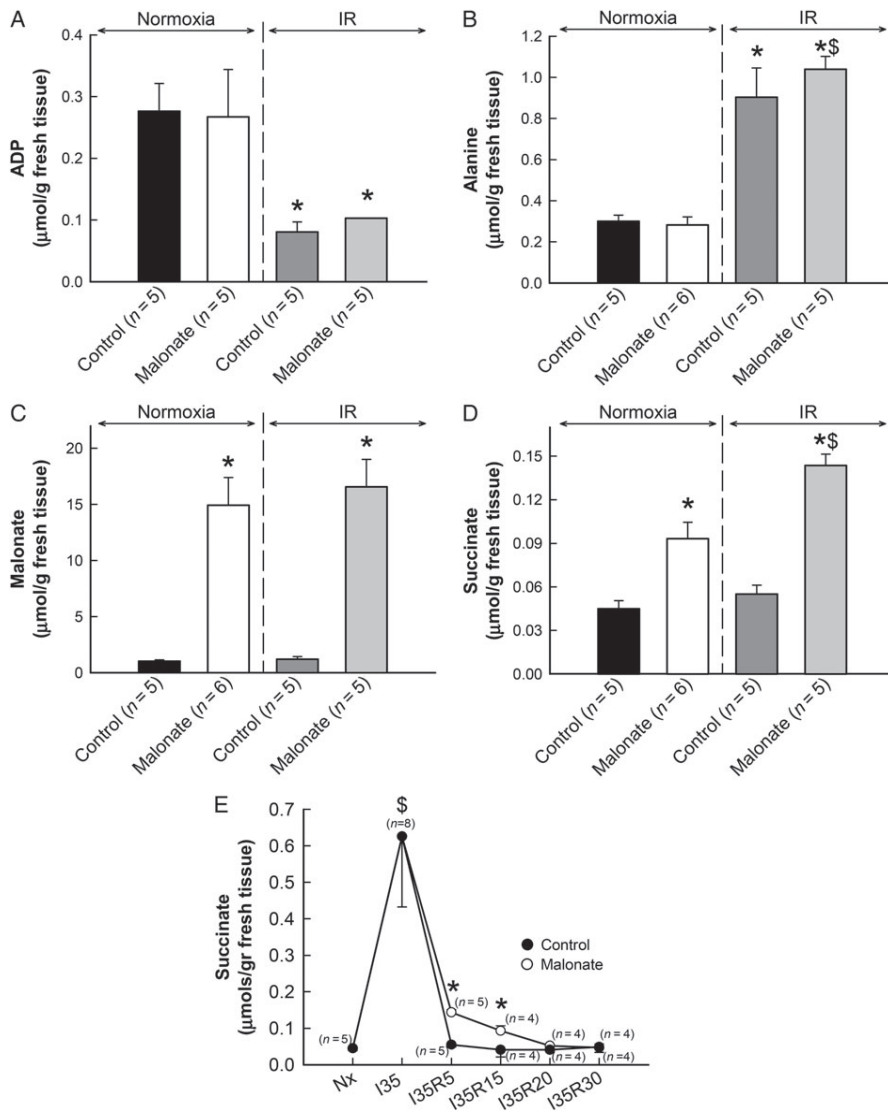


Figure 5 Treatment with disodium malonate increases myocardial succinate. Quantification of ADP [A, two-way ANOVA, IR (effect of ischaemia–reperfusion): $P = 0.036$], alanine (B, two-way ANOVA, IR: $P < 0.001$), malonate (C, two-way ANOVA, treatment: $P < 0.001$), and succinate (D, two-way ANOVA, IR: $P = 0.030$, treatment: $P < 0.001$) by ^1H NMR spectroscopy in myocardial extracts obtained from hearts perfused under normoxic conditions (40 min, Nx) or submitted to ischaemia (35 min) and reperfusion (5 min) (IR), both in the absence and in the presence of malonate 3 mmol/L during the last 15 min of normoxia or only during the 5 min of reperfusion ($n = 5–6$ per group). * $P < 0.05$ indicates significant differences vs. normoxic control hearts; $^{\text{§}}P < 0.05$ indicates significant differences vs. hearts submitted to control ischaemia–reperfusion (for alanine) or vs. normoxic hearts treated with malonate (for succinate). (E) Changes in succinate levels during ischaemia–reperfusion in control hearts and in hearts treated with malonate 3 mmol/L for the first 15 min of reperfusion and in which the experiment was stopped at 5 (I35R5), 15 (I35R15), 20 (I35R20), or 30 (I35R30) min of reperfusion (Nx denotes values during normoxia and I35 at the end of ischaemia) ($n = 4–8$ per group). * $P < 0.05$ indicates significant differences vs. normoxic control hearts. $^{\text{§}}P < 0.05$ indicates significant differences vs. all remaining groups (two-way ANOVA, time of reperfusion: $P < 0.001$, treatment: $P < 0.001$, interaction treatment vs time: $P < 0.001$).

As commented before, 3 mmol/L of malonate induced a reduction in LVdVp in the normoxic myocardium. In this regard, we cannot exclude that part of the protection induced by the succinate dehydrogenase

inhibitor was due to the decrease in cardiac demand associated with that effect. However, the most notable haemodynamic variable influencing infarct size is heart rate,⁴¹ which was not modified by malonate in

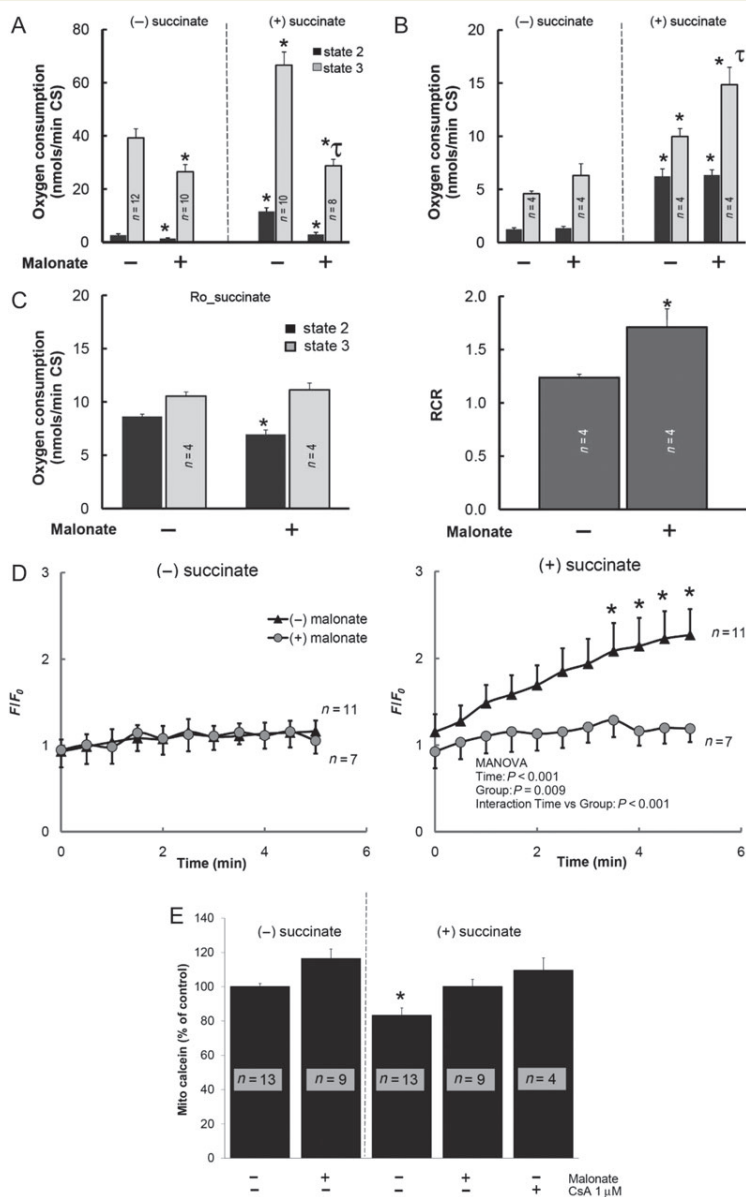


Figure 6 Malonate reduces respiration in succinate-fed mitochondria. (A) Effect of malonate on mitochondrial respiration. Oxygen consumption was monitored in mitochondria isolated from normoxic hearts, using substrates of complex 1 alone [(-) succinate] or with addition of succinate [(+) succinate], in the absence or presence of malonate [(-) or (+) malonate]. State 2 corresponds to basal oxygen consumption and state 3 to ADP-stimulated oxygen consumption. * $P < 0.05$ indicates significant differences vs. group monitored in the absence of succinate and malonate. † $P < 0.05$ indicates differences vs. group monitored in the presence of succinate but not malonate. (B) Effects of malonate on oxygen consumption in mitochondria isolated from hearts submitted to 35 min of ischaemia and 60 min of reperfusion and treated or not in the Langendorff system with malonate 3 mmol/L. Symbols as in (A). (C) Effects of malonate on oxygen consumption and respiratory control rate in these last mitochondria in the presence of rotenone (0.5 μmol/L) and succinate. * $P < 0.05$ indicates significant differences vs. mitochondria isolated from hearts reperfused with control Krebs. (D) Hydrogen peroxide production, monitored in isolated mitochondria submitted to complex I substrate alone or with addition of succinate, in the absence or presence of malonate. F/F_0 corresponds to fluorescence values normalized vs. baseline values (excitation at 320 nm and emission at 440 nm). * $P < 0.05$ indicates differences vs. the corresponding group lacking malonate. (E) Mitochondrial calcein retention, as a measure of mitochondrial permeabilization, monitored fluorometrically (excitation at 485 nm and emission at 530 nm) in mitochondria submitted to complex I substrates alone or with addition of succinate and in the absence or presence of malonate or cyclosporine A. * $P < 0.05$ indicates significant differences vs. group monitored in the absence of succinate and malonate ($n = 4$ –13 per group).

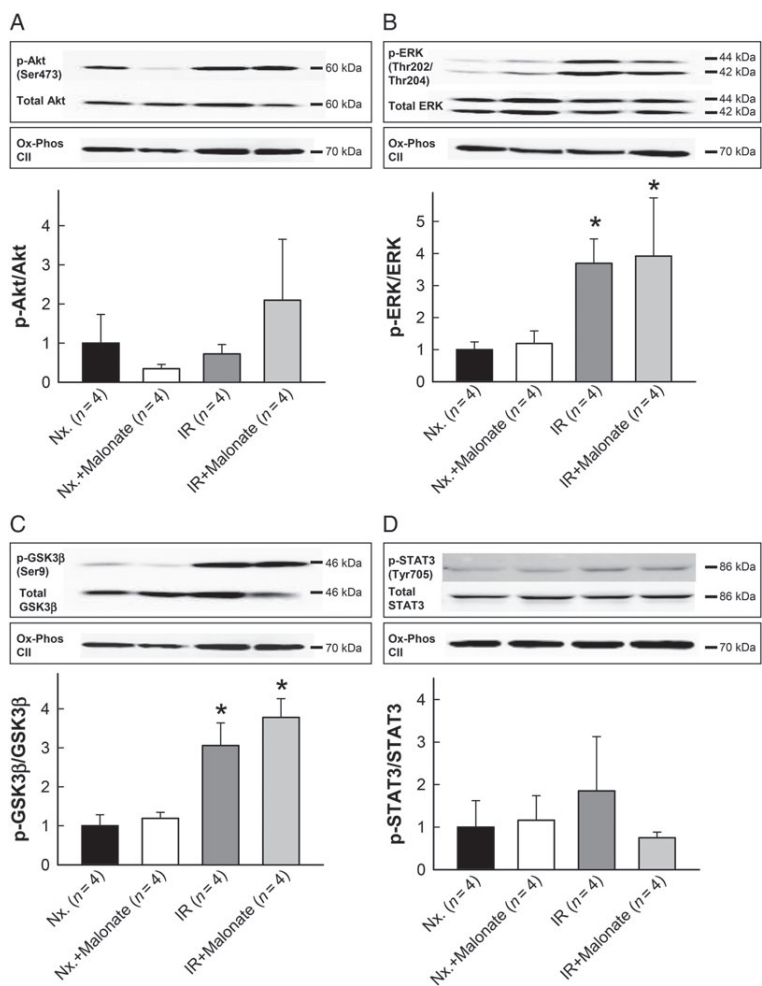


Figure 7 Cardioprotective effects of malonate are independent of RISK or SAFE activation. Representative western blots showing total expression and the phosphorylation state of Akt (A), ERK1/2 (B, two-way ANOVA, IR: $P = 0.009$), GSK3 β (C, two-way ANOVA, IR: $P < 0.001$) (RISK pathway), and STAT3 (D) (SAFE pathway) in cardiac extracts obtained from mice hearts perfused under normoxic conditions (40 min, Nx) or submitted to ischaemia (35 min) and reperfusion (5 min) (IR), both in the absence and in the presence of malonate 3 mmol/L during the last 15 min of normoxia or only during the 5 min of reperfusion ($n = 4$ per group). * $P < 0.05$ indicates significant differences vs. normoxic hearts.

our study. Together with the low magnitude of the reduction in LVdevP, this makes unlikely that the effect of malonate can be explained by its haemodynamic actions.

In conclusion, our data demonstrate that malonate administration during early reperfusion protects against myocardial infarction and suggest that this effect is mediated by a reduction in succinate re-oxidation during reperfusion, leading to reduced ROS production and attenuated MPTP opening during reperfusion.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Cardiovascular Research* online.

Conflict of interest: none declared.

Funding

This work was supported by the Spanish Institute of Health (RETICS-RIC, RD12/0042/0021, and PI14/01431). A.R.-S. has a consolidated Miguel Servet contract. I.B. is a Ramón y Cajal Fellow.

References

- Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1998;**38**:291–300.
- Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia–reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest* 2013;**123**:92–100.
- Halestrap AP, Richardson AP. The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 2015;**78**:129–141.
- Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Inseste J, Rodriguez-Sinovas A, Piper HM. Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc Res* 2012;**94**:168–180.

5. Ruiz-Meana M, Abellan A, Miro-Casas E, Agullo E, Garcia-Dorado D. Role of sarcoplasmic reticulum in mitochondrial permeability transition and cardiomyocyte death during reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;**297**:H1281–H1289.
6. Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, Raimondo S, Cappello S, Gattullo D, Losano G, Pagliaro P. Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel and protein kinase C activation. *Basic Res Cardiol* 2006;**101**:180–189.
7. Albuquerque-Bejar JJ, Barba I, Inserte J, Miro-Casas E, Ruiz-Meana M, Poncelas M, Vilarrosa U, Valls-Lacalle L, Rodriguez-Sinovas A, Garcia-Dorado D. Combination therapy with remote ischemic conditioning and insulin or exenatide enhances infarct size limitation in pigs. *Cardiovasc Res* 2015;**107**:246–254.
8. Garciaarena CD, Fantinelli JC, Caldiz CI, Chiappe dC, Ennis IL, Perez NG, Cingolani HE, Mosca SM. Myocardial reperfusion injury: reactive oxygen species vs. NHE-1 reactivation. *Cell Physiol Biochem* 2011;**27**:13–22.
9. Dirksen MT, Laarman GJ, Simoons ML, Duncker DJ. Reperfusion injury in humans: a review of clinical trials on reperfusion injury inhibitory strategies. *Cardiovasc Res* 2007;**74**:343–355.
10. Stewart S, Lesnfsky EJ, Chen Q. Reversible blockade of electron transport with amobarbital at the onset of reperfusion attenuates cardiac injury. *Transl Res* 2009;**153**:224–231.
11. Xu A, Szczepanek K, Maceyka MW, Ross T, Bowler E, Hu Y, Kenny B, Mehroud C, Desai PN, Baumgarten CM, Chen Q, Lesnfsky EJ. Transient complex I inhibition at the onset of reperfusion by extracellular acidification decreases cardiac injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014;**306**:C1142–C1153.
12. Chen YR, Zweier JL. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circ Res* 2014;**114**:524–537.
13. Drose S, Bleier L, Brandt U. A common mechanism links differently acting complex II inhibitors to cardioprotection: modulation of mitochondrial reactive oxygen species production. *Mol Pharmacol* 2011;**79**:814–822.
14. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijevic D, Sundier SY, Robb EL, Logan A, Nadtochiy SM, Ord EN, Smith AC, Eyasu F, Shirley R, Hu CH, Dare AJ, James AM, Rogatti S, Hartley RC, Eaton S, Costa AS, Brookes PS, Davidson SM, Duchon MR, Saeb-Parsy K, Shattock MJ, Robinson AJ, Work LM, Frezza C, Krieg T, Murphy MP. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* 2014;**515**:431–435.
15. Wojtovich AP, Brookes PS. The complex II inhibitor atpenin A5 protects against cardiac ischemia–reperfusion injury via activation of mitochondrial KATP channels. *Basic Res Cardiol* 2009;**104**:121–129.
16. Sanchez JA, Rodriguez-Sinovas A, Barba I, Miro-Casas E, Fernandez-Sanz C, Ruiz-Meana M, Albuquerque-Bejar JJ, Garcia-Dorado D. Activation of RISK and SAFE pathways is not involved in the effects of Cx43 deficiency on tolerance to ischemia–reperfusion injury and preconditioning protection. *Basic Res Cardiol* 2013;**108**:351.
17. Rodriguez-Sinovas A, Abad E, Sanchez JA, Fernandez-Sanz C, Inserte J, Ruiz-Meana M, Albuquerque-Bejar JJ, Garcia-Dorado D. Microtubule stabilization with paclitaxel does not protect against infarction in isolated rat hearts. *Exp Physiol* 2015;**100**:23–34.
18. Ramirez E, Klett-Mingo M, Ares-Carrasco S, Picatoste B, Ferrarini A, Ruperez FJ, Caro-Vadillo A, Barbas C, Egado J, Tunon J, Lorenzo O. Eplerenone attenuated cardiac steatosis, apoptosis and diastolic dysfunction in experimental type-II diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 2013;**12**:172.
19. Barba I, Jaimez-Auguet E, Rodriguez-Sinovas A, Garcia-Dorado D. 1H NMR-based metabolomic identification of at-risk areas after myocardial infarction in swine. *MAGMA* 2007;**20**:265–271.
20. Ruiz-Meana M, Nunez E, Miro-Casas E, Martinez-Acedo P, Barba I, Rodriguez-Sinovas A, Inserte J, Fernandez-Sanz C, Hernandez V, Vazquez J, Garcia-Dorado D. Ischemic preconditioning protects cardiomyocyte mitochondria through mechanisms independent of cytosol. *J Mol Cell Cardiol* 2014;**68**:79–88.
21. Siebels I, Drose S. Q-site inhibitor induced ROS production of mitochondrial complex II is attenuated by TCA cycle dicarboxylates. *Biochim Biophys Acta* 2013;**1827**:1156–1164.
22. Quinlan CL, Orr AL, Perevoshchikova IV, Treberg JR, Ackrell BA, Brand MD. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *J Biol Chem* 2012;**287**:27255–27264.
23. Fontaine E, Eriksson O, Ichas F, Bernardi P. Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation by electron flow through the respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 1998;**273**:12662–12668.
24. Li B, Chauvin C, De Paulis D, De Oliveira F, Gharib A, Vial G, Lablanche S, Leverve X, Bernardi P, Ovize M, Fontaine E. Inhibition of complex I regulates the mitochondrial permeability transition through a phosphate-sensitive inhibitory site masked by cyclophilin D. *Biochim Biophys Acta* 2012;**1817**:1628–1634.
25. Penna C, Mancardi D, Rastaldo R, Pagliaro P. Cardioprotection: a radical view: free radicals in pre and postconditioning. *Biochim Biophys Acta* 2009;**1787**:781–793.
26. McDonald MC, Zacharowski K, Bowes J, Cuzzocrea S, Thiemermann C. Tempol reduces infarct size in rodent models of regional myocardial ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med* 1999;**27**:493–503.
27. Inserte J, Hernandez V, Vilarrosa U, Abad E, Poncelas-Nozal M, Garcia-Dorado D. Activation of cGMP/protein kinase G pathway in postconditioned myocardium depends on reduced oxidative stress and preserved endothelial nitric oxide synthase coupling. *J Am Heart Assoc* 2013;**2**:e005975.
28. Morciano G, Giorgi C, Bonora M, Punzetti S, Pavesini R, Wiekowski MR, Campo G, Pinton P. Molecular identity of the mitochondrial permeability transition pore and its role in ischemia–reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 2015;**78**:142–153.
29. Griffiths EJ, Halestrap AP. Protection by cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1993;**25**:1461–1469.
30. Bernardi P, Di Lisa F. The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 2015;**78**:100–106.
31. Ruiz-Meana M, Inserte J, Fernandez-Sanz C, Hernandez V, Miro-Casas E, Barba I, Garcia-Dorado D. The role of mitochondrial permeability transition in reperfusion-induced cardiomyocyte death depends on the duration of ischemia. *Basic Res Cardiol* 2011;**106**:1259–1268.
32. Di Lisa F, Canton M, Carpi A, Kaludercic N, Menabo R, Menazza S, Semenzato M. Mitochondrial injury and protection in ischemic pre- and postconditioning. *Antioxid Redox Signal* 2011;**14**:881–891.
33. Fan WJ, van Vuuren D, Genade S, Lochner A. Kinases and phosphatases in ischaemic preconditioning: a re-evaluation. *Basic Res Cardiol* 2010;**105**:495–511.
34. Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, Yellon DM. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;**288**:H971–H976.
35. Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Heusch G, Schulz R. Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. *Basic Res Cardiol* 2010;**105**:771–785.
36. Heusch G, Musiolik J, Gedik N, Skyschally A. Mitochondrial STAT3 activation and cardioprotection by ischemic postconditioning in pigs with regional myocardial ischemia/reperfusion. *Circ Res* 2011;**109**:1302–1308.
37. Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia–reperfusion injury. *Physiol Rev* 2008;**88**:581–609.
38. Heusch G, Botker HE, Przyklenk K, Redington A, Yellon D. Remote ischemic conditioning. *J Am Coll Cardiol* 2015;**65**:177–195.
39. Hausenloy DJ, Iliodromitis EK, Andreadou I, Papalouis A, Gritsopoulos G, Anastasiou-Nana M, Kremastinos DT, Yellon DM. Investigating the signal transduction pathways underlying remote ischemic conditioning in the porcine heart. *Cardiovasc Drugs Ther* 2012;**26**:87–93.
40. Heusch G, Boengler K, Schulz R. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: the Holy Grail of cardioprotection. *Basic Res Cardiol* 2010;**105**:151–154.
41. Heusch G. Heart rate in the pathophysiology of coronary blood flow and myocardial ischemia: benefit from selective bradycardic agents. *Br J Pharmacol* 2008;**153**:1589–1601.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

SUCCINATE DEHYDROGENASE INHIBITION WITH MALONATE DURING REPERFUSION REDUCES INFARCT SIZE BY PREVENTING MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION.

Laura Valls-Lacalle, Ignasi Barba, Elisabet Miró-Casas, Juan José Alburquerque-Béjar, Marisol Ruiz-Meana, Marina Fuertes-Agudo, Antonio Rodríguez-Sinovas*, David García-Dorado*.

Laboratory of Experimental Cardiology, Department of Cardiology, Vall d'Hebron University Hospital and Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

Short title: Succinate reduces reperfusion injury.

* Corresponding authors:

Dr. David Garcia-Dorado OR Dr. Antonio Rodríguez-Sinovas.

Laboratorio de Cardiología Experimental, Servicio de Cardiología, Vall d'Hebron University Hospital and Research Institute, Pg. Vall d'Hebron 119-129, Universitat Autònoma de Barcelona, 08035 Barcelona, Spain. Phone: +34 934894038, Fax: +34 934894032.

E-mails:

dgdorado@vhebron.net

antonio.rodriquez.sinovas@vhir.org

SUPPLEMENTAL METHODS.

The present study conforms to the Directive 2010/63/EU of the European Parliament on protection of animals used for scientific purposes and to the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publications N°. 85-23, revised 1996, updated in 2011). The study was approved by the Ethics Committee of our institution (reference 31/15 CEEA).

Experimental preparation.

Adult male C57BL/6J mice (25-30 g, 9-11 weeks old) were anesthetized with sodium pentobarbital (1.5 g/kg, I.P.) and submitted to a bilateral thoracotomy. Whole hearts were quickly excised and retrogradely perfused through the aorta with an oxygenated (95% O₂ : 5% CO₂) Krebs solution at 37°C (in mmol/L: NaCl 118, KCl 4.7, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 1.8, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, and glucose 11, pH 7.4) in a constant flow Langendorff system as previously described¹. Flow was initially adjusted to produce a perfusion pressure of 80-90 mmHg (normoxic conditions). Left ventricular (LV) pressure was monitored with a water-filled latex balloon connected to a pressure transducer, placed in the left ventricle and inflated to obtain a LV end-diastolic pressure (LVEDP) between 6 and 8 mmHg.

Study protocols.

All signals were recorded in a computer using a ML119 PowerLab interface and Chart 5.0 software (AdInstruments, Castle Hill, Australia).

Concentration-response curves to disodium malonate during normoxia.

After 15 min of equilibration, four hearts were treated, under normoxic conditions, with increasing concentrations of disodium malonate (C₃H₂O₄Na₂, Sigma-Aldrich, reference M4795), ranging from 0.03 to 30 mmol/L (each concentration applied for 15 min; directly dissolved in Krebs buffer). Sodium concentration and osmolarity was matched, in all cases, to that present in the highest malonate concentration, by adding NaCl to the buffer. Lactate dehydrogenase (LDH) release was determined at the end of each concentration, and infarct size was measured at the end of the experiments. Concentration-response curves for LV developed pressure (LVdevP), LV end-diastolic pressure (LVEDP), heart rate and perfusion pressure were adjusted to sigmoid curves ($y=y_0+a/[1+\exp(-x-x_0)/b]$) to determine the concentration causing the half-maximal effect (EC50) and the maximal effect (Emax). LVdevP was defined as systolic pressure-LVEDP.

Effects of disodium malonate on ischemia-reperfusion injury.

The effects of malonate on ischemia-reperfusion injury were initially tested in 29 isolated mice hearts, in which the drug was given both before ischemia and during reperfusion. All hearts were submitted, after a period of 30 min of equilibration, to 35 min of global ischemia followed by 60 min of reperfusion. During ischemia, hearts were immersed in hypoxic Krebs solution to maintain temperature at 37°C (in mmol/L: NaCl 118, KCl 4.7, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 1.8, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, and sucrose 11, pH 7.4, bubbled with 95% N₂ : 5% CO₂). Hearts were pretreated, for 15 minutes before ischemia, with 1 (n=7), 3 (n=7) or 10 (n=7) mmol/L of malonate, that was continued for the entire reperfusion. These concentrations were in the range of the EC50 determined in the concentration-response curves under normoxic conditions. Results obtained were compared with those obtained in 8 control hearts, submitted to ischemia-reperfusion with no additional intervention. Sodium concentration and osmolarity was matched, in

all cases, to that present in the group treated with 10 mmol/L of malonate, by adding NaCl to the buffer. Infarct size, LDH release, peak hypercontracture (difference between the maximal LVEDP value during the first minutes of reperfusion and that at the end of ischemia) and functional recovery (expressed as percentage of baseline LVdevP) were determined in each group.

To assess whether administration of malonate was protective when given only during reperfusion, 15 additional hearts were treated with either control buffer (n=8) or Krebs containing malonate 3 mmol/L (n=7), beginning at the onset of reperfusion and for its first 15 minutes. This concentration was selected as the lowest having protective effects in the previous phase of the study, and avoiding major depressing actions in normoxic myocardium. Infarct size, LDH release, peak hypercontracture and functional recovery were compared between both groups.

Finally, in 8 additional experiments, and in order to test a possible involvement of MPTP opening on malonate actions, the effects of cyclosporine A (0.5 μ mol/L), administered during the first 5 min of reperfusion, on infarct size were compared with results obtained in a control group (n=4/group).

LDH release and infarct size measurement.

LDH release was monitored in samples from the coronary effluent by spectrophotometry, as previously described². Infarct size was determined in cardiac slices by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining at the end of reperfusion². The relative contribution of necrosis and apoptosis to final infarct size in our protocol was assessed in two additional hearts after 1 hour of reperfusion and compared with that found in two normoxic hearts, by propidium iodide or terminal deoxynucleotidyl transferase nick end labeling (TUNEL) staining, respectively, as previously described^{3,4}. TUNEL staining was performed in frozen tissue samples. Negative and positive controls for apoptosis were incubated in buffer lacking active terminal deoxynucleotidyl transferase or supplemented with Universal Nuclease (Pierce, 1000 U/mL, reference 88701), respectively.

Quantification of reactive oxygen species (ROS) production in cardiac tissue.

To quantify ROS production in cardiac tissue, twelve additional mice hearts were submitted to 40 min of normoxia or to 35 min of global ischemia followed by 5 min of reperfusion, and treated or not with malonate 3 mmol/L during the last 15 minutes of normoxia or only during the 5 min of reperfusion. Hearts were quickly removed, fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and cut in sections (5 μ m). Myocardial sections were incubated with MitoSOX Red (5 μ M, Invitrogen) for 15 min (at room temperature and darkness) to assess ROS production by confocal microscopy as previously described (excitation wavelength 488 nm, emission wavelength 520 nm)⁵. Nuclei were stained with Hoeschst 33342 (10 μ g/mL).

Analysis of myocardial metabolism.

In most of the experiments aimed to assess the mechanisms of malonate protection, reperfusion was stopped after 5 min. This time was selected to maximize differences in the variables analyzed¹. Cardiac metabolites were analyzed by ¹H NMR spectroscopy in 21 additional mice hearts submitted to 40 min of normoxia or to 35 min of global ischemia followed by 5 min of reperfusion, and treated or not with malonate 3 mmol/L during the last 15 minutes of normoxia or only during the 5 min of reperfusion (n=5-

6/group). Cardiac metabolites were extracted using the methanol:chloroform method as described previously⁶. Extracts were dissolved in 600 ml of deuterium oxide containing 1 mmol/L of TSP (3-(trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-d₄ acid) and ¹H NMR spectra were acquired on a vertical bore 9.4T magnet interfaced to a Bruker Avance 400 spectrometer. Each spectrum consisted in the accumulation of 64 scans using a fully relaxed pulse-and-acquire pulse sequence with presaturation of the residual water signal. Thirty-two additional mice hearts were used to assess kinetics of succinate recovery during ischemia-reperfusion, in preparations treated or not with malonate 3 mmol/L during the first 15 min of reperfusion. Four additional hearts were treated before ischemia with malonate 3 mmol/L, for 15 min, to assess the effects of pretreatment on succinate concentrations at the end of the ischemic period.

Analysis of mitochondrial function.

Mitochondrial isolation.

Mouse mitochondria were isolated from whole hearts as previously described⁷. Briefly, myocardial tissue was minced in cold isolation buffer (in mmol/L: KCl 100, MOPS 5, pH 7.4, EGTA 2) and homogenized with a Potter-Elvehjem device. Tissue extract was centrifuged at 750g for 5min, and supernatant was placed on ice. The resulting pellet was briefly incubated with proteinase K (2mg/g wet tissue) and centrifuged again (750g, 5min). Supernatants were recovered and centrifuged at 5000 g. The resulting pellet corresponded to the mitochondrial fraction. Protein was determined by Bradford assay.

Mitochondrial oxygen consumption.

Mitochondrial respiration was assessed with a Clark-type oxygen electrode (Hansatech, UK) at room temperature. Mitochondria were incubated in assay buffer (in mmol/L: KCl 100, MOPS 5, pH 7.4, KH₂PO₄ 5, MgCl₂ 1), and oxygen consumption was monitored after addition of malate (2 mmol/L) plus glutamate (5 mmol/L) (state 2) and 0.4 mmol/L of ADP (state 3), in the absence or presence of succinate (6 mmol/L) and malonate (3 mmol/L). All oxygen consumption rates were expressed as nmols oxygen/min*CS (CS; citrate synthase units). In some experiments, mitochondria were incubated with succinate and rotenone (0.5 μmol/L) to assess complex II function.

ROS production.

Mitochondrial H₂O₂ production was determined at 440 nm (excitation at 320 nm) using a 96-microplate fluorometer (SpectraMax GeminiXS, Molecular Devices) as previously described⁷. Mitochondria were resuspended in assay buffer supplemented with homovanillic acid (0.1 mmol/L) and horseradish peroxidase (5 U/mL). Hydrogen peroxide production was stimulated after addition of the same respiration substrates used in oxygen consumption experiments, without ADP. Changes in fluorescence were monitored during 5 minutes and normalized vs. baseline fluorescence in each group.

Calcein retention capacity.

Mitochondrial permeabilization was quantified fluorometrically as previously described⁷. Mitochondria were loaded with 10 μmol/L calcein-AM for 5 min. After quick centrifugation, mitochondria were resuspended in assay buffer containing the same respiration substrates, excluding ADP. After 5 min of incubation, mitochondria were centrifuged and the fluorescence retained in pellets was measured at 530 nm using a fluorometer (SpectraMax GeminiXS, MolecularDevices) (excitation at 485 nm). Changes in fluorescence were expressed as percentage of calcein retained by mitochondria and normalized by fluorescence values obtained in group treated with

malate plus glutamate alone. A decrease in fluorescence indicates mitochondrial permeabilization, suggestive of MPTP opening.

Activation of cytosolic signaling pathways.

Western blot.

The degree of activation of the RISK and SAFE pathways was studied in myocardial samples obtained from 16 additional hearts submitted to 40 min of normoxia or to 35 min of global ischemia followed by 5 min of reperfusion, and treated or not with malonate 3 mmol/L during the last 15 minutes of normoxia or only during the 5 min of reperfusion (n=4/group (4 groups: normoxia, normoxia+malonate, ischemia-reperfusion, ischemia-reperfusion+malonate)). Activation of RISK was determined by analysis of the phosphorylation state of Akt, ERK1/2, and GSK3 β , whereas STAT3 phosphorylation was used to assess an involvement of the SAFE protective pathway¹. Samples were quickly frozen in liquid nitrogen, in order to minimize protein degradation and then homogenized (Dixax 600 homogenizer, Heidolph, Germany) in homogenization ice-cold buffer (in mmol/L: Tris-HCl 20, NaCl 140, EDTA 0.8 (pH 7.8), NaF 1, Na₃VO₄ 1, and a protease cocktail inhibitor (1%)). Total cardiac extracts were obtained from the supernatant after centrifugation at 750 g for 10 minutes (4°C). Protein extracts were electrophoretically separated on 10% polyacrylamide gels. Both phosphorylated and total forms of Akt, ERK-1/2, GSK3 β , and STAT3 were analyzed by Western blot according to standard procedures¹. The ratio between phosphorylated and total forms was determined in all cases.

Antibodies.

The following antibodies were used: anti-phospho-Akt (Ser473), anti-phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), anti-phospho-GSK3 β (Ser9), and anti-phospho-STAT3 (Tyr705) (Cell Signaling, USA, references #9271, #9101, #9323, and #9131, respectively, dilution 1:500)) to assess the phosphorylation state of the different proteins analyzed, and anti-Akt, anti-ERK1/2, anti-GSK3 β , and anti-STAT3 (Cell Signaling, USA, references #9272, #4695, #9315, and #9132, respectively, dilution 1:1000) to assess their total expression. As loading control, mouse anti-human succinate-ubiquinol oxidoreductase (Ox-Phos Complex II, Molecular Probes, Eugene, OR, USA, dilution 1:2500) was used.

Statistics.

Data are expressed as mean \pm SEM. Differences were assessed by one-way ANOVA (infarct size, cumulative LDH release, and analysis of MPTP opening and mitochondrial calcein retention) or repeated measures ANOVA (MANOVA) (changes in LVdevP, heart rate, EDLVP or perfusion pressure during reperfusion or ROS production in isolated mitochondria) and Dunnett's *post hoc* test. Metabolic and Western Blot data were analyzed by two-way ANOVA test. Differences were considered significant when $p < 0.05$. For pattern recognition purposes, NMR spectra were imported into Simca V13 software (Umetrics) where both unsupervised (Principal component analysis (PCA)) and supervised OPLS methods were applied.

SUPPLEMENTAL RESULTS.

Effects of disodium malonate, administered before ischemia and during reperfusion, on ischemia-reperfusion injury in isolated mice hearts.

Infarct size was $50.77 \pm 5.30\%$ of ventricular mass in control hearts submitted to 35 min of global ischemia followed by 60 min of reperfusion, and it was not modified by treatment with 1 mmol/L of malonate. In contrast, hearts pretreated with malonate 3 and 10 mmol/L depicted a significantly reduced infarct size as compared with controls (Supplementary Fig. 2A). These data correlated with a reduction in LDH release during reperfusion (Supplementary Fig. 2B) and a significant improvement in functional recovery, expressed as percentage of baseline LVdevP, at the end of reperfusion (Supplementary Fig. 2C).

References

1. Sanchez JA, Rodriguez-Sinovas A, Barba I, Miro-Casas E, Fernandez-Sanz C, Ruiz-Meana M, Albuquerque-Bejar JJ, Garcia-Dorado D. Activation of RISK and SAFE pathways is not involved in the effects of Cx43 deficiency on tolerance to ischemia-reperfusion injury and preconditioning protection. *Basic Res Cardiol* 2013;**108**:351
2. Rodriguez-Sinovas A, Abad E, Sanchez JA, Fernandez-Sanz C, Inserte J, Ruiz-Meana M, Albuquerque-Bejar JJ, Garcia-Dorado D. Microtubule stabilization with paclitaxel does not protect against infarction in isolated rat hearts. *Exp Physiol* 2015;**100**:23-34.
3. Rodriguez-Sinovas A, Garcia-Dorado D, Pina P, Ruiz-Meana M, Soler-Soler J. Effect of sarcolemmal rupture on myocardial electrical impedance during oxygen deprivation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;**288**:H1396-H1403
4. Ihara M, Asanuma H, Yamazaki S, Kato H, Asano Y, Shinozaki Y, Mori H, Minamino T, Asakura M, Sugimachi M, Mochizuki N, Kitakaze M. An interaction between glucagon-like peptide-1 and adenosine contributes to cardioprotection of a dipeptidyl peptidase 4 inhibitor from myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015;**308**:H1287-H1297
5. Ramirez E, Klett-Mingo M, Ares-Carrasco S, Picatoste B, Ferrarini A, Ruperez FJ, Caro-Vadillo A, Barbas C, Egido J, Tunon J, Lorenzo O. Eplerenone attenuated cardiac steatosis, apoptosis and diastolic dysfunction in experimental type-II diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 2013;**12**:172
6. Barba I, Jaimez-Auguets E, Rodriguez-Sinovas A, Garcia-Dorado D. ¹H NMR-based metabolomic identification of at-risk areas after myocardial infarction in swine. *MAGMA* 2007;**20**:265-271.
7. Ruiz-Meana M, Nunez E, Miro-Casas E, Martinez-Acedo P, Barba I, Rodriguez-Sinovas A, Inserte J, Fernandez-Sanz C, Hernando V, Vazquez J, Garcia-Dorado D. Ischemic preconditioning protects cardiomyocyte mitochondria through mechanisms independent of cytosol. *J Mol Cell Cardiol* 2014;**68**:79-88.

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS.

Supplemental Figure 1. (A) Confocal images showing necrotic cell death, as determined by staining with propidium iodide (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), in cardiac sections from mice hearts submitted to normoxia (Nx.) or to 35 min of ischemia followed by 1 h of reperfusion (IR). Propidium iodide was added to Krebs buffer during the last 5 min of the experiments. Extensive signal was observed after 1 h of reperfusion but not in hearts perfused with normoxic Krebs. (B) Optical microscopy images showing TUNEL staining (brown signal), indicative of apoptosis in hearts perfused under normoxic conditions or after 1 h of reperfusion. Nuclei were counterstained with methyl green (green/blue signal). Negative (Control (-)) and positive (Control (+)) controls for apoptosis were incubated in buffer lacking active terminal deoxynucleotidyl transferase or supplemented with Universal Nuclease (1000 U/mL), respectively. Contribution of apoptosis to infarct size after 1 h of reperfusion was negligible.

Supplemental Figure 2. Effects of disodium malonate, given before ischemia and during reperfusion at three different concentrations (1, 3 or 10 mmol/L), on infarct size (A), cumulative LDH release (B) and functional recovery during reperfusion (C) in isolated mice hearts submitted to 35 min of ischemia followed by 60 min of reperfusion. * ($p < 0.05$) indicates significant differences vs. control hearts ($n = 7-8/\text{group}$).

Supplemental Figure 3. Quantification of succinate by ^1H NMR spectroscopy, at the end of the ischemic period (35 min), in myocardial extracts obtained from hearts treated or not during the stabilization period with malonate 3 mmol/L. * ($p < 0.05$) indicate significant differences vs. values obtained in control hearts.

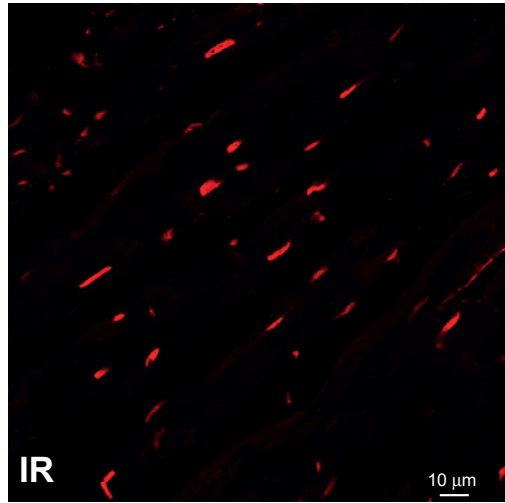
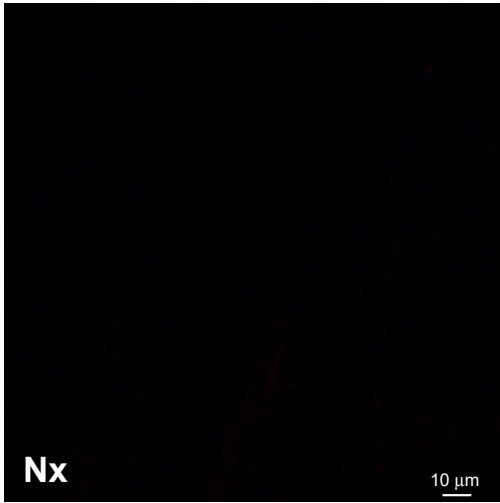
Supplemental Figure 4. (A) Effect of malonate on mitochondrial respiration. Oxygen consumption was monitored in mitochondria isolated from hearts submitted to 35 min of ischemia and 5 min of reperfusion, using substrates of complex 1 alone [(-) succinate] or with addition of succinate [(+) succinate], in the absence or presence of malonate [(-) or (+) malonate]. State 2 corresponds to basal oxygen consumption and state 3 to ADP-stimulated oxygen consumption. * ($p < 0.05$) indicates significant differences vs. group monitored in the absence of succinate and malonate. τ ($p < 0.05$) indicates differences vs. group monitored in the presence of succinate but not malonate. (B) Hydrogen peroxide production, monitored in isolated mitochondria submitted to complex 1 substrates alone or with addition of succinate, in the absence or presence of malonate. F/F0 corresponds to fluorescence values normalized vs. baseline values (excitation at 320 nm, emission at 440 nm). * ($p < 0.05$) indicates differences vs. the corresponding group lacking malonate.

Supplemental Table 1. Total protein quantification for Akt, ERK1/2, GSK3 β (RISK pathway) and STAT3 (SAFE pathway), expressed as ratio of Ox-Phos Complex II (OxPhos CII) signal, in extracts from hearts perfused under normoxic conditions (40 min) or submitted to ischemia (35 min) and reperfusion (5 min) (IR), both in the absence or presence of malonate 3 mmol/L during the last 15 min of normoxia or only during the 5 min of reperfusion (n=4/group).

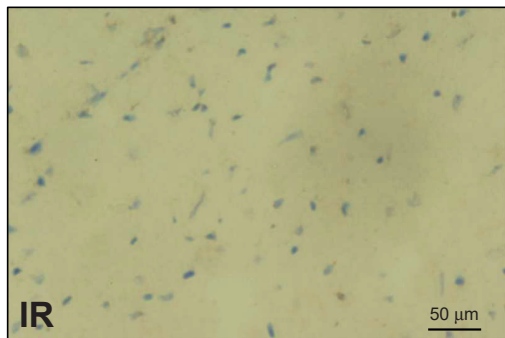
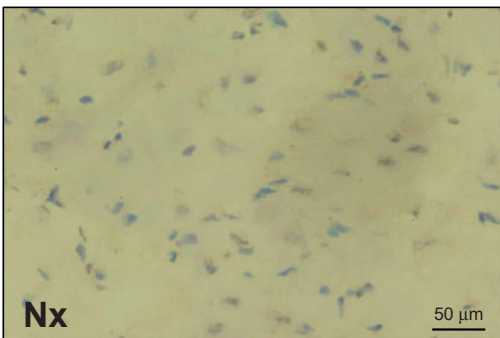
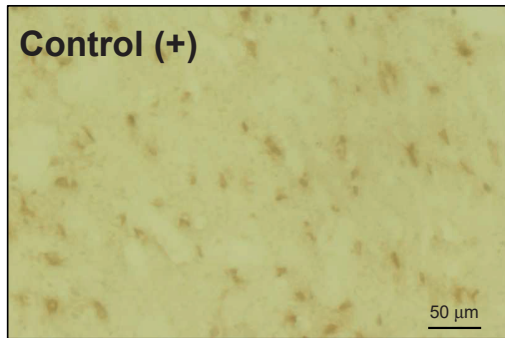
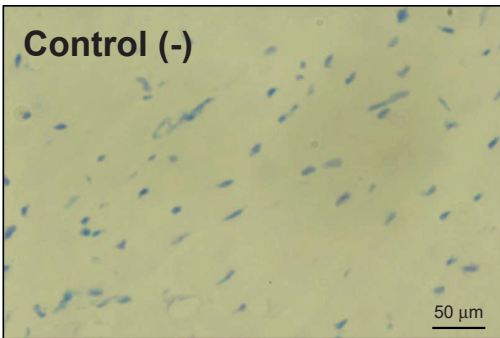
	Normoxia (n=4)	Normoxia + Malonate (n=4)	IR (n=4)	IR + Malonate (n=4)
Akt/OxPhos CII	1.00 \pm 0.32	1.46 \pm 0.07	0.97 \pm 0.12	0.68 \pm 0.24
ERK/OxPhos CII	1.00 \pm 0.19	1.00 \pm 0.23	0.55 \pm 0.10*	0.62 \pm 0.18*
GSK3 β /OxPhos CII	1.00 \pm 0.12	1.34 \pm 0.15	1.00 \pm 0.04	0.83 \pm 0.08
STAT3/OxPhos CII	1.00 \pm 0.35	1.10 \pm 0.17	1.27 \pm 0.09	1.15 \pm 0.10

* ($p < 0.05$, two-way ANOVA) indicate a significant difference between hearts perfused under normoxic conditions and those submitted to ischemia-reperfusion. No significant effects of treatment (malonate or control buffer) were observed, nor interactions between the perfusion protocol and treatment.

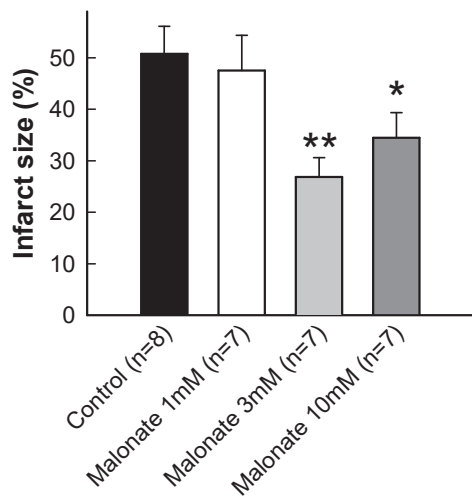
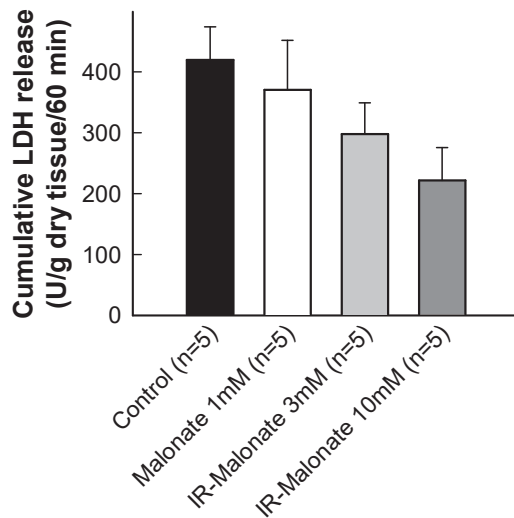
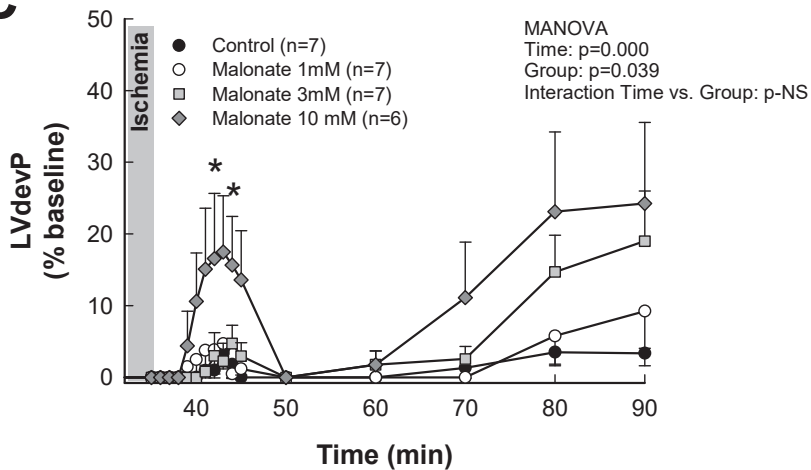
A

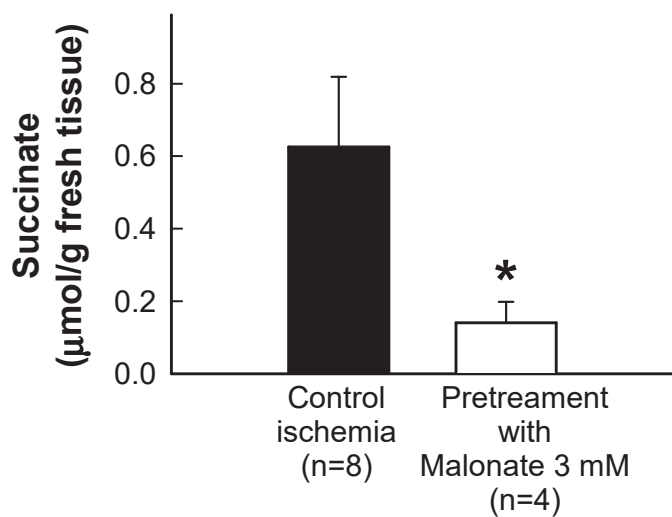


B

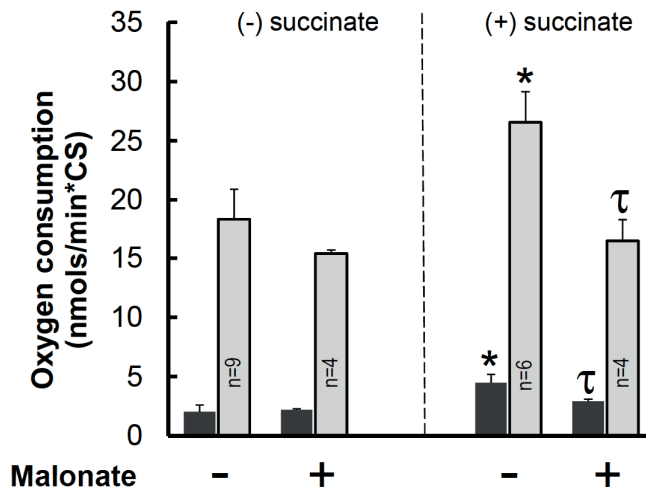
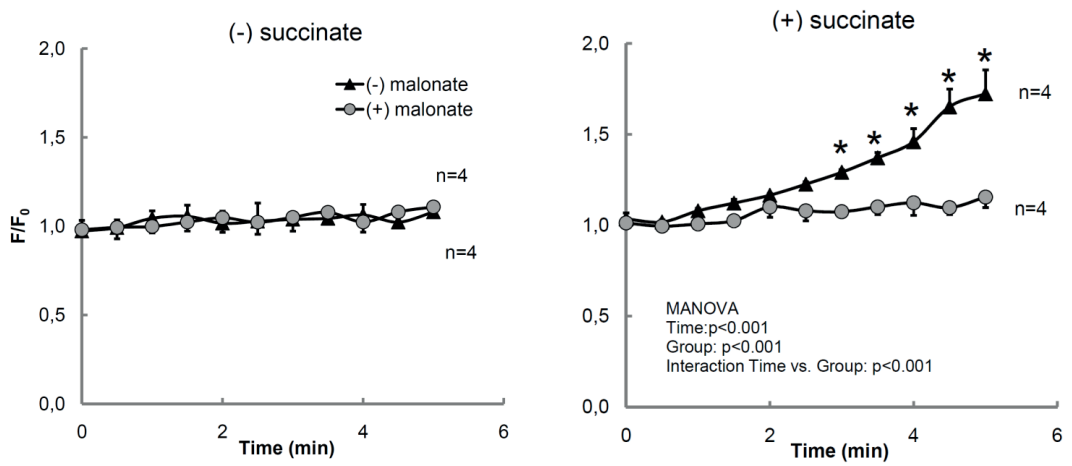


Supplemental Figure 1

A**B****C****Supplemental Figure 2**



Supplemental Figure 3

A**B****Supplemental Figure 4**

ARTICLE2

Selective Inhibition of Succinate Dehydrogenase in Reperfused Myocardium with Intracoronary Malonate Reduces Infarct Size.

Valls-Lacalle,L., Barba,I., Miro-Casas,E., Ruiz-Meana,M., Rodriguez-Sinovas,A., and Garcia-Dorado,D.

Sci Rep. 2018 Feb 5;8(1):2442. doi: 10.1038/s41598-018-20866-4.

Factor d'impacte (2018): 4,011, Q1.

Selective Inhibition of Succinate Dehydrogenase in Reperfused Myocardium with Intracoronary Malonate Reduces Infarct Size

Laura Valls-Lacalle^{1,2}, Ignasi Barba^{1,2}, Elisabet Miró-Casas^{1,2}, Marisol Ruiz-Meana^{1,2}, Antonio Rodríguez-Sinovas^{1,2}  & David García-Dorado^{1,2}

Inhibition of succinate dehydrogenase (SDH) with malonate during reperfusion reduces infarct size in isolated mice hearts submitted to global ischemia. However, malonate has toxic effects that preclude its systemic administration in animals. Here we investigated the effect of intracoronary malonate on infarct size in pigs submitted to transient coronary occlusion. Under baseline conditions, 50 mmol/L of intracoronary disodium malonate, but not lower concentrations, transiently reduced systolic segment shortening in the region perfused by the left anterior descending coronary artery (LAD) in open-chest pigs. To assess the effects of SDH inhibition on reperfusion injury, saline or malonate 10 mmol/L were selectively infused into the area at risk in 38 animals submitted to ischemia-reperfusion. Malonate improved systolic shortening in the area at risk two hours after 15 min of ischemia (0.18 ± 0.07 vs 0.00 ± 0.01 a.u., $p = 0.025$, $n = 3$). In animals submitted to 40 min of ischemia, malonate reduced reactive oxygen species production (MitoSOX staining) during initial reperfusion and limited infarct size (36.46 ± 5.35 vs $59.62 \pm 4.00\%$, $p = 0.002$, $n = 11$), without modifying reperfusion arrhythmias. In conclusion, inhibition of SDH with intracoronary malonate during early reperfusion limits reperfusion injury and infarct size in pigs submitted to transient coronary occlusion without modifying reperfusion arrhythmias or contractile function in distant myocardium.

The mechanisms of reperfusion injury are complex, but increased reactive oxygen species (ROS) production occurring short after flow restoration may play a key role¹, modulating both cardiomyocyte hypercontracture and mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening^{2,3}. Although low concentrations of both hydrogen peroxide and superoxide have been shown beneficial, mainly by activating prosurvival pathways, including those of preconditioning^{4,5}, the massive ROS production occurring at the time of reperfusion is clearly detrimental. Indeed, ROS scavengers have been shown to be able to reduce myocardial infarct size in several animal models^{6,7}. Furthermore, mutant mice overexpressing ROS scavenging enzymes, as superoxide dismutase, catalase or glutathione peroxidase, have reduced infarctions^{8,9}, whereas those deficient in such enzymes are less resistant to reperfusion injury¹⁰. In addition, cardiac myocytes respond to H₂O₂ mimicking responses occurring after simulated ischemia-reperfusion, including a decrease in contraction amplitude and stimulation of the Na⁺-H⁺ exchanger¹¹.

The potential sources of ROS in post-ischemic tissues include xanthine oxidase, NADPH oxidase, nitric oxide synthase, and especially the mitochondria¹. Mitochondria might be, indeed, a major source of ROS generation during reperfusion in highly metabolically active tissues, like heart and brain. Electrons moving through the mitochondrial respiratory chain have the potential, during reperfusion, to leak and reduce O₂ to superoxide (O₂⁻), especially within mitochondrial complexes I and III^{11,12}. Accordingly, complex I inhibition with amobarbital at the onset of reperfusion reduces infarct size in isolated rat or mice hearts submitted to ischemia-reperfusion in association with diminished ROS production^{13,14}. In addition, different complex II or succinate dehydrogenase (SDH) inhibitors, including the reversible malonate, are able to modulate ROS production in isolated

¹Cardiovascular Diseases Research Group, Department of Cardiology, Vall d'Hebron University Hospital and Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. ²Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.R.-S. (email: antonio.rodriguez.sinovas@vhir.org) or D.G.-D. (email: dgdorado@vhebron.net)

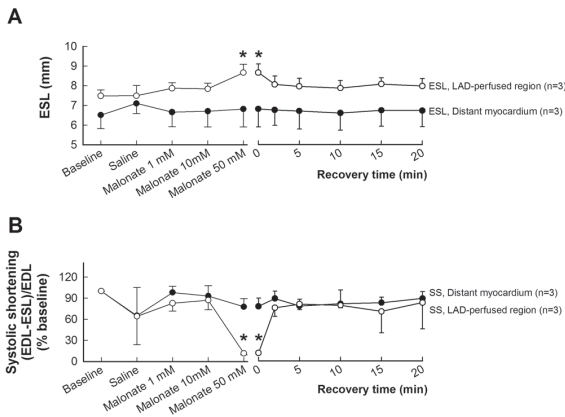


Figure 1. Effects of succinate dehydrogenase inhibition with malonate in myocardial function in the LAD-perfused region in pigs under baseline conditions. Changes in end-systolic length (ESL) (A) and systolic segment shortening (SS, expressed as percentage of baseline value) (B), measured by ultrasonic crystals placed in the distant myocardium and in the LAD-perfused area, during intracoronary infusion of saline or increasing concentrations of disodium malonate in pigs. Baseline SS values were 0.21 ± 0.04 in distant myocardium and 0.13 ± 0.03 in the LAD-perfused region. *($p < 0.05$) indicates significant differences vs. the corresponding baseline value.

mitochondria in an ambivalent way: promoting superoxide generation at complex III under some conditions and attenuating ROS formation at complex I due to reverse electron transfer¹⁵. Diazoxide, a well known cardioprotective agent supposedly acting on mitochondrial ATP-dependent K^+ channels (mito K_{ATP}), has been shown to inhibit SDH in isolated mice mitochondria^{16,17}, which may contribute to its protective actions.

In this context, a previous study had shown that succinate, the natural substrate of SDH, accumulates in ischemic myocardium due to conversion from fumarate by reversal action of SDH¹⁸. In that work, authors suggested that upon reperfusion, resumption of forward SDH activity oxidizes accumulated succinate and induces a massive ROS production by reverse electron transfer from mitochondrial complex II to complex I¹⁸. Furthermore, we have recently demonstrated that reversible inhibition of SDH with malonate during reperfusion was also protective against infarction in isolated, Langendorff-perfused, mice hearts¹⁹.

However, malonate, as an inhibitor of mitochondrial respiration, may have toxic effects that would preclude its systemic administration in intact animals²⁰. Thus, in this study we aimed to investigate the effect of selective intracoronary administration of malonate on infarct size in a clinically relevant pig model of transient coronary occlusion.

Results

Concentration-response curve to malonate under baseline conditions. Neither saline nor malonate, at 1 or 10 mmol/L, induced significant changes in hemodynamics or regional myocardial contractility (Fig. 1). In contrast, infusion of 50 mmol/L of disodium malonate caused a significant increase in end-systolic length (ESL) at the end of infusion, in the apical area (Fig. 1A), receiving irrigation from the catheterized coronary artery, but not in the distant myocardium. Consequently, the increase in ESL induced a marked decrease in systolic segment shortening (SS) in the LAD-perfused region (Fig. 1B), indicative of reduced contractility. These changes in contractility recovered quickly and were not visible 2.5 min later (Fig. 1). Changes in other hemodynamic variables were negligible.

No ventricular fibrillation (VF) was observed at any malonate concentration tested. On the contrary, a single animal developed a VF during saline infusion.

Malonate plasma concentrations by ¹H-NMR (nuclear magnetic resonance spectroscopy).

Intracoronary infusion of saline or disodium malonate at 1 or 10 mmol/L did not induce a discernible malonate peak on ¹H-NMR spectra obtained from peripheral blood samples. In contrast, plasma samples obtained after treatment with 50 mmol/L of malonate showed an increased concentration of this metabolite, with a clear peak at about 3.12 ppm (Fig. 2).

Ischemia-reperfusion injury. Hemodynamic variables, LAD coronary blood flow and regional myocardial function.

Malonate significantly improved systolic segment shortening, during reperfusion, in the area at risk in animals submitted to 15 min of sub-lethal myocardial ischemia (Fig. 3), with no changes in hemodynamic variables. In contrast, in pigs submitted to 40 min of LAD coronary artery occlusion, no significant differences were observed between control and malonate-treated animals in the time course of any of these variables (Table 1, Supplementary Figure 1). Function of distant myocardium, as assessed by ultrasonic piezoelectric crystals was not affected by malonate treatment (Supplementary Figure 1).

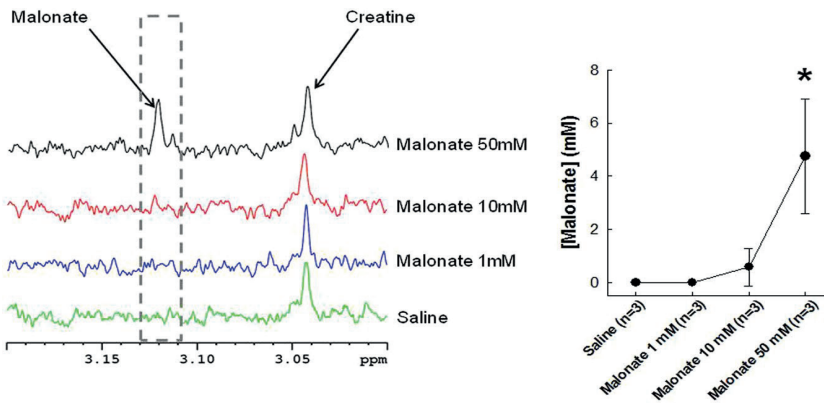


Figure 2. Nuclear magnetic resonance spectroscopy analysis of porcine plasma samples obtained from pigs treated with malonate under baseline conditions. (A) Representative ^1H -NMR spectra from porcine plasma samples obtained after intracoronary saline infusion or after treatment with malonate 1, 10 or 50 mmol/L. (B) Plasma concentrations of malonate under each condition. *($p < 0.05$) indicates significant differences vs. values obtained after saline infusion.

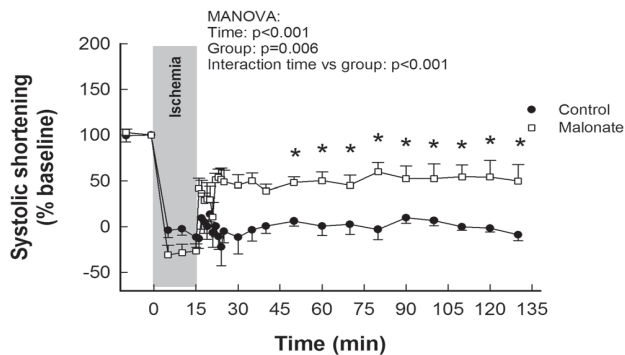


Figure 3. Myocardial stunning in the area at risk in pigs submitted to transient coronary occlusion and treated with intracoronary malonate during initial reperfusion. Changes in systolic segment shortening (SS, expressed as percentage of baseline value) in the area at risk in pigs submitted to 15 min LAD coronary artery occlusion followed by reperfusion, and treated with intracoronary saline or 10 mmol/L of disodium malonate. Baseline SS values were 0.29 ± 0.03 for control animals and 0.31 ± 0.06 for malonate-treated pigs. *($p < 0.05$) indicates significant differences vs. the corresponding value in the control group.

Infarct size. Infarct size in pigs submitted to 15 min LAD coronary artery occlusion was negligible in both control and malonate-treated animals. In contrast, in control pigs submitted to 40 min of LAD coronary artery occlusion, infarct size averaged $59.62 \pm 4.00\%$ of area at risk, and was significantly reduced by treatment during reperfusion with malonate 10 mmol/L (Fig. 4). No differences were observed between both groups in the size of the area at risk or body temperature (Fig. 4A).

Reperfusion arrhythmias. No significant differences were observed in the total number of ventricular tachycardias (VT) or sustained VT, or in VT duration, during reperfusion after 40 min of myocardial ischemia (Fig. 5A–C). Similarly, 4 out of 11 control animals developed VF during reperfusion, an incidence that was not significantly different to that found in malonate-treated pigs (6 out of 11 animals) (Fig. 5C).

Malonate and succinate myocardial concentrations after ischemia-reperfusion. Myocardial metabolite concentrations were assessed in myocardial extracts obtained from additional experiments terminated after 5 min of reperfusion ($n = 5/\text{group}$). Two of the animals included in the group treated with malonate were excluded from the analysis due to poor reflow during the 5 min reperfusion period. In the remaining animals, we detected malonate only in tissue samples obtained from the area at risk from malonate-treated pigs (concentration of $7.77 \pm 2.12 \mu\text{mol/g}$ wet tissue), with this metabolite being below detection limit in samples from control animals or in the distant myocardium of malonate-treated pigs. Succinate was increased in the area at risk of treated animals (Supplementary Figure 2).

	Control (n = 11)			Malonate 10 mM (n = 11)		
	Baseline	40' ischemia	2 h reperf.	Baseline	40' ischemia	2 h reperf.
Heart rate (beats/min)	80.56 ± 6.11	96.51 ± 7.99*	123.70 ± 8.28*	80.56 ± 6.12	90.45 ± 4.19*	98.32 ± 6.27*
AP (mm Hg)	126.46 ± 5.93	119.88 ± 7.59	125.09 ± 7.57	126.48 ± 5.93	116.30 ± 8.18	109.67 ± 8.69
LVSP (mm Hg)	129.03 ± 5.75	120.73 ± 8.98	129.43 ± 7.86	129.03 ± 5.75	117.18 ± 8.71	111.57 ± 8.95
LVEDP (mm Hg)	11.19 ± 1.43	12.67 ± 2.70	11.72 ± 2.51	11.19 ± 1.43	13.19 ± 3.61	11.73 ± 1.33
LV (+) dP/dt (mm Hg/s)	1607 ± 102	1651 ± 119	1723 ± 159	1607 ± 102	1762 ± 200	1400 ± 153
LV (-) dP/dt (mm Hg/s)	2553 ± 113	2348 ± 242	2578 ± 198	2553 ± 113	2031 ± 187	2056 ± 237
LAD flow (ml/min)	6.65 ± 1.65	0.00 ± 0.00*	11.24 ± 2.87*	6.65 ± 1.65	0.00 ± 0.00*	9.92 ± 1.36*
SS (control)	0.16 ± 0.03	0.15 ± 0.05	0.10 ± 0.03	0.21 ± 0.04	0.22 ± 0.04	0.16 ± 0.04
SS (ischemic)	0.18 ± 0.03	-0.05 ± 0.01*	-0.07 ± 0.02*	0.18 ± 0.03	-0.05 ± 0.01*	-0.06 ± 0.01*

Table 1. Values at baseline and at the end of ischemia and reperfusion for heart rate, aortic pressure (AP), left ventricular (LV) systolic and end-diastolic pressure (LVSP and LVEDP), LV (+) and (-) dP/dt, coronary blood flow at the LAD, and systolic shortening (SS) in the control and ischemic regions, in control pigs and in pigs treated with an intracoronary infusion of malonate 10 mmol/L. *(p < 0.05) indicates significant differences vs. the corresponding baseline value.

ROS production in cardiac tissue during reperfusion. Confocal fluorescence microscopy showed increased MitoSOX staining, 5 min after reperfusion, in the area at risk of saline-treated pigs compared with that observed in control myocardial regions. In contrast, malonate, given during initial reperfusion, attenuated this enhanced MitoSOX staining (Fig. 6).

Analysis of mitochondrial function. Oxygen consumption was assessed in the same animals used for the analysis of myocardial malonate and succinate concentrations, in which reperfusion was terminated after 5 minutes. As shown in Supplementary Figure 3, a trend towards a reduction in mitochondrial ADP-stimulated oxygen consumption was observed in the area at risk of both groups of animals.

Discussion

This study shows that reversible inhibition of SDH with intracoronary malonate, given selectively in the area at risk, at the onset of reperfusion, is protective against reperfusion injury in a clinically relevant model of transient coronary occlusion. These effects were associated with reduced ROS production in the area at risk. The treatment did not modify the incidence of reperfusion arrhythmias or altered contractile function in distant myocardium. These results may be of interest for the development of treatments to prevent reperfusion injury in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI).

Prevention of succinate accumulation or oxidation has been suggested as a new therapeutic target against myocardial reperfusion injury²¹. Succinate accumulates in ischemic tissues due to conversion of fumarate by reversal of SDH during ischemia^{18,19}, and recovers its levels quickly during reperfusion. According to a recently proposed scheme, rapid succinate oxidation during reperfusion by forward SDH activity induces a massive ROS production by reverse electron transfer from mitochondrial complex II to complex I, and this oxidative stress leads to MPTP opening^{18,19}. However, Andrienko and coworkers have recently suggested that conditions during early reperfusion are not favorable to reverse electron transfer, and that the rapid decay in succinate occurring during reperfusion is due to efflux rather than oxidation²². According to this alternative hypothesis, MPTP opening would be triggered by factors other than ROS, including increased mitochondrial calcium concentrations, that in turn would cause a secondary increase in ROS, leading to more MPTP opening²². In this situation, the SDH inhibitor malonate would simply compromise the energy status of the cardiomyocyte, inducing protection²². However, our previous data indicate that malonate treatment only during reperfusion attenuates the rapid decay in succinate concentrations, suggesting that at least part of this recovery is due to oxidation¹⁹.

Chouchani and coworkers demonstrated that prevention of succinate accumulation during ischemia by pre-treatment with malonate, a reversible inhibitor of SDH (or mitochondrial complex II), causes a reduction in infarct size in an *in situ*, open-chest, mice model of cardiac ischemia-reperfusion, effect associated with a reduction in ROS production¹⁸. Moreover, we have recently demonstrated that administration of the SDH inhibitor at the onset of reperfusion also reduces infarct size in isolated, Langendorff-perfused, mice hearts¹⁹. This effect was linked with a reduction in ROS production and with preserved mitochondrial function and increased calcein retention in isolated mitochondria, suggestive of reduced MPTP opening¹⁹. However, malonate might target mitochondrial respiration not only in the myocardium at risk, but also in other body cells. Indeed, malonate has been shown to exert deleterious effects, including cell death, in neuroblastoma-derived SH-SY5Y cells²⁰. To avoid potential toxic effects, we selectively applied malonate into the area at risk.

Intracoronary drug administration selectively at the area at risk is clinically feasible and it has been previously used for the selective delivery of cardioprotective treatments, as adenosine, in patients with acute myocardial infarction^{23,24}. In the present study we administered malonate selectively in the area at risk using a 2.8/2.5 F intracoronary infusion catheter, as previously described²⁵. The concentration we chose to apply after ischemia, 10 mmol/L, was devoid of significant effects on systolic segment shortening under baseline conditions, and was not detectable in plasma from these animals. Selective infusion of 10 mmol/L malonate during initial reperfusion reduced ROS generation and infarct size in pigs submitted to 40 min LAD coronary artery occlusion and improved functional recovery in animals submitted to shorter periods of myocardial ischemia.

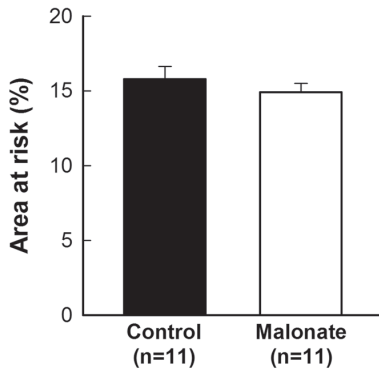
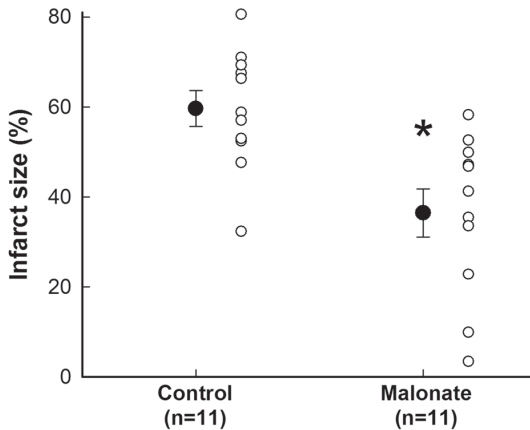
A**B**

Figure 4. Effects of succinate dehydrogenase inhibition with intracoronary malonate during reperfusion on infarct size in pigs submitted to transient coronary occlusion. Size of the area at risk, expressed as percentage of the ventricular weight (A), in pigs submitted to 40 min of LAD coronary occlusion followed by 120 min of reperfusion, treated during initial reperfusion with an intracoronary infusion of saline (control) or disodium malonate 10 mmol/L. (B) Infarct size, expressed as percentage of the area at risk, in the same groups of animals. *($p < 0.05$) indicates significant differences vs. control hearts ($n = 11/\text{group}$).

The beneficial effect of a cardioprotective treatment on infarct size does not warrant its clinical applicability to patients. Previous studies have demonstrated an increased incidence of VF in pigs treated with an intracoronary acid Krebs infusion (pH 6.4), despite it caused a reduction in infarct size²⁵. Similarly, gap junction uncouplers, which reduce infarct size when given during initial reperfusion²⁶, have been shown to have proarrhythmic properties²⁷. However, this was not the case with the intracoronary administration of malonate at the onset of reperfusion in our pig model.

In addition, re-circulation of intracoronary administered malonate could have unwanted effects outside the area at risk. However, intracoronary infusion of malonate at the dose we found to be effective was associated to undetectable concentrations in distant myocardium and in plasma, and to no measurable effect on distant myocardium.

A wide number of therapeutic strategies have been suggested to limit infarct size in experimental models. However, none of them is so far part of standard clinical practice. This failure of translation can be due, at least in part, to the fact that most of these studies were conducted in young and healthy animals lacking comorbidities, comedications or risk factors, and to failures in the design of clinical trials^{28,29}. In addition, considering that ischemia-reperfusion injury might be due to different mechanisms, targeting on individual objectives will unlikely result in reduced infarctions. In this context, a combination therapy may be an interesting approach to limit myocardial infarct size³⁰, as has been described with a combination of remote ischemic conditioning and treatments modulating myocardial metabolism, including exenatide and glucose-insulin-potassium^{31,32}. Malonate, if not individually, in combination with conditioning strategies^{30,33}, may be a good candidate to reduce myocardial infarct size in patients with STEMI. Malonate has the advantage, over other tested compounds, that it

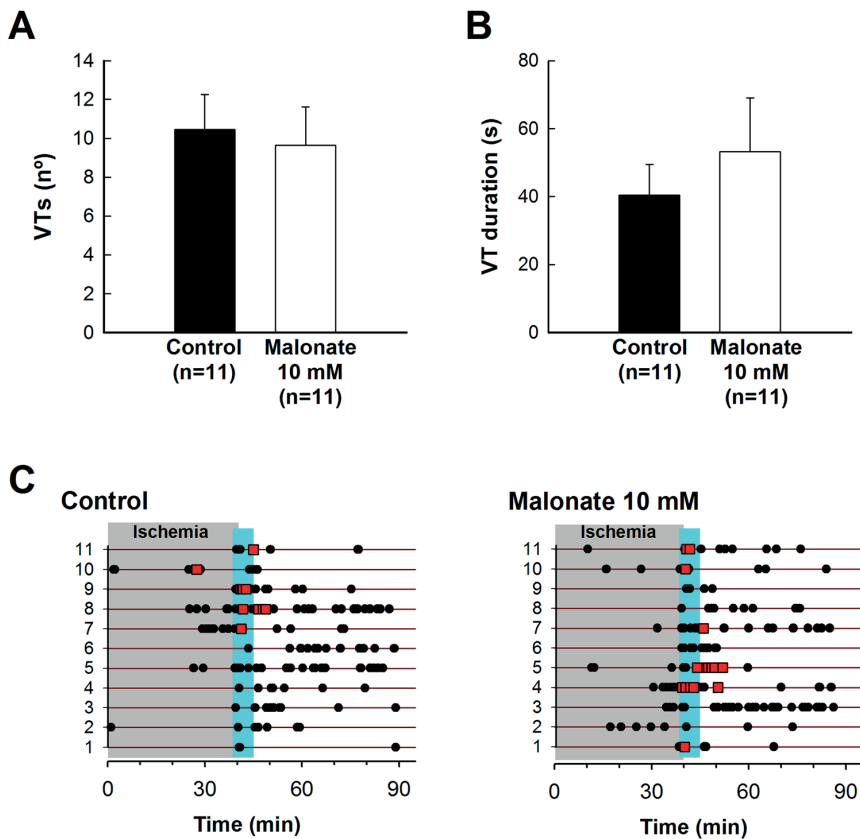


Figure 5. Incidence of reperfusion arrhythmias in pigs submitted to transient coronary occlusion and treated with intracoronary malonate during initial reperfusion. Total number of reperfusion ventricular tachycardias (VT) (A) and VT duration (B) in pigs submitted to 40 min of LAD coronary occlusion followed by 120 min of reperfusion, treated during initial reperfusion with an intracoronary infusion of saline (control) or disodium malonate 10 mmol/L. (C) Incidence of sustained ventricular tachycardia (VT, closed circles) and ventricular fibrillation (VF, red squares) in the same group of animals. Blue square represents the duration of infusion.

is a natural metabolite that appears in animal tissues³⁴, whose effects are reversible. Its main limitation, its possible toxic effects in other tissues, might be solved by an intracoronary route of administration.

In conclusion, our data demonstrate that selective, intracoronary, administration of malonate at the onset of reperfusion protects against myocardial infarction in *in situ* pig hearts, and that this effect is not associated with undesirable effects in distant myocardium or with an increased incidence of reperfusion arrhythmias.

Methods

The present study conforms to the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes and the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publications N° 85-23, revised 1996, updated in 2011). This study was approved by the Ethics Committee of our institution (Comitè Ètic d'Experimentació Animal, reference number: 13/15 CEEA).

Animals and instrumentation. Forty-one hybrid farm pigs (25–30 Kg, 12 h fasting) were premedicated with tiletamine-zolazepam (4–6 mg/Kg, IM) and anaesthetised with sodium thiopental (25 mg/kg, IV, followed by continuous infusion at 6–14 mg/Kg/h) and fentanyl (5 µg/Kg, IV, followed by continuous infusion at 3–6 µg/Kg/h), before intubation and ventilation. The left femoral artery and vein were cannulated for aortic blood pressure and blood sample monitoring, respectively. A midsternotomy was performed, and the pericardium opened, suturing its free margins to the borders of the sternotomy to cradle the heart. The left anterior descending (LAD) coronary artery was dissected free at its midpoint, below the first diagonal branch, and surrounded by an elastic snare. This dissection site was used for coronary ligation, whereas a second dissection site, located one centimeter distally, was used for blood flow measurements. The right carotid artery was also dissected, and a Judkins 8F guiding catheter was introduced through it to catheterize the left coronary ostium using a 2.8/2.5 F Transit infusion catheter (Cordis). Arterial blood gases were monitored during the experimental procedure, and maintained within normal limits. Lead II of electrocardiogram was continuously recorded in a computer to monitor heart

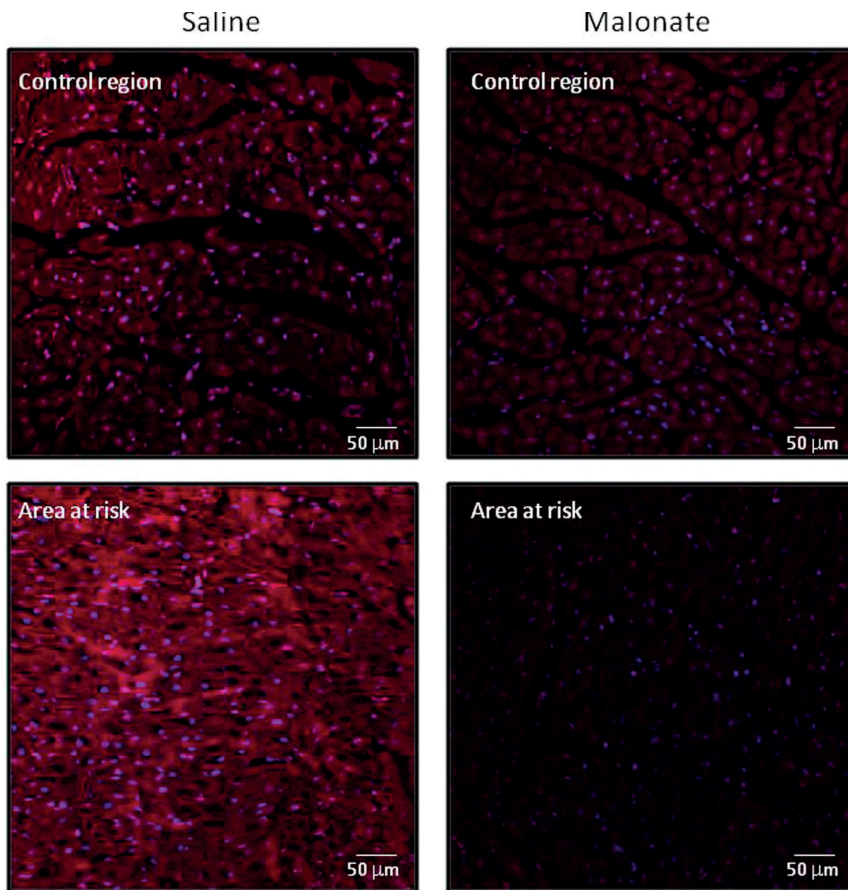


Figure 6. Malonate, given during reperfusion, reduces myocardial ROS production in porcine tissue samples. Figures show representative confocal images depicting MitoSOX staining (in red) (excitation wavelength 488 nm, emission wavelength 520 nm) in myocardial biopsies obtained 5 min after flow restoration, from both the area at risk and control region, in pigs treated with intracoronary infusion of saline (controls) or malonate 10 mmol/L. Nuclei are stained in blue.

rate and ventricular arrhythmias. Left ventricular (LV) pressure and LV dP/dt and coronary blood flow were measured using a Millar SPR-350 Mikro-Tip Transducer catheter (Millar Instruments Inc., Texas, USA) and a Transonic Flowprobe (Transonic System Inc, New York, USA), respectively, as previously described³⁵. At the end of the experiments, animals were sacrificed by a sodium thiopental overdose (100 mg/kg, IV).

Regional myocardial function. Regional myocardial function was determined in a control region near the cardiac base (distant myocardium supplied by the circumflex coronary artery) and in the apical area (i.e., the area at risk in those pigs submitted to ischemia, supplied by the LAD) using two pairs of hemispherical polystyrene crystals inserted perpendicular to the LAD into the LV myocardium as previously described²⁵. End-diastolic length (EDL) and end-systolic length (ESL) were identified in the recordings, and systolic segment shortening ratio (SS) was calculated from the equation $SS = (EDL - ESL)/EDL$ ²⁵. End-diastolic measurements were taken at the point at which positive dP/dt begins to rise, and end-systolic dimensions were taken 20 ms before the nadir of the negative dP/dt²⁵.

Study protocols. All animals received a bolus of sodium heparin through the femoral vein (100 UI/kg), and a 2.5 F intracoronary catheter (TRANSIT, Cordis Neurovascular Inc., Florida, USA) was advanced into the LAD, distally to the first dissection site, through the carotid artery guiding catheter.

Concentration-response curve to malonate under baseline conditions. To assess the effects of inhibition of succinate dehydrogenase on hemodynamics and myocardial function, saline or increasing concentrations of disodium malonate (1, 10 and 50 mmol/L, dissolved in saline) were administered to 3 pigs, through the intracoronary catheter, at a flow rate of 15 ml/min (37°C), for 5 min. A rest period of 25 min was allowed between each infusion.

Blood samples were obtained from a femoral vein at the end of each infusion, and plasma was separated by centrifugation at 1800 g, for 15 minutes, at low temperature (4°C).

Ischemia-reperfusion and intracoronary malonate infusion. In order to evaluate functional recovery and myocardial stunning after malonate administration, six animals (n = 3/group) were submitted, after heparin administration and intracoronary catheter advancement, to 15 min of sub-lethal myocardial ischemia followed by two hours of reperfusion. Ischemia was performed by occluding the LAD coronary artery around the infusion catheter using the elastic snare. In these pigs, the two pairs of polystyrene crystals were placed in the area at risk. In addition, to investigate the effects of malonate on infarct size, 22 additional animals (n = 11/group) were submitted to a longer period of ischemia, of 40 min, that was followed by reperfusion as before. In all cases, animals were randomly divided in two groups. A control group received intracoronary saline for 6 minutes, beginning at 39 min of ischemia and lasting for the first 5 min of reperfusion, at a flow rate of 15 ml/min (37°C), whereas malonate-treated animals received malonate at a concentration of 10 mmol/L.

Ten additional animals (n = 5/group), treated or not with malonate 10 mmol/L, were used to obtain tissue samples after 40 min of ischemia and 5 min of reperfusion, as described below.

Nuclear magnetic resonance. Malonate plasma concentrations were analyzed by ¹H-NMR in blood samples obtained from pigs treated under baseline conditions. Plasma metabolites were extracted using the methanol:chloroform method as described previously³⁶. Plasma extracts were dissolved in 500 µl of deuterium oxide containing 1 mmol/L TSP (3-(Trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-d4 acid sodium salt), added as internal and chemical shift standard. ¹H-NMR spectra were acquired on a vertical bore 9.4 T magnet interfaced to a Bruker Avance 400 spectrometer. Each spectrum consisted in the accumulation of 64 scans using a fully relaxed pulse-and-acquire pulse sequence with presaturation of the residual water signal.

Myocardial metabolite concentrations were also assessed in myocardial extracts obtained from additional experiments terminated after 5 min of reperfusion. Cardiac metabolites were analyzed by ¹H-NMR spectroscopy in 10 additional pigs submitted to 40 min of LAD occlusion and 5 min of reperfusion, and treated or not with malonate 10 mmol/L during the last minute of ischemia and the 5 min of reperfusion (n = 5/group). Cardiac metabolites were extracted using the methanol:chloroform method as before.

Reperfusion arrhythmias. Recordings were analysed for the incidence of ventricular tachycardia (VT) and ventricular fibrillation (VF) during ischemia and the first 50 min of reperfusion. VT was defined as four or more consecutive premature beats of ventricular origin. Sustained VT were those lasting more than 30 s.

Area at risk and infarct size. At the end of the experiments, the LAD was reoccluded and the size of the area at risk and of infarction were determined by 10% fluorescein and 1% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining, respectively, as previously described³⁷. Area at risk was expressed as percentage of total ventricular weight, whereas infarct size was expressed as percentage of area at risk.

Quantification of reactive oxygen species (ROS) production in cardiac tissue. ROS production was quantified in myocardial biopsies obtained 5 min after flow restoration, in 4 control animals submitted to 40 min of ischemia and in 4 pigs treated with malonate 10 mmol/L. Tissue specimens were obtained both from the area at risk and from a control, distant, myocardial region, and were immediately immersed in paraformaldehyde. Myocardial, paraformaldehyde-fixed, sections (5 µm) were incubated with MitoSOX Red (50 µM, Invitrogen) for 15 min (room temperature and darkness) to assess ROS production by confocal microscopy as previously described (excitation wavelength 488 nm, emission wavelength 520 nm)¹⁹. Nuclei were stained with Hoeschst 33342 (10 µg/mL).

Analysis of mitochondrial function. Pig cardiac mitochondria were isolated from myocardial samples obtained at 5 min of reperfusion in the same 10 additional animals used for tissue metabolite quantification, as previously described¹⁹. Mitochondrial respiration was assessed with a Clark-type oxygen electrode (Hansatech, UK) at room temperature after addition of respiration substrates.

Statistical analysis. Data are expressed as mean ± SD. Student's t test or repeated measures ANOVA (MANOVA, mixed modeling with Greenhouse-Geisser correction) (for analysis of one intergroup and one intragroup variable), and Tukey post-hoc tests were used to assess differences between groups. Incidence of VF was analyzed by the Pearson Chi-square test. Non-parametric Mann-Whitney U test was used to assess differences in the number and durations of ventricular arrhythmias. Differences were considered significant when p < 0.05.

References

1. Granger, D. N. & Kvietys, P. R. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox. Biol.* **6**, 524–551 (2015).
2. Halestrap, A. P. & Richardson, A. P. The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **78**, 129–141 (2015).
3. Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., Inseste, J., Rodriguez-Sinovas, A. & Piper, H. M. Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc Res* **94**, 168–180 (2012).
4. Jasova, M., Kancirova, I., Waczulikova, I. & Ferko, M. Mitochondria as a target of cardioprotection in models of preconditioning. *J. Bioenerg. Biomembr.* <https://doi.org/10.1007/s10863-017-9720-1> (2017).
5. Liochev, S. I. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic. Biol. Med.* **60**, 1–4 (2013).
6. Garciaarena, C. D. *et al.* Myocardial reperfusion injury: reactive oxygen species vs. NHE-1 reactivation. *Cell Physiol Biochem.* **27**, 13–22 (2011).
7. Tamura, Y. *et al.* Superoxide dismutase conjugated to polyethylene glycol provides sustained protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in canine heart. *Circ. Res.* **63**, 944–959 (1988).

8. Li, G., Chen, Y., Saari, J. T. & Kang, Y. J. Catalase-overexpressing transgenic mouse heart is resistant to ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol* **273**, H1090–H1095 (1997).
9. Chen, E. P., Bittner, H. B., Davis, R. D., Folz, R. J. & Van Trigt, P. Extracellular superoxide dismutase transgene overexpression preserves postischemic myocardial function in isolated murine hearts. *Circulation* **94**, II412–II417 (1996).
10. Park, J. W. *et al.* Skeletal muscle reperfusion injury is enhanced in extracellular superoxide dismutase knockout mouse. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **289**, H181–H187 (2005).
11. Sabri, A., Byron, K. L., Samarel, A. M., Bell, J. & Lucchesi, P. A. Hydrogen peroxide activates mitogen-activated protein kinases and Na⁺ -H⁺ exchange in neonatal rat cardiac myocytes. *Circ. Res.* **82**, 1053–1062 (1998).
12. Chen, Y. R. & Zweier, J. L. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circ Res* **114**, 524–537 (2014).
13. Stewart, S., Lesnefsky, E. J. & Chen, Q. Reversible blockade of electron transport with amobarbital at the onset of reperfusion attenuates cardiac injury. *Transl. Res* **153**, 224–231 (2009).
14. Xu, A. *et al.* Transient complex I inhibition at the onset of reperfusion by extracellular acidification decreases cardiac injury. *Am J Physiol Cell Physiol* **306**, C1142–C1153 (2014).
15. Drose, S., Bleier, L. & Brandt, U. A common mechanism links differently acting complex II inhibitors to cardioprotection: modulation of mitochondrial reactive oxygen species production. *Mol Pharmacol.* **79**, 814–822 (2011).
16. Anastacio, M. M. *et al.* Cardioprotective mechanism of diazoxide involves the inhibition of succinate dehydrogenase. *Ann. Thorac. Surg.* **95**, 2042–2050 (2013).
17. Anastacio, M. M. *et al.* Inhibition of Succinate Dehydrogenase by Diazoxide Is Independent of the ATP-Sensitive Potassium Channel Subunit Sulfonylurea Type 1 Receptor. *J. Am. Coll. Surg.* **216**, 1144–1149 (2013).
18. Chouchani, E. T. *et al.* Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* **515**, 431–435 (2014).
19. Valls-Lacalle, L. *et al.* Succinate dehydrogenase inhibition with malonate during reperfusion reduces infarct size by preventing mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res* **109**, 374–384 (2016).
20. Fernandez-Gomez, F. J. *et al.* Malonate induces cell death via mitochondrial potential collapse and delayed swelling through an ROS-dependent pathway. *Br. J Pharmacol.* **144**, 528–537 (2005).
21. Pell, V. R., Chouchani, E. T., Frezza, C., Murphy, M. P. & Krieg, T. Succinate metabolism: a new therapeutic target for myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **111**, 134–141 (2016).
22. Andrienko, T. N., Pasdois, P., Pereira, G. C., Ovens, M. J. & Halestrap, A. P. The role of succinate and ROS in reperfusion injury - A critical appraisal. *J. Mol. Cell Cardiol.* **110**, 1–14 (2017).
23. Garcia-Dorado, D. *et al.* Intracoronary injection of adenosine before reperfusion in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: A randomized controlled clinical trial. *Int. J Cardiol* **177**, 935–941 (2014).
24. Bulluck, H., Sirker, A., Loke, Y. K., Garcia-Dorado, D. & Hausenloy, D. J. Clinical benefit of adenosine as an adjunct to reperfusion in ST-elevation myocardial infarction patients: An updated meta-analysis of randomized controlled trials. *Int. J Cardiol* **202**, 228–237 (2016).
25. Rodriguez-Sinovas, A. *et al.* Intracoronary acid infusion as an alternative to ischemic postconditioning in pigs. *Basic Res Cardiol* **104**, 761–771 (2009).
26. Rodriguez-Sinovas, A., Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M. & Soler-Soler, J. Enhanced effect of gap junction uncouplers on macroscopic electrical properties of reperfused myocardium. *J. Physiol* **559**, 245–257 (2004).
27. Sanchez, J. A., Rodriguez-Sinovas, A., Fernandez-Sanz, C., Ruiz-Meana, M. & Garcia-Dorado, D. Effects of a reduction in the number of gap junction channels or in their conductance on ischemia-reperfusion arrhythmias in isolated mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**, H2442–H2453 (2011).
28. Heusch, G. Critical Issues for the Translation of Cardioprotection. *Circ. Res.* **120**, 1477–1486 (2017).
29. Bell, R. M. *et al.* 9th Hatter Biannual Meeting: position document on ischaemia/reperfusion injury, conditioning and the ten commandments of cardioprotection. *Basic Res. Cardiol.* **111**, 41 (2016).
30. Hausenloy, D. J. *et al.* Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: a 30 year voyage of discovery. *Basic Res. Cardiol.* **111**, 70 (2016).
31. Alburquerque-Bejar, J. J. *et al.* Combination therapy with remote ischemic conditioning and insulin or exenatide enhances infarct size limitation in pigs. *Cardiovasc Res* **107**, 246–254 (2015).
32. Alburquerque-Bejar, J. J. *et al.* Additive Effects of Exenatide, Glucose-insulin-potassium, and Remote Ischemic Conditioning Against Reperfusion Ventricular Arrhythmias in Pigs. *Rev Esp Cardiol (Engl. Ed)* (2016).
33. Heusch, G. Treatment of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Ischemic and Pharmacological Postconditioning. *Compr. Physiol* **5**, 1123–1145 (2015).
34. Kim, Y. S. Malonate metabolism: biochemistry, molecular biology, physiology, and industrial application. *J Biochem. Mol Biol* **35**, 443–451 (2002).
35. Rodriguez-Sinovas, A. *et al.* Pre-treatment with the Na⁺ /H⁺ exchange inhibitor cariporide delays cell-to-cell electrical uncoupling during myocardial ischemia. *Cardiovasc Res.* **58**, 109–117 (2003).
36. Barba, I., Jaimez-Auguets, E., Rodriguez-Sinovas, A. & Garcia-Dorado, D. 1H NMR-based metabolomic identification of at-risk areas after myocardial infarction in swine. *MAGMA.* **20**, 265–271 (2007).
37. Garcia-Dorado, D. *et al.* Gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion. *Circulation* **96**, 3579–3586 (1997).

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, Instituto de Salud Carlos III (grants PI14/01431 and PI17/01397, RETICS-RIC, RD12/0042/0021, and CIBERCV), cofinanced by the European Regional Development Fund (ERDF-FEDER, a way to build Europe). Antonio Rodriguez-Sinovas has a consolidated Miguel Servet contract. Ignasi Barba is a Ramón y Cajal Fellow.

Author Contributions

A.R.S. and D.G.D. conceived the project, designed the experiments and drafted the initial version of the manuscript. A.R.S. and L.V.L. conducted all experiments and analyzed and interpreted the data obtained. I.B. supervised the experiments using nuclear magnetic resonance and helped with their interpretation and analysis. E.M.C. and M.R.M. conducted and interpreted the data on mitochondrial oxygen consumption. All authors have critically revised the manuscript for important intellectual content and approved the final version.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20866-4>.

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

**SELECTIVE INHIBITION OF SUCCINATE DEHYDROGENASE IN
REPERFUSED MYOCARDIUM WITH INTRACORONARY MALONATE
REDUCES INFARCT SIZE.**

Laura Valls-Lacalle ^{a,b}, Ignasi Barba ^{a,b}, Elisabet Miró-Casas ^{a,b}, Marisol Ruiz-Meana ^{a,b},
Antonio Rodríguez-Sinovas ^{a,b}*, David García-Dorado ^{a,b}.*

^a **Cardiovascular Diseases Research Group, Department of Cardiology, Vall d'Hebron University Hospital and Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.**

^b **Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Spain.**

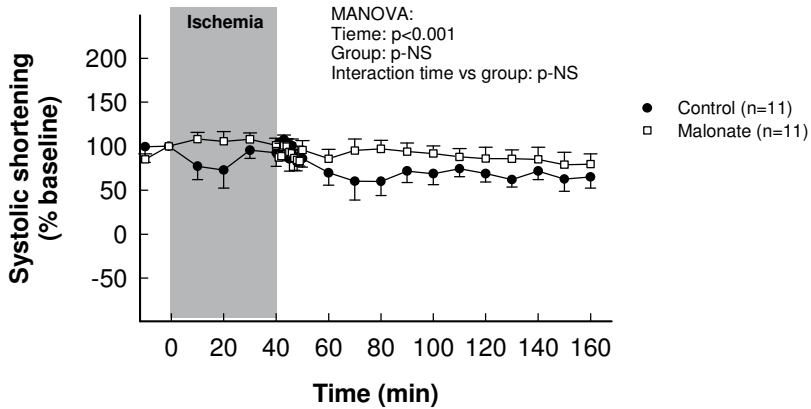
*** Corresponding authors:**

Dr. David Garcia-Dorado OR Dr. Antonio Rodríguez-Sinovas.

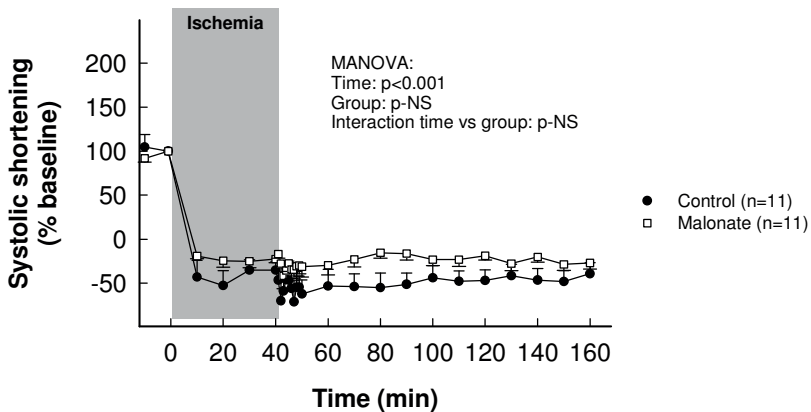
Grupo de Investigación en Enfermedades Cardiovasculares, Servicio de Cardiología, Vall d'Hebron University Hospital and Research Institute, Pg. Vall d'Hebron 119-129, Universitat Autònoma de Barcelona, 08035 Barcelona, Spain. Phone: +34 934894038, Fax: +34 934894032.

E-mails: dgdorado@vhebron.net
antonio.rodriiguez.sinovas@vhir.org

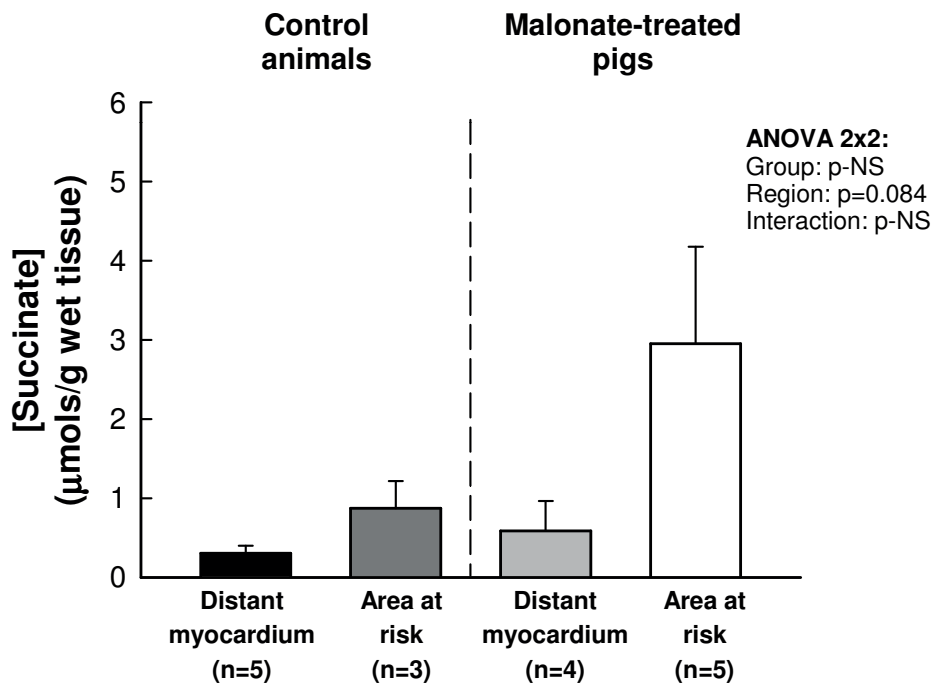
A (Distant myocardium)



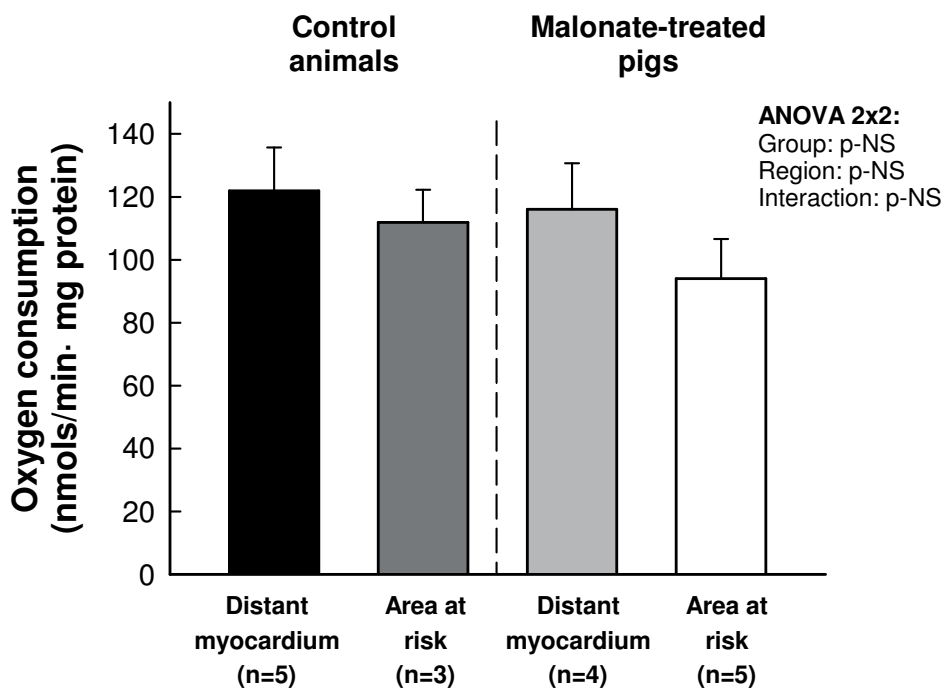
B (Area at risk)



Supplementary Figure 1. Systolic segment shortening in the distant myocardium and in the area at risk in pigs submitted to 40 min LAD coronary artery occlusion followed by reperfusion, and treated with intracoronary saline or 10 mmol/L of disodium malonate. Malonate treatment did not modify systolic segment shortening in any myocardial region as compared with changes observed in control pigs.



Supplementary Figure 2. Succinate concentrations in tissue extracts obtained from pigs submitted to 40 min LAD coronary artery occlusion followed by only 5 min of reperfusion, and treated with intracoronary saline or 10 mmol/L of disodium malonate. Succinate was significantly increased in the area at risk of treated animals vs. remaining groups pooled (2.95 ± 1.22 vs. 0.54 ± 0.16 , Student's t test, $p=0.008$).



Supplementary Figure 3. ADP-stimulated oxygen consumption in mitochondria isolated from pigs submitted to 40 min LAD coronary artery occlusion followed by only 5 min of reperfusion, and treated with intracoronary saline or 10 mmol/L of disodium malonate. A non-significant trend towards a reduction in oxygen consumption was observed in the area at risk of both groups of animals, being slightly higher in malonate-treated animals.

RESUM GLOBAL DE RESULTATS

Els resultats obtinguts en el model murí mitjançant el sistema de Langerdorff són:

- A. La inhibició del complex II mitocondrial (o succinat deshidrogenasa) amb malonat disòdic en cors aïllats de ratolí perfundits en condicions normòxiques produeix una disminució concentració-dependent de la pressió desenvolupada pel ventricle esquerre, amb una EC_{50} de 8.05 ± 2.11 mmol/L. No es van observar canvis significatius en altres variables com la freqüència cardíaca, la pressió telediastòlica del ventricle esquerre o la pressió de perfusió, ni cap mena de dany cel·lular. Els efectes de la inhibició de la succinat deshidrogenasa amb malonat, en aquestes condicions, són almenys parcialment reversibles.
- B. La inhibició de la succinat deshidrogenasa mitocondrial amb malonat, administrat prèviament a un episodi de 35 minuts d'isquèmia global seguida de reperfusió, produeix un efecte protector en cors aïllats de ratolí, reduint la mida de l'infart, l'alliberament de LDH i la hipercontractura, i millorant la recuperació funcional al final de la reperfusió. Aquest efecte protector és especialment notori a 3 i 10 mmol/L.
- C. Tanmateix, l'administració de malonat 3 mmol/L, únicament en el moment de la restauració del flux, exerceix un efecte protector front el dany per reperfusió, reduint la mida de l'infart i l'alliberament de LDH, i millorant la recuperació funcional al final de l'experiment.
- D. La magnitud de l'efecte cardioprotector exercit pel tractament amb malonat a l'inici de la reperfusió és similar a l'efecte observat amb CsA.
- E. L'efecte protector del tractament amb malonat, administrat durant la reperfusió, s'associa amb una reducció en la producció de ROS durant la restauració del flux sanguini, determinada en mostres tissulars mitjançant marcatge amb MitoSox Red.
- F. Els cors aïllats de ratolí tractats amb malonat presenten un perfil metabòlic diferent d'aquells que no van ser tractats amb l'inhibidor de la succinat deshidrogenasa, tal i com demostren els nostres estudis de ressonància magnètica nuclear i l'anàlisi supervisat dels espectres obtinguts. Aquestes diferències apareixen independentment de si el tractament es va realitzar en condicions normòxiques o tan sols durant la reperfusió, sent el principal metabòlit responsable del diferent patró metabòlic el succinat, que va trobar-se augmentat en els cors tractats.

- G. L'anàlisi quantitatiu dels diferents metabòlits va mostrar una disminució significativa en ADP, AMP, carnitina, glutamat, NADP⁺, i taurina en les mostres de teixit miocàrdic reperfundit, comparades amb les provinents de cors normòxics, i un increment significatiu en alanina, glutamina i del propi succinat. Com era d'esperar, i com a control positiu de la tècnica, els cors tractats amb malonat van presentar un increment significatiu d'aquest metabòlit.
- H. Durant la isquèmia es produeix un gran augment en les concentracions tissulars de succinat, el qual es normalitza ràpidament als 5 minuts de la reperfusió. Aquesta normalització és més lenta en els cors tractats amb l'inhibidor de la succinat deshidrogenasa durant la reperfusió.
- I. L'addició de succinat a preparacions de mitocondris aïllats de cors de ratolí, incubats amb substrats del complex I, produeix un increment en el consum d'oxigen i en la producció de ROS, així com un major grau d'obertura del mPTP, determinat com retenció de calceïna. El tractament amb malonat, per contra, reverteix els efectes provocats pel succinat.
- J. L'efecte protector del malonat front el dany per reperfusió observat en cors aïllats de ratolí no s'associa amb canvis en el grau d'activació de les quinases Akt, ERK1/2, GSK3 β o STAT3 després d'un episodi d'isquèmia global transitòria. Tant en els cors tractats amb l'inhibidor del complex II, com en els no tractats, es produeix un augment significatiu, als 5 minuts de reperfusió del grau d'activació, mesurat con nivell de fosforilació, d'ERK1/2 i GSK3 β , però no d'Akt o STAT3.

Els resultats obtinguts en el model porcí d'oclusió coronària transitòria són:

- K. L'administració intracoronària, en condicions basals, de malonat disòdic 50 mmol/L, mitjançant un catèter introduït a l'artèria coronària descendent anterior (DA), en un model porcí de cor in situ, indueix un augment significatiu en la longitud telesistòlica en la regió miocàrdica apical irrigada per aquella artèria, però no en regions distants. Com a conseqüència es produeix una marcada disminució en l'escurçament sistòlic regional en aquesta zona, indicatiu d'una inhibició en la seva contractilitat. Aquests efectes van ser ràpidament revertits, recuperant-se els valors inicials d'escurçament regional en menys de 2,5 minuts. Concentracions inferiors de malonat, d'1 i 10 mmol/L, no van induir cap canvi significatiu en cap variable hemodinàmica o de contractilitat.

- L. L'administració intracoronària d'1 i 10 mmol/L de malonat disòdic no induïx canvis detectables, mitjançant ressonància magnètica nuclear, en els nivells plasmàtics d'aquest metabòlit. Únicament la concentració més alta, de 50 mmol/L, s'associa a un augment detectable de malonat.
- M. La inhibició reversible de la succinat deshidrogenasa amb malonat 10 mmol/L, administrat únicament a l'inici de la reperfusió, i de forma intracoronària i selectiva a l'àrea en risc, atenua l'aturdiment miocàrdic en aquesta regió del cor, augmentant l'escurçament sistòlic regional respecte al grup control, en porcs sotmesos a oclusió coronària breu, de 15 minuts, seguida de reperfusió.
- N. L'administració de malonat 10 mmol/L a l'inici de la reperfusió, de forma intracoronària i selectiva a l'àrea en risc, té un efecte protector front el dany per reperfusió, reduint la mida de l'infart en porcs sotmesos a oclusió coronària perllongada, de 40 minuts, seguida de reperfusió.
- O. Els efectes protectors de la inhibició del complex II amb malonat 10 mmol/L intracoronari no s'associen amb canvis detectables en la funció del miocardi a distància, ni amb accions deletèries sobre la incidència d'arrítmies de la reperfusió, incloent-hi taquicàrdies i fibril·lacions ventriculars.
- P. Tal i com es va observar als cors aïllats de ratolí, el tractament amb malonat 10 mmol/L durant la reperfusió, en un model porcí, incrementa la concentració de succinat, mesurada mitjançant ressonància magnètica nuclear, a l'àrea en risc, però no en el miocardi a distància, ni en els animals controls. Com a control positiu, també vam detectar, un increment en la concentració de l'inhibidor tan sols a l'àrea en risc.
- Q. La isquèmia-reperfusió miocàrdica produeix, també en cors porcins in situ, un increment en la producció de ROS a l'àrea en risc, determinada en mostres tissulars mitjançant marcatge amb MitoSOX Red, en comparació amb l'existent en el miocardi distant. L'efecte protector del tractament amb malonat, administrat únicament durant la reperfusió, s'associa, com passava als cors de ratolins, amb una atenuació de la producció de ROS durant la reperfusió.
- R. El tractament amb malonat durant la reperfusió s'associa amb una tendència a un menor consum d'oxigen en mitocondris porcins aïllats de l'àrea en risc en comparació amb el provinents del miocardi distant dels mateixos animals o d'animals controls.

DISCUSSIÓ GENERAL

Els resultats obtinguts en aquesta tesi permeten establir que la inhibició reversible de la succinat deshidrogenasa amb malonat disòdic a l'inici de la reperfusió té efectes protectors enfront el dany per reperfusió, reduint la mida de l'infart tant en cors aïllats de ratolí, com en un model porcí d'oclusió coronària transitòria. Aquest efecte protector s'estén a altres variables d'importància clínica, com és l'aturdiment miocàrdic, sense que apareguin efectes indesitjables ni en el miocardi a distància, ni sobre la incidència d'arrítmies ventriculars malignes. Els mecanismes de la protecció inclouen canvis en el perfil metabòlic del teixit tractat, reducció en la producció de ROS en el moment de la reperfusió, preservació de la funció mitocondrial, i una menor obertura del mPTP^{379,380}.

1. LA INHIBICIÓ REVERSIBLE DE LA SUCCINAT DESHIDROGENASA A L'INICI DE LA REPERFUSIÓ ÉS CARDIOPROTECTORA.

Estudis previs van permetre demostrar que la inhibició reversible de la succinat deshidrogenasa amb dimetil malonat, administrat abans d'una oclusió coronària transitòria en ratolí, redueix de manera significativa la mida de l'infart³⁷⁸. Un efecte protector similar ja s'havia observat anteriorment amb un altre inhibidor del complex II, l'atpenina A5, administrada prèviament a la isquèmia en cors aïllats de rata³⁷⁶, tot i que els mecanismes d'acció d'aquesta droga no estan del tot clarificats, i poden involucrar efectes sobre els mitoK_{ATP}³⁷⁷. Més recentment, un derivat sintètic de l'àcid ferúlic ("hmy-paa (3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-N-(1H-pyrazol-3-yl)acrylamide)"), el qual també inhibeix la succinat deshidrogenasa, ha permès conferir resistència al dany per isquèmia-reperfusió en un model cel·lular sotmès a cicles d'hipòxia i reoxigenació³⁸¹. Tot i així, l'estratègia d'inhibir el complex II de la CTE abans de la isquèmia, no és factible en pacients amb infart agut de miocardi sotmesos a revascularització coronària, ja que arriben a l'hospital amb la isquèmia ja instaurada. L'objectiu principal d'aquesta tesi ha estat investigar la possibilitat de que també sigui factible protegir el miocardi enfront del dany per isquèmia-reperfusió inhibint la succinat deshidrogenasa en el moment de la reperfusió, hipòtesi que no havia estat testada amb anterioritat.

Per estudiar aquesta hipòtesi vam utilitzar dos models animals diferents, cors aïllats de ratolí, i un model de cor porcí in situ, sotmès a oclusió coronària transitòria i com a inhibidor de la succinat deshidrogenasa, malonat disòdic, un inhibidor reversible del complex II. L'àcid malònic és un àcid dicarboxílic que apareix de forma natural als sistemes biològics, tant en teixits vegetals, especialment en les llavors de les lleguminoses, com en animals, durant el desenvolupament cerebral³⁸². A més a més, és un metabòlit que es produeix de forma natural als teixits en determinades situacions, com en mitocondris aïllats, provinent de la descarboxilació oxidativa de l'oxalacetat, augmentant la seva concentració en presència de H₂O₂³⁸³.

Per confirmar que érem capaços d'inhibir la cadena respiratòria mitocondrial, vam administrar el malonat disòdic en condicions normòxiques o basals en ambdós models. En cors aïllats de ratolí perfosos en el sistema de Langendorff el malonat va produir, en condicions normòxiques, una reducció concentració-depenent de la pressió desenvolupada del ventricle esquerre, corroborant el seu efecte depressor de la respiració mitocondrial. Un ajust a una corba sigmoide va permetre calcular els valors d'EC50 i Emàx, que van ser, respectivament, $8,05 \pm 2,11$ mmol/L i $23,4 \pm 7,46$ mmHg. A partir del valor de l'EC50 vam escollir la dosi a emprar en els estudis d'isquèmia-reperfusió, que va ser de 3 mmol/L. Cal destacar que l'administració de malonat en aquestes condicions no va associar-se a mort cel·lular, ja que no es va observar infart amb la tinció de trifeniltetrazoli, ni alliberament de LDH. De forma similar al model de cor aïllat de ratolí, l'administració intracoronària en la DA de malonat disòdic en el nostre model porcí en condicions basals va produir una reducció de la contractilitat únicament a la regió miocàrdica irrigada per la DA. Concretament, aquests efectes es van observar a la concentració de 50 mmol/L, però no a concentracions inferiors. Per tal d'evitar efectes indesitjables, ja que aquesta concentració era detectable en sang perifèrica mitjançant ressonància magnètica nuclear, en aquesta ocasió vam seleccionar la concentració de 10 mmol/L per analitzar els efectes de la droga sobre el dany per reperfusió. Aquest estudi, a més, va confirmar que els efectes del malonat disòdic sobre la contractilitat eren ràpidament reversibles.

La mort cel·lular que ocorre durant un episodi d'isquèmia-reperfusió miocàrdica es produeix, als nostres models, predominantment per necrosi, com demostra l'extensa tinció amb iodur de propidi observada en mostres cardíques obtingudes de cors aïllats i perfundits de ratolí, una hora després de la reperfusió. Per contra, el paper de l'apoptosi és pràcticament menyspreable, fet demostrat per la manca de tinció per la tècnica de TUNEL. El tipus de mort cel·lular durant un episodi d'isquèmia-reperfusió ha estat, fins ara, un tema controvertit, ja que existeix un possible solapament entre ambdós tipus. Tot i diferenciar-se clarament en els mecanismes que els desencadenen, hi ha alguns nexes d'unió entre la necrosi i l'apoptosi, com pot ser, per exemple, l'alliberació de citocrom c mitocondrial³⁸⁴. A més a més, diversos factors com l'ús d'inhibidors inespecífics que poden actuar sobre altres tipus de proteases diferents a les caspases, l'existència de falsos positius en les tècniques de tipus TUNEL per detectar apoptosi, i l'ús d'animals modificats genèticament sense especificitat sobre el tipus cel·lular, han fet que la participació de l'apoptosis en la mort cel·lular posterior a un episodi d'isquèmia-reperfusió sigui molt controvertida³⁸⁵. En aquest context, i tot i que l'apoptosis és un mecanisme essencial en els processos de diferenciació cel·lular, s'ha de tenir en compte que la seva rellevància en cèl·lules diferenciades terminalment, com és el cas dels cardiomiòcits, no està aclarida. De fet, la via de la caspasa 3 sembla que no seria operativa en cèl·lules cardíques adultes, suggerint que l'apoptosi no participaria en la mort cel·lular dels cardiomiòcits durant la reperfusió³⁸⁶.

A més, i corroborant els nostres resultats, s'ha demostrat que ratolins deficients per les caspases 3 i 7 no mostren diferències ni en la mida de l'infart després de 24 hores de reperfusió, ni en la de l'àrea de cicatrització 28 dies després de l'oclusió coronària transitòria, respecte a les observades en animals de fenotip salvatge, la qual cosa també suggereix que l'apoptosi no contribueix, al menys a través de la via clàssica mediada per caspases, a la mort cel·lular post isquèmia³⁸⁷.

Per tal d'analitzar els efectes de la inhibició del complex II amb malonat sobre el dany per isquèmia-reperfusió, inicialment vam administrar, en el model de cor aïllat de ratolí, i de forma continua, malonat disòdic 3 mmol/L. Així, vam demostrar que l'administració de malonat, iniciada de forma prèvia a la isquèmia i perllongada durant tota la reperfusió, era eficaç reduint la mida de l'infart. Aquestes dades, per tant, van permetre confirmar les obtingudes prèviament per altres autors, que van mostrar que la inhibició de la succinat deshidrogenasa amb malonat abans d'una oclusió coronària transitòria en ratolí in vivo, redueix de manera significativa la mida de l'infart³⁷⁸.

Per tal d'analitzar el nostre objectiu principal, és a dir, si aquest tractament és efectiu contra el dany per reperfusió, i com a continuació lògica a l'experiment anterior, vam testar l'eficàcia d'aquest inhibidor quan la droga era administrada únicament en el moment de la restauració del flux. Així, l'administració de malonat 3 mmol/L durant els primers 15 minuts de la reperfusió va reduir gairebé un 50% la mida de l'infart en cors aïllats de ratolí sotmesos a 35 minuts d'isquèmia global, dades que es van correlacionar amb una disminució significativa de l'alliberament de LDH. Encara més important, vam poder demostrar que aquest efecte protector persisteix en un model clínicament més rellevant com es el model porcí d'oclusió coronària transitòria. En aquest model, el tractament amb malonat 10 mmol/L, administrat de forma intracoronària i selectiva a l'àrea en risc, durant els primers 5 minuts de la reperfusió, es va associar amb una reducció marcada de la mida de l'infart, propera al 50%, en porcs sotmesos a oclusió coronària transitòria de la DA de 40 minuts.

La via d'administració escollida en aquest model, la intracoronària, permet accedir directament a l'àrea en risc cardíaca, reduint així els possibles efectes adversos de l'administració sistèmica de la droga. De fet, s'han senyalat possibles accions neurotòxiques del malonat en cèl·lules SH-SY5Y derivades de neuroblastoma^{388,389}, que podrien ser un problema per la seva aplicació en humans. A més, aquesta via permet evitar també que es produeixi una inhibició de la respiració mitocondrial de manera generalitzada en altres cèl·lules de l'organisme. Aquest tipus d'administració és, de fet, perfectament possible en pacients amb infart agut de miocardi, ja que durant el procediment d'angioplastia primària s'utilitzen catèters i balons que permeten l'administració de tractaments directament a l'àrea en risc. Aquesta via d'administració ha estat l'escollida en un assaig clínic recent, l'estudi PROMISE, per

l'administració intracoronària d'adenosina a l'àrea en risc, realitzada just en el moment de l'obertura de l'artèria afectada, durant el procediment d'angioplàstia coronària ²⁰⁶.

A més dels efectes beneficiosos sobre la mida de l'infart, la inhibició reversible de la succinat deshidrogenasa amb malonat durant la reperfusió té efectes positius sobre altres variables de gran importància clínica. Així, el tractament amb malonat durant la reperfusió va ser capaç de reduir l'aturdiment miocàrdic en cors aïllats de ratolí, amb una millor recuperació funcional (mesurada a partir de la pressió desenvolupada del ventricle esquerre) al final de la reperfusió. De forma similar, també en el model porcí d'oclusió coronària transitòria es va observar, quan la duració de la isquèmia es reduïa fins a 15 minuts, una menor alteració contràctil durant la reperfusió a l'àrea en risc en el grup d'animals tractat amb l'inhibidor en comparació amb la del grup control. Encara que en el grup d'animals sotmès a isquèmia perllongada (40 min) aquesta millora funcional no va ser aparent, com ja ha quedat palès en altres estudis ¹⁰⁶, les dades obtingudes amb duracions breus d'isquèmia confirmen l'efecte beneficiós sobre l'aturdiment miocàrdic.

A part dels efectes beneficiosos d'un tractament, s'han de considerar els possibles efectes adversos. Un d'ells és l'aparició d'arrítmies ventriculars que empitjorin i posin en risc l'estat mèdic del pacient i que podrien desaconsellar el seu ús. En aquest sentit, estudis anteriors van demostrar un augment en la incidència d'arrítmies ventriculars en un model porcí tractat amb una administració intracoronària d'una solució de Krebs àcida, tot i que aquesta reduís de manera significativa la mida de l'infart ⁸¹. De manera similar, l'administració de desacoblants de les "gap junctions" durant la reperfusió en un model de cor aïllat de rata, tot i produir una disminució significativa de l'infart, presentava efectes proarrítmics ^{30,35}. No obstant, en el nostre estudi, l'administració intracoronària de malonat a l'inici de la reperfusió no va suposar un augment en la incidència d'arrítmies malignes (fibril·lacions i/o taquicàrdies ventriculars), en comparació amb el grup control, ni durant el temps de la pròpia infusió, ni durant la resta de la reperfusió. Per tant, des d'aquest punt de vista, la inhibició de la succinat deshidrogenasa amb malonat durant la reperfusió és una estratègia segura.

El malonat és un inhibidor de la respiració mitocondrial, que si arribés a altres teixits podria tenir efectes no desitjats en els mateixos. Tot i que l'administració del malonat es va realitzar de manera intracoronària, això no descarta que la recircularització de la droga en l'organisme acabés afectant a regions distants del cor o d'altres teixits. Ara bé, les nostres pròpies dades semblen excloure aquesta possibilitat. Així, els nostres anàlisis de ressonància magnètica nuclear no van ser capaços de detectar, al model porcí, la presència de malonat ni en sang perifèrica, ni en regions controls del miocardi, almenys a la concentració emprada al nostre estudi (10 mmol/L). A més, la contractilitat de l'àrea control en el nostre model porcí no es va veure afectada durant l'administració de la droga, ni en condicions normòxiques, ni durant la reperfusió.

2. CANVIS EN EL PATRÓ METABÒLIC DEL MIOCARDI.

Per estudiar els mecanismes de la protecció induïda per l'administració de malonat durant la reperfusió, primerament vam investigar si la inhibició de la succinat deshidrogenasa s'associa a canvis en el perfil metabòlic del teixit miocàrdic després d'un episodi d'isquèmia-reperfusió. Per aquest motiu, vam analitzar, mitjançant ressonància magnètica nuclear, extractes de teixits obtinguts de cors aïllats de ratolí sotmesos a perfusió normòxica o isquèmia global seguida de reperfusió, tractats o no amb malonat a l'inici de la reperfusió. Un primer anàlisi discriminant supervisat, de tipus OPLS-DA, dels diferents espectres obtinguts va permetre diferenciar, per un costat les mostres sotmeses a isquèmia-reperfusió de les sotmeses a perfusió normòxica, i per l'altre les tractades amb malonat de les que no van ser tractades (independentment de si el tractament es realitzava en normòxia o durant la reperfusió). De forma important, en aquest darrer cas, aquestes diferències es mantenen si s'eliminava de l'anàlisi el malonat, l'inhibidor utilitzat en els cors tractats. Aquestes dades van permetre confirmar, doncs, que el tractament amb malonat provoca alteracions en l'empremta metabòlica tissular.

Seguidament es va voler determinar quines eren les molècules responsables dels canvis observats en el patró metabòlic. Per això, es va realitzar una assignació dels diferents pics que apareixien en els espectres utilitzant el programa Chenomix, que compta amb una gran base de dades de metabòlits definits, i ens permet calcular la seva concentració. Primerament, vam analitzar les diferències entre els extractes provinents de cors normòxics d'aquells que provenien de teixit reperfundit. Així, en els espectres obtinguts d'extractes de teixit miocàrdic reperfundit es va observar un augment significatiu en les concentracions d'alguns marcadors d'isquèmia ja coneguts i publicats en altres treballs anteriors^{120,390}, tals com alanina, glutamina i succinat, i disminucions en ADP, AMP, glutamat, taurina, i carnitina, entre altres.

A continuació vam investigar quins eren els metabòlits responsables de les diferències entre els extractes provinents de cors tractats o no amb malonat. D'aquest anàlisi va resultar que l'únic metabòlit que es trobava en diferent concentració entre els cors tractats amb malonat dels tractats amb sèrum fisiològic era el succinat, tant si el tractament es realitzava en condicions de normòxia com durant la reperfusió. En totes dues situacions, el succinat es trobava augmentat respecte al seu grup control. Aquestes dades podrien indicar que durant la reperfusió en presència de malonat es produeix una menor oxidació del succinat cap a fumarat, degut a la inhibició de l'activitat de la succinat deshidrogenasa. De forma semblant al que ocorre en els cors aïllats de ratolí, vam observar canvis similars en extractes obtinguts del nostre model porcí. Així, el succinat es trobava augmentat a l'àrea en risc en els animals tractats amb malonat, però no en les regions remotes del cor d'aquests mateixos animals o en l'àrea en risc dels animals controls.

De fet, un anàlisi més en detall dels canvis en les concentracions de succinat als cors sotmesos a isquèmia-reperfusió ens va permetre detectar un gran augment de les seves concentracions durant la isquèmia, que es revertia molt ràpidament durant la reperfusió en els cors no tractats amb malonat. Aquest gran increment que ocorre durant la isquèmia correspon al que ja havia estat descrit per Chouchani i col·laboradors ³⁷⁸, els quals van proposar el succinat com a marcador universal d'isquèmia, ja que era l'únic metabòlit que es trobava augmentat en diferents teixits, incloent el cor, durant aquesta fase. Aquestes dades confirmen també estudis anteriors que ja havien mostrat un augment d'aquest metabòlit en models experimentals d'isquèmia o cicles d'hipòxia ^{391,392}. Així mateix, la presència augmentada de succinat també havia estat demostrada en humans, relacionada amb proves físiques (marxa i apnea) i estudis de metabolisme anaeròbic ³⁹³. Respecte a la ràpida recuperació en les seves concentracions que ocorre durant la reperfusió, aquesta va ser més lenta en els cors tractats amb l'inhibidor de la succinat deshidrogenasa, probablement indicant, novament, una menor oxidació del succinat en el grup tractat amb malonat. En aquest sentit, però, cal destacar que alguns autors han postulat que al menys una part de la ràpida caiguda en els nivells de succinat durant la reperfusió no serien deguts a la seva oxidació, si no al seu eflux cap al medi extracel·lular ^{394,395}. Aquests mateixos autors han proposat que quasi dos terceres parts del succinat acumulat serien alliberades i rentades ràpidament durant la reperfusió, restant tan sols una tercera part al citoplasma ^{394,395}.

Com a control positiu de la nostra tècnica, els cors de ratolí tractats amb malonat van presentar un augment en les concentracions d'aquest inhibidor de la succinat deshidrogenasa, tan quan el tractament es realitzava en condicions normòxiques, com quan s'administrava durant la reperfusió.

Una de les possibles hipòtesis per entendre aquesta acumulació de succinat que ocorre durant la isquèmia, està relacionada amb l'existència de dos possibles direccions de funcionament de la succinat deshidrogenasa. Durant el temps d'isquèmia, l'augment de NADH, degut a l'estadi reduït del coenzim Q, provoca l'augment de la síntesis de fumarat a partir de diferents vies (AMP, conversió des d'aspartat). Aquest fet provoca, de manera conseqüent, que la succinat deshidrogenasa intenti reduir el fumarat a succinat, operant en la direcció reversa de l'enzim. Això acaba provocant, per tant, l'acumulació de succinat al teixit com a producte de la reacció ³⁷¹. Per contra, durant la reperfusió, quan la maquinària cel·lular intenta retornar a condicions fisiològiques, la succinat deshidrogenasa actua en la seva direcció constitutiva, intentant oxidar tota l'acumulació de succinat un altre cop cap a fumarat. Tot i així, altres autors han proposat que l'acumulació de succinat durant la isquèmia provindria del mateix cicle de Krebs, degut a reaccions anapleròtiques de les aminotransferases i de la glicòlisis

³⁹⁴ .

3. EL SUCCINAT COM A MARCADOR PLASMÀTIC D'ISQUÈMIA.

Per tal que un metabòlit sigui considerat un marcador d'isquèmia, aquest ha de ser sensible a períodes d'hipòxia o isquèmia, provocant un canvi en la seva concentració basal. El succinat, com ja s'ha esmentat abans, ha estat postulat com un marcador universal d'isquèmia ja que s'ha demostrat que s'acumula en diferents òrgans o teixits sotmesos a aquesta condició ³⁷¹, fet que hem confirmat en aquesta tesi utilitzant mostres de teixit i espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear. Una de les característiques dels marcadors biològics, es que han de ser de fàcil detecció, com per exemple mitjançant una biòpsia del teixit d'estudi, o bé presentar una detecció indirecta dels seus nivells locals a nivell de la sang.

Una possibilitat que faria que el succinat pogués ser utilitzat com a biomarcador a la pràctica clínica en pacients amb sospita de patir un infart de miocardi seria que el gran increment en les seves concentracions que es donen al teixit isquèmic es reflectís al plasma sanguini. En aquest sentit, un estudi recent ha analitzat la concentració d'aquest metabòlit en pacients amb infart agut de miocardi sotmesos a angioplàstia primària. L'anàlisi metabòlic de sang extreta tant de l'artèria coronària responsable, com del sinus coronari o d'una vena perifèrica, va permetre demostrar un augment en els nivells de succinat, principalment al sinus coronari, en aquests pacients respecte a un grup control integrat per pacients amb infart de miocardi sense elevació del segment ST o angina estable ³⁹⁶. A més, l'alliberament de succinat pel teixit miocardi, detectat en mostres sanguínies, va correlacionar-se amb l'extensió del dany isquèmic³⁹⁶.

4. MECANISMES DE L'EFECTE PROTECTOR DEL MALONAT DURANT LA REPERFUSIÓ: REDUCCIÓ EN LA PRODUCCIÓ DE ROS.

En el present estudi, l'efecte protector, enfront l'infart de miocardi, de la inhibició reversible del complex II amb malonat a l'inici de la reperfusió s'ha associat amb una reducció en la producció de ROS tant en mostres tissulars de cors de ratolí i de porc, sotmesos a isquèmia-reperfusió, com en mitocondris aïllats provinents del primer dels models.

En les mostres tissulars, la producció de ROS es va determinar mitjançant la utilització de MitoSOX Red, un marcador fluorescent de naturalesa catiònica, que és capaç de travessar la membrana plasmàtica i entrar al citoplasma i als mitocondris, on és oxidat en presència de superòxid, emetent fluorescència vermella. Idealment, el marcador s'hauria d'utilitzar en cèl·lules o sistemes energèticament actius, per tal de que es mantingui el potencial de membrana mitocondrial que permet l'entrada activa del reactiu. Tot i així, la perfusió de cors aïllats de ratolí amb MitoSOX Red no va ser tècnicament possible, donada l'elevada quantitat necessària per a perfundir correctament tot el teixit, i molt menys en el model porcí, per causes evidents. A més a

més, la incubació de mostres de teixit fresc cardíac tampoc era possible ja que un cop estreta la mostra, aquesta resta en isquèmia durant el període d'incubació amb el marcador, fet que podria afectar els resultats. Per aquest motiu, es va realitzar el marcatge després de fixar les mostres, amb un protocol utilitzat prèviament en altres publicacions per a determinar la producció de ROS mitocondrials ³⁹⁷.

Així, en ambdós models experimentals, el marcatge amb MitoSOX Red va mostrar un gran increment en la senyal d'aquest marcador, indicant major producció de ROS, en les mostres obtingudes 5 minuts després de la reperfusió, en comparació amb aquelles obtingudes de cors de ratolí normòxics o de l'àrea miocàrdica control en el porc. De manera notòria, però, l'administració de malonat en el moment de la reperfusió va atenuar aquest increment en el marcatge a MitoSOX Red, demostrant-se que l'efecte protector de la inhibició de la succinat deshidrogenasa durant la reperfusió s'associa amb una menor producció de ROS durant aquesta fase.

Com s'ha comentat en la introducció d'aquesta tesi, l'elevat estrès oxidatiu que ocorre després d'un període d'isquèmia és un dels grans responsables del dany per reperfusió, provocant múltiples efectes en l'estructura cel·lular, incloent alteracions en el DNA, proteïnes i lípids, així com havent-se associat a l'obertura del mPTP. Múltiples han estat les estratègies per tal de reduir l'estrès oxidatiu que ocorre en el moment de la reobertura de l'artèria, entre les quals figuren els sistemes d'eliminació o degradació dels ROS un cop la molècula oxidant ja està formada, així com les basades en reduir directament la seva producció, incidint directament sobre l'element productiu ³²⁵. En models experimentals, la utilització de molècules antioxidants ha mostrat efectes beneficiosos en quant a reduir la producció de ROS ^{335,344}, com també ho ha fet la sobreexpressió d'enzims antioxidants en models transgènics, conferint una resistència al dany per isquèmia-reperfusió ^{398,399}. Malgrat els bons resultats a nivell experimental, la translació a la pràctica clínica ha donat lloc a resultats contradictoris ³²⁷.

L'alternativa, com s'ha esmentat, és interferir de manera directa en la producció de ROS. En aquest context, els mitocondris s'han descrit com els grans productors de radicals oxidants durant la reperfusió en teixits metabòlicament molt actius, com són el cor i el cervell. El gran moviment d'electrons al llarg de la CTE en aquests teixits figura com un emplaçament idoni perquè part dels electrons s'alliberin, en determinades condicions, cap a l'oxigen i acabin formant superòxid, acció que ocorre especialment en els complexos I i III ^{282,310}. De fet, la inhibició del complex I amb amobarbital, administrat a l'inici de la reperfusió en models de cor aïllat de rata i ratolí, és capaç de reduir de manera significativa la mida de l'infart i la producció de ROS ^{368,400}. Tot i així, la seva possible translació a la pràctica clínica queda vetada degut als efectes sedants i hipnòtics d'aquest barbitúric.

En aquest context, estudis recents han suggerit la participació directa o indirecta del complex II en la producció de ROS. Així, s'ha plantejat que el complex II podria ser un productor de ROS per si mateix quan el complex III resta inhibit i s'impedeix la ràpida reoxidació de la ubiquinona^{312,313}. La producció de radicals tindria lloc en el domini II_F, domini d'unió a carboxilats (per exemple el succinat). Mitjançant la utilització d'inhibidors selectius d'aquest domini, com el malonat i l'oxalacetat, s'ha proposat que seria aquest domini, en la seva conformació buida, juntament amb la presència d'unitats de flavina reduïda, on el complex II podria produir ROS de manera independent a l'activitat dels complexos I i III^{312,401}.

A més de poder produir directament ROS per si mateix, el complex II té un important paper com a modulador de la producció de ROS per part del complex I a partir de la RET. Perquè la RET tingui lloc s'han de complir unes condicions molt especials que es donen precisament durant la reperfusió. Aquestes condicions inclouen la presència de condicions reductores i d'una elevada força motriu als mitocondris, junt amb una gran acumulació del substrat endogen de la succinat deshidrogenasa, el succinat, fet que hem confirmat en els nostres estudis metabolòmics^{310,316}. Com s'ha esmentat abans, i segons aquesta teoria, la producció massiva de ROS durant la reperfusió seria deguda a que, durant aquesta fase, el succinat acumulat durant la isquèmia és ràpidament oxidat a fumarat per la normalització de l'activitat de l'enzim. Aquesta oxidació del succinat està acoblada, al mateix temps, a transferència d'electrons a nivell de la CTE. Ara bé, sota les condicions abans esmentades^{310,316}, almenys una part dels electrons no podrien dirigir-se cap al complex III, i serien transportats en la direcció reversa, cap al complex I, que serà el responsable últim de produir grans quantitats de ROS³⁷⁸. De fet, quan es prevé l'acumulació de succinat durant la isquèmia, mitjançant inhibició reversible de la succinat deshidrogenasa amb malonat, administrat prèviament a l'oclusió coronària, no tan sols es redueix la mida de l'infart, si no que aquest fet s'associa a una menor producció de ROS, que és dependent de rotenona, un inhibidor del complex I³⁷⁸.

De manera similar al que passava en les mostres tissulars, preparacions mitocondrials provinents de cors normòxics de ratolí incubades amb substrats del complex I van mostrar que si s'afegia succinat (com si es trobessin en les concentracions elevades d'aquest metabòlit que apareixen durant la isquèmia) es produïa un augment en el consum d'oxigen, efecte associat amb una gran producció de ROS, i ambdós fenòmens van ser reduïts en presència de l'inhibidor del complex II, malonat. Els mateixos resultats es van observar en preparacions mitocondrials extretes de cors de ratolí sotmesos a 35 minuts d'isquèmia i 5 minuts de reperfusió.

La detecció de ROS que hem utilitzat en aquesta tesi ha estat un marcatge directe, en el cas del MitoSOX Red, i un mètode pseudo indirecte en el model de mitocondris aïllats. Altres mètodes que podríem haver utilitzat es basen en l'anàlisi de productes

secundaris formats com a conseqüència de la reacció de ROS amb diferents molècules, com pot ser la producció de MDA deguda a la peroxidació lipídica ⁴⁰².

5. MECANISMES DE L'EFECTE PROTECTOR DEL MALONAT DURANT LA REPERFUSIÓ: INHIBICIÓ DE L'OBERTURA DEL mPTP.

El mPTP ha estat proposat com un dels mecanismes de mort cel·lular durant la isquèmia-reperfusió, ja que provoca disfunció mitocondrial, amb aparició d'edema de la matriu, despolarització mitocondrial, pèrdua del gradient de pH, inhibició de la respiració mitocondrial, aturada de la síntesis d'ATP i alliberació del contingut de calci i de factors pro-apoptòtics al citosol ³⁶. Es ben sabuda la relació entre la producció de ROS i l'obertura del mPTP, sent un dels principals factors que afavoreixen la seva obertura ⁴⁰³. Per aquest motiu vam analitzar, en preparacions mitocondrials provinents de cors aïllats de ratolí, si el malonat era capaç de modular l'obertura del mPTP. Per determinar el grau d'obertura del mPTP vam incubar els mitocondris amb calceïna, determinant l'obertura del porus com una reducció en el percentatge de retenció de la mateixa. Així, l'addició de succinat, que prèviament havíem vist que s'associava amb augment del consum d'oxigen i producció de ROS, produïa una reducció en el percentatge de retenció de calceïna, indicatiu d'obertura del porus, que es va atenuar en presència de malonat. A més, els efectes del malonat van ser similars al de la CsA, un dels inhibidors clàssics del mPTP. Per tant, l'efecte protector del malonat va associar-se, a més de amb una reducció en la producció de ROS, amb una menor obertura del mPTP.

La nostra hipòtesi seria, doncs, que durant la reperfusió, en condicions normals, el gran acúmul de succinat produït durant la isquèmia seria ràpidament oxidat, donant lloc a la RET a nivell de la CTE mitocondrial. Aquesta desencadenaria una gran producció de ROS per part del complex I, que, al seu torn, produirien l'obertura del mPTP. La participació del complex I es basa en que la producció de ROS durant la reperfusió es inhibible per rotenona ³⁷⁸. L'administració de malonat a l'inici de la reperfusió inhibiria l'oxidació del succinat, mantenint les seves concentracions elevades (tal i com hem demostrat mitjançant ressonància magnètica nuclear). Aquest fet provocaria una menor RET, disminuint la producció de ROS (fet confirmat en mostres de teixit mitjançant tinció amb MitoSOX Red, i en mitocondris aïllats), i per tant l'obertura del mPTP (demostrat mitjançant marcatge amb calceïna de mitocondris aïllats). Aquesta cadena d'esdeveniments conclourien en una disminució en la mida final de l'infart.

Cal afegir, però, que recentment alguns investigadors han postulat que la fase inicial d'obertura del mPTP seria anterior a la producció de ROS per RET, i que probablement estaria desencadenada per altres factors com pot ser l'augment de calci al mitocondri, i possiblement canvis en l'associació d'hexoquinasa 2 a aquest orgànu ³⁹⁵. Segons

aquests mateixos autors, el gran increment en la producció de ROS observat posteriorment en la reperfusió tindria lloc com a conseqüència de l'obertura inicial del mPTP, encara que els ROS produïts sí podrien tenir un paper posterior facilitant una major obertura del mPTP ³⁹⁵. Per altra banda, altres autors han suggerit que sí existiria una producció inicial de ROS per RET que causaria obertura del mPTP, i que aquest augment de la permeabilitat mitocondrial produiria, al seu torn, encara més ROS per part dels complexos II i III ⁴⁰¹. De totes maneres, sigui quin sigui l'ordre d'execució, el tractament amb malonat ha demostrat, al nostre estudi, reduir tant la producció de ROS, com l'obertura del mPTP.

6. L'EFECTE PROTECTOR DEL MALONAT NO S'ASSOCIA AMB ACTIVACIÓ DE CASCADES CITOSÒLIQUES DE CARDIOPROTECCIÓ.

S'ha demostrat que les vies RISK i SAFE juguen un paper molt important en els mecanismes endògens de cardioprotecció, així com en els d'alguns tractaments farmacològics ^{16,404}. L'activació d'aquestes cascades es basa en la fosforilació de manera consecutiva de les diferents proteïnes quinases que les integren, les quals convergeixen a nivell mitocondrial fins a actuar en els efectors finals, entre els quals es troba el mPTP. Donat l'efecte protector de l'administració de malonat en el moment de la reperfusió vam decidir avaluar la possible implicació d'aquestes vies de senyalització en els mecanismes involucrats.

Així, en el model de cor aïllat de ratolí es va poder analitzar el paper d'aquestes vies cel·lulars, mitjançant extracció de proteïnes i anàlisi per western blot de mostres de cors normòxics i sotmesos a isquèmia i 5 minuts de reperfusió, sense o amb tractament amb malonat. Per estudiar la participació de la via RISK vam analitzar el grau d'activació i d'expressió d'Akt, ERK1/2 i de GSK3 β , mentre que per la via SAFE vam estudiar STAT3. Així, vam observar que la isquèmia-reperfusió produïa una activació marcada de les proteïnes ERK1/2 i GSK3 β , però no d'Akt o STAT3. Ara bé, el tractament amb malonat no va modificar aquests canvis induïts per la isquèmia-reperfusió. D'aquesta manera, l'anàlisi conjunt d'aquestes dades indica que l'efecte protector de la inhibició de la succinat deshidrogenasa amb malonat a l'inici de la reperfusió és independent de l'activació de les vies RISK o SAFE. La manca de participació de les vies citosòliques esmentades ja havia estat demostrada en altres intervencions cardioprotectors, indicant que la preservació de la funció mitocondrial pot estar regulada de manera independent a la senyalització citosòlica ^{71,405}.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. La inhibició reversible de la succinat deshidrogenasa amb malonat disòdic a l'inici de la reperfusió és cardioprotectora enfront l'infart de miocardi, tant en cors aïllats de ratolins com en un model porcí d'oclusió coronària transitòria, sense que s'hagin detectat efectes indesitjables sobre la incidència d'arrítmies, ni sobre la funció del miocardi remot.
2. Aquest efecte protector, que ocorre durant la reperfusió, s'associa a canvis en el perfil metabòlic del miocardi, amb un increment, en el grup tractat, de les concentracions de succinat. Aquest augment és conseqüència del gran acúmul produït durant la isquèmia i degut a una reducció en la seva oxidació durant la reperfusió.
3. La protecció induïda per la inhibició de la succinat deshidrogenasa a l'inici de la reperfusió és deguda a una alteració de la funció mitocondrial, amb una reducció en el consum d'oxigen, i per tant, menor producció tissular de ROS i atenuació de l'obertura del mPTP, però no a activació de cascades de senyalització citosòliques.
4. La inhibició de la respiració mitocondrial amb malonat pot convertir-se en una nova estratègia terapèutica a utilitzar en pacients amb infart agut de miocardi amb elevació del segment ST.

LÍNIES DE FUTUR

LÍNIES DE FUTUR

En aquesta tesi s'ha demostrat que l'administració de malonat a l'inici de la reperfusió té efectes protectors sobre el dany per isquèmia-reperfusió, reduint la mida de l'infart de manera aguda tant en un model de cor aïllat de ratolí, com en un model clínicament més rellevant, com és el model porcí d'oclusió coronària transitòria. Els resultats d'aquest treball obren, per tant, la possibilitat d'utilitzar la inhibició de la succinat deshidrogenasa amb malonat com a teràpia coadjuvant a la de reperfusió, en pacients amb cardiopatia isquèmica sotmesos a procediments de revascularització percutània. Abans de la seva possible translació a la pràctica clínica, però, és necessari continuar investigant alguns detalls que queden pendents. En aquest sentit, els resultats d'aquesta tesi tenen, ja, una continuïtat en dos direccions principals.

Per un costat, donat que l'apoptosi juga un paper residual en el dany agut per reperfusió^{386,387}, seria lògic pensar que una reducció en la mida de l'infart s'ha d'associar, forçosament, a una disminució en el remodelat posterior. Tot i així, no podem descartar que a llarg termini, l'apoptosi jugui un paper en una hipotètica mort tardana. En aquesta situació, seria possible que els efectes protectors del malonat sobre la mida de l'infart desapareguessin a llarg termini. Per aquest motiu, hem iniciat un nou estudi per avaluar els efectes del tractament amb malonat, administrat a l'inici de la reperfusió, sobre el remodelat ventricular advers postinfart, en un model d'oclusió coronària transitòria de 45 minuts seguida de reperfusió de 28 dies en ratolí. La realització d'aquest últim estudi té especial importància ja que el remodelat ventricular advers és una de les principals conseqüències de l'infart agut de miocardi, conduint a l'aparició d'insuficiència cardíaca, amb la consegüent disminució en la qualitat de vida dels pacients afectats⁴⁰⁶. En aquest nou estudi, l'administració de malonat en el model in vivo murí s'ha realitzat de manera intravenosa, en la vena jugular externa, mitjançant infusió de la droga a una concentració de 10 mg/kg/min. Primerament, però, hem hagut de confirmar que l'eficàcia protectora del malonat enfront l'infart de miocardi també es manté en aquest model, a les 24 hores de la reperfusió. Així, un total de 10 animals van ser sotmesos a 45 minuts d'isquèmia, i van rebre una infusió intravenosa de solució salina contenint o no malonat, a la concentració esmentada, durant els primers 15 minuts de la reperfusió. A les 24 hores, els animals van ser sacrificats i es va mesurar la mida de l'infart amb la tinció de clorur de trifeniltetrazoli. Els resultats obtinguts han demostrat que, efectivament, l'eficàcia cardioprotectora aguda de la inhibició de la succinat deshidrogenasa durant les fases inicials de la reperfusió persisteix també en aquest model (la mida de l'infart va ser d'un $32,87 \pm 3,30$ % en el grup control vs. $20,47 \pm 2,76$ % en el grup tractat, $p=0,020$, $n=5/\text{grup}$). Un cop confirmat aquest efecte protector, en un grup d'animals addicional, en el que la reperfusió va durar 28 dies, vam analitzar els efectes del tractament amb malonat a l'inici de la reperfusió sobre la mida de la cicatriu miocàrdica postinfart,

mesurada amb la tinció de Picrosirius Red. D'aquesta manera, hem pogut demostrar que la inhibició de la succinat deshidrogenasa durant els primers minuts de la reperfusió produeix una reducció en la mida de la cicatriu, comparada amb la del grup control ($23,25 \pm 2,67\%$ en el grup control ($n=9$) vs. $11,94 \pm 1,70\%$ en el grup tractat ($n=5$), $p=0,031$), i aquests resultats van correlacionar amb una millora de la funció cardíaca a llarg termini, mesurada mitjançant ecocardiografia. D'aquesta manera es confirma l'estreta relació entre l'aparició de remodelat ventricular advers i la mida de l'infart i es postula el tractament amb malonat com una nova estratègia terapèutica per a reduir el dany per isquèmia-reperfusió, tant a curt com llarg termini.

Per altre costat, i considerant que el dany per isquèmia-reperfusió és degut a la interacció de diferents mecanismes moleculars i cel·lulars, i que molts dels tractaments que han donat lloc a resultats positius a nivell experimental, després no han estat eficaços a la pràctica clínica, una aproximació interessant, per tal d'augmentar l'eficàcia cardioprotectora de qualsevol tractament, seria la utilització de teràpies combinades. De fet, aquesta ha estat una de les recomanacions fetes en una revisió recent sobre el tema per tal d'augmentar l'efectivitat dels tractaments dirigits al dany per reperfusió⁴⁰⁷. Per tal d'aconseguir efectes additius, els tractaments a combinar haurien de tenir diferents mecanismes d'acció. Entre els candidats més interessants es troben les maniobres de cardioprotecció endògena, com és el RIC, que activen múltiples vies, incloent cascades citosòliques de senyalització. Així doncs fora interessant valorar la possible existència d'efectes additius entre l'administració de malonat durant la reperfusió i la realització de la maniobra del RIC. Cal destacar, que el malonat té l'avantatge, en comparació amb altres drogues, de ser un inhibidor reversible i d'origen natural, i la maniobra del RIC es caracteritza per ser una estratègia senzilla, segura i barata, la qual ja ha estat demostrada com a estratègia cardioprotectora enfront la mida de l'infart en estudis experimentals i clínics anteriors⁴⁰⁸. Aquesta és, precisament, la segona línia d'investigació que hem iniciat recentment.

Previ a la translació del tractament amb malonat a pacients amb SCAEST, bé sigui com a teràpia individual, o formant part d'una teràpia combinada, caldria demostrar que el principi terapèutic és efectiu en el teixit miocàrdic humà. Un possible abordatge es basaria en la utilització de mostres de teixit auricular humà (provinents de mostres de pacients intervinguts per cirurgia cardíaca), les quals podrien ser sotmeses a episodis d'isquèmia-reperfusió simulada en bany d'òrgans. Mitjançant aquesta metodologia és possible analitzar si l'efecte protector del malonat persisteix en el teixit humà. A més seria interessant determinar per ressonància magnètica nuclear si el succinat, en aquest teixit, també pot ser considerat un marcador d'isquèmia, com s'ha demostrat en teixits animals³⁷⁸. Finalment, seria d'interès utilitzar altres tècniques metabòliques, com l'espectroscòpia de masses, per tal de detectar canvis en altres metabòlits que es troben en concentracions més baixes. La ressonància magnètica

nuclear només permet detectar rangs de concentració de mili molar, mentre que la tecnologia de masses permet fer-ho fins al rang pico molar⁴⁰⁹.

Qualsevol fàrmac que vulgui ser utilitzat en pacients ha de comptar amb estudis complets de farmacotoxicitat, a ser possible en diferents models experimentals, incloent algun pròxim a l'humà. Donat que certs treballs previs han postulat l'existència d'accions neurotòxiques del malonat³⁸⁸, caldria analitzar més a fons aquest possible efecte contraproductiu. En aquesta tesi hem utilitzat el model porcí en fase aguda i amb tòrax obert, però no hem pogut realitzar un seguiment de la toxicitat del fàrmac, ja fos mitjançant proves comportamentals, de funció neuronal, o de funció renal i hepàtica, que, a més, permetrien conèixer la ruta d'eliminació del fàrmac i la seva biodistribució dins l'organisme. Tampoc en el nostre model murí vam poder realitzar tots aquests estudis. Un abordatge interessant seria la utilització d'un model porcí amb tòrax tancat, en el que l'oclusió coronària es realitzaria mitjançant inflat d'un baló intracoronari. Aquest model permetria la recuperació de l'animal després de la isquèmia índex, i poder avaluar la toxicitat del tractament, mitjançant anàlisi de sang, orina, i líquid cefaloraquídi, així com la realització de tests de comportament i cognició. A més, la mida de l'infart i la funció cardíaca, es podrien valorar per ressonància magnètica nuclear i ecocardiografia, durant tot el seguiment.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Roth, G. A., *et al.* "Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015," *J Am Coll Cardiol***70**, 1 (2017)
2. Mathers, C. D. and Loncar, D. "Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030," *PLoS Med***3**, e442 (2006)
3. Moran, A. E., *et al.* "Temporal trends in ischemic heart disease mortality in 21 world regions, 1980 to 2010: the Global Burden of Disease 2010 study," *Circulation***129**, 1483 (2014)
4. Mendis, S., Puska, P., and Norrving, B. "Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. World Health Organization.," *World Health Organization Geneva* (2011)
5. Reimer, K. A., Lowe, J. E., Rasmussen, M. M., and Jennings, R. B. "The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs," *Circulation***56**, 786 (1977)
6. Garcia-Dorado, D., *et al.* "Myocardial reperfusion in the pig heart model: infarct size and duration of coronary occlusion," *Cardiovasc Res***21**, 537 (1987)
7. Garcia-Dorado, D., Rodriguez-Sinovas, A., and Ruiz-Meana, M. "Gap junction-mediated spread of cell injury and death during myocardial ischemia-reperfusion," *Cardiovasc Res***61**, 386 (2004)
8. Hausenloy, D. J. and Yellon, D. M. "Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target," *J Clin Invest***123**, 92 (2013)
9. Piper, H. M., Garcia-Dorado, D., and Ovize, M. "A fresh look at reperfusion injury," *Cardiovasc Res***38**, 291 (1998)
10. Rodriguez-Sinovas, A., Abdallah, Y., Piper, H. M., and Garcia-Dorado, D. "Reperfusion injury as a therapeutic challenge in patients with acute myocardial infarction," *Heart Fail Rev***12**, 207 (2007)
11. Garcia-Dorado, D., Rodriguez-Sinovas, A., Ruiz-Meana, M., and Inserte, J. "Protection against myocardial ischemia-reperfusion injury in clinical practice," *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)***67**, 394 (2014)
12. Frohlich, G. M., Meier, P., White, S. K., Yellon, D. M., and Hausenloy, D. J. "Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI," *Eur Heart J***34**, 1714 (2013)
13. Inserte, J., *et al.* "Effect of acidic reperfusion on prolongation of intracellular acidosis and myocardial salvage," *Cardiovasc Res***77**, 782 (2008)
14. Piper, H. M., Abdallah, Y., and Schafer, C. "The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection," *Cardiovasc Res***61**, 365 (2004)
15. Bowers, K. C., Allshire, A. P., and Cobbold, P. H. "Bioluminescent measurement in single cardiomyocytes of sudden cytosolic ATP depletion coincident with rigor," *J Mol Cell Cardiol***24**, 213 (1992)
16. Murphy, E. and Steenbergen, C. "Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury," *Physiol Rev***88**, 581 (2008)

17. Ganote, C. E. "Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury," *J Mol Cell Cardiol***15**, 67 (1983)
18. Garcia-Dorado, D., *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***85**, 1160 (1992)
19. Miyazaki, S., *et al.* "Quantitative analysis of contraction band and coagulation necrosis after ischemia and reperfusion in the porcine heart," *Circulation***75**, 1074 (1987)
20. Inserte, J., Garcia-Dorado, D., Hernando, V., and Soler-Soler, J. "Calpain-mediated impairment of Na⁺/K⁺-ATPase activity during early reperfusion contributes to cell death after myocardial ischemia," *Circ Res***97**, 465 (2005)
21. Piper, H. M., Kasseckert, S., and Abdallah, Y. "The sarcoplasmic reticulum as the primary target of reperfusion protection," *Cardiovasc Res***70**, 170 (2006)
22. Ruiz-Meana, M., Fernandez-Sanz, C., and Garcia-Dorado, D. "The SR-mitochondria interaction: a new player in cardiac pathophysiology," *Cardiovasc Res***88**, 30 (2010)
23. Priori, S. G., Mantica, M., Napolitano, C., and Schwartz, P. J. "Early afterdepolarizations induced in vivo by reperfusion of ischemic myocardium. A possible mechanism for reperfusion arrhythmias," *Circulation***81**, 1911 (1990)
24. Garcia-Dorado, D., Andres-Villarreal, M., Ruiz-Meana, M., Inserte, J., and Barba, I. "Myocardial edema: a translational view," *J Mol Cell Cardiol***52**, 931 (2012)
25. Inserte, J., Hernando, V., and Garcia-Dorado, D. "Contribution of calpains to myocardial ischaemia/reperfusion injury," *Cardiovasc Res***96**, 23 (2012)
26. Armstrong, S. C., Latham, C. A., Shivell, C. L., and Ganote, C. E. "Ischemic loss of sarcolemmal dystrophin and spectrin: correlation with myocardial injury," *J Mol Cell Cardiol***33**, 1165 (2001)
27. Liu, X. and Schnellmann, R. G. "Calpain mediates progressive plasma membrane permeability and proteolysis of cytoskeleton-associated paxillin, talin, and vinculin during renal cell death," *J Pharmacol Exp Ther***304**, 63 (2003)
28. Inserte, J., Garcia-Dorado, D., Hernando, V., Barba, I., and Soler-Soler, J. "Ischemic preconditioning prevents calpain-mediated impairment of Na⁺/K⁺-ATPase activity during early reperfusion," *Cardiovasc Res***70**, 364 (2006)
29. Muller, A. L., Hryshko, L. V., and Dhalla, N. S. "Extracellular and intracellular proteases in cardiac dysfunction due to ischemia-reperfusion injury," *Int J Cardiol***164**, 39 (2013)
30. Sanchez, J. A., Rodriguez-Sinovas, A., Fernandez-Sanz, C., Ruiz-Meana, M., and Garcia-Dorado, D. "Effects of a reduction in the number of gap junction channels or in their conductance on ischemia-reperfusion arrhythmias in isolated mouse hearts," *Am J Physiol Heart Circ Physiol***301**, H2442-H2453 (2011)
31. Rodriguez-Sinovas, A., Sanchez, J. A., Fernandez-Sanz, C., Ruiz-Meana, M., and Garcia-Dorado, D. "Connexin and pannexin as modulators of myocardial injury," *Biochim Biophys Acta***1818**, 1962 (2012)
32. Ruiz-Meana, M., Garcia-Dorado, D., Hofstaetter, B., Piper, H. M., and Soler-Soler, J. "Propagation of cardiomyocyte hypercontracture by passage of Na⁽⁺⁾ through gap junctions," *Circ Res***85**, 280 (1999)

33. Liu, S., *et al.* "A structural basis for the unequal sensitivity of the major cardiac and liver gap junctions to intracellular acidification: the carboxyl tail length," *Biophys J***64**, 1422 (1993)
34. Garcia-Dorado, D., *et al.* "Gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion," *Circulation***96**, 3579 (1997)
35. Rodriguez-Sinovas, A., Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., and Soler-Soler, J. "Enhanced effect of gap junction uncouplers on macroscopic electrical properties of reperfused myocardium," *J Physiol***559**, 245 (2004)
36. Ruiz-Meana, M., Garcia-Dorado, D., Miro-Casas, E., Abellan, A., and Soler-Soler, J. "Mitochondrial Ca²⁺ uptake during simulated ischemia does not affect permeability transition pore opening upon simulated reperfusion," *Cardiovasc Res***71**, 715 (2006)
37. Hausenloy, D. J., Duchen, M. R., and Yellon, D. M. "Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury," *Cardiovasc Res***60**, 617 (2003)
38. Kloner, R. A. "Does reperfusion injury exist in humans?," *J Am Coll Cardiol***21**, 537 (1993)
39. Kroemer, G., Dallaporta, B., and Resche-Rigon, M. "The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis," *Annu Rev Physiol***60**, 619 (1998)
40. Morciano, G., *et al.* "Mechanistic Role of mPTP in Ischemia-Reperfusion Injury," *Adv Exp Med Biol***982**, 169 (2017)
41. Perez, M. J. and Quintanilla, R. A. "Development or disease: duality of the mitochondrial permeability transition pore," *Dev Biol***426**, 1 (2017)
42. Kokoszka, J. E., *et al.* "The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore," *Nature***427**, 461 (2004)
43. Baines, C. P., Kaiser, R. A., Sheiko, T., Craigen, W. J., and Molkentin, J. D. "Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death," *Nat Cell Biol***9**, 550 (2007)
44. Elrod, J. W. and Molkentin, J. D. "Physiologic functions of cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition pore," *Circ J***77**, 1111 (2013)
45. Izzo, V., Bravo-San Pedro, J. M., Sica, V., Kroemer, G., and Galluzzi, L. "Mitochondrial Permeability Transition: New Findings and Persisting Uncertainties," *Trends Cell Biol***26**, 655 (2016)
46. Nakagawa, T., *et al.* "Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death," *Nature***434**, 652 (2005)
47. Jonas, E. A., Porter, G. A., Jr., Beutner, G., Mnatsakanyan, N., and Alavian, K. N. "Cell death disguised: The mitochondrial permeability transition pore as the c-subunit of the F(1)F(0) ATP synthase," *Pharmacol Res***99**, 382 (2015)
48. Giorgio, V., *et al.* "Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore," *Proc Natl Acad Sci U S A***110**, 5887 (2013)
49. Alavian, K. N., *et al.* "An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F1FO ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore," *Proc Natl Acad Sci U S A***111**, 10580 (2014)

50. Bonora, M., *et al.* "Role of the c subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition," *Cell Cycle***12**, 674 (2013)
51. Azarashvili, T., *et al.* "Potential role of subunit c of F₀F₁-ATPase and subunit c of storage body in the mitochondrial permeability transition. Effect of the phosphorylation status of subunit c on pore opening," *Cell Calcium***55**, 69 (2014)
52. Crompton, M., Costi, A., and Hayat, L. "Evidence for the presence of a reversible Ca²⁺-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria," *Biochem J***245**, 915 (1987)
53. Crompton, M. and Costi, A. "Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca²⁺, inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca²⁺ overload," *Eur J Biochem***178**, 489 (1988)
54. Crompton, M., Ellinger, H., and Costi, A. "Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress," *Biochem J***255**, 357 (1988)
55. Ruiz-Meana, M., *et al.* "The role of mitochondrial permeability transition in reperfusion-induced cardiomyocyte death depends on the duration of ischemia," *Basic Res Cardiol***106**, 1259 (2011)
56. Bernink, F. J., *et al.* "Effect of additional treatment with EXenatide in patients with an Acute Myocardial Infarction: the EXAMI study," *Int J Cardiol***167**, 289 (2013)
57. Saxena, P., Newman, M. A., Shehatha, J. S., Redington, A. N., and Konstantinov, I. E. "Remote ischemic conditioning: evolution of the concept, mechanisms, and clinical application," *J Card Surg***25**, 127 (2010)
58. Yellon, D. M. and Downey, J. M. "Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology," *Physiol Rev***83**, 1113 (2003)
59. Yamasaki, K., *et al.* "Preconditioning with 15-minute ischemia extends myocardial infarct size after subsequent 30-minute ischemia in rabbits," *Jpn Circ J***61**, 344 (1997)
60. Schulz, R., Cohen, M. V., Behrends, M., Downey, J. M., and Heusch, G. "Signal transduction of ischemic preconditioning," *Cardiovasc Res***52**, 181 (2001)
61. Vander, H. R. "Clinically useful cardioprotection: ischemic preconditioning then and now," *J Cardiovasc Pharmacol Ther***16**, 251 (2011)
62. Stokfisz, K., Ledakowicz-Polak, A., Zagorski, M., and Zielinska, M. "Ischaemic preconditioning - Current knowledge and potential future applications after 30 years of experience," *Adv Med Sci***62**, 307 (2017)
63. Przyklenk, K. "Reduction of myocardial infarct size with ischemic "conditioning": physiologic and technical considerations," *Anesth Analg***117**, 891 (2013)
64. Tullio, F., Angotti, C., Perrelli, M. G., Penna, C., and Pagliaro, P. "Redox balance and cardioprotection," *Basic Res Cardiol***108**, 392 (2013)
65. Schulz, R., Kelm, M., and Heusch, G. "Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury," *Cardiovasc Res***61**, 402 (2004)
66. Hausenloy, D. J. and Yellon, D. M. "Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection," *Heart Fail Rev***12**, 217 (2007)

67. Budas, G. R., Churchill, E. N., and Mochly-Rosen, D. "Cardioprotective mechanisms of PKC isozyme-selective activators and inhibitors in the treatment of ischemia-reperfusion injury," *Pharmacol Res***55**, 523 (2007)
68. Costa, A. D., *et al.* "Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria," *Circ Res***97**, 329 (2005)
69. Park, S. S., Zhao, H., Mueller, R. A., and Xu, Z. "Bradykinin prevents reperfusion injury by targeting mitochondrial permeability transition pore through glycogen synthase kinase 3beta," *J Mol Cell Cardiol***40**, 708 (2006)
70. Lecour, S. "Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway?," *J Mol Cell Cardiol***47**, 32 (2009)
71. Ruiz-Meana, M., *et al.* "Ischemic preconditioning protects cardiomyocyte mitochondria through mechanisms independent of cytosol," *J Mol Cell Cardiol***68**, 79 (2014)
72. Heusch, G., Boengler, K., and Schulz, R. "Cardioprotection: nitric oxide, protein kinases, and mitochondria," *Circulation***118**, 1915 (2008)
73. Murry, C. E., Jennings, R. B., and Reimer, K. A. "Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium," *Circulation***74**, 1124 (1986)
74. Taggart, P. and Yellon, D. M. "Preconditioning and arrhythmias," *Circulation***106**, 2999 (2002)
75. Schmidt, M. R., Pryds, K., and Botker, H. E. "Novel adjunctive treatments of myocardial infarction," *World J Cardiol***6**, 434 (2014)
76. Teoh, L. K., Grant, R., Hulf, J. A., Pugsley, W. B., and Yellon, D. M. "The effect of preconditioning (ischemic and pharmacological) on myocardial necrosis following coronary artery bypass graft surgery," *Cardiovasc Res***53**, 175 (2002)
77. Reiter, R., Henry, T. D., and Traverse, J. H. "Preinfarction angina reduces infarct size in ST-elevation myocardial infarction treated with percutaneous coronary intervention," *Circ Cardiovasc Interv***6**, 52 (2013)
78. Cohen, M. V. and Downey, J. M. "Ischemic postconditioning: from receptor to end-effector," *Antioxid Redox Signal***14**, 821 (2011)
79. Hausenloy, D. J. and Yellon, D. M. "Ischaemic conditioning and reperfusion injury," *Nat Rev Cardiol***13**, 193 (2016)
80. Inserte, J., Ruiz-Meana, M., Rodriguez-Sinovas, A., Barba, I., and Garcia-Dorado, D. "Contribution of delayed intracellular pH recovery to ischemic postconditioning protection," *Antioxid Redox Signal***14**, 923 (2011)
81. Rodriguez-Sinovas, A., *et al.* "Intracoronary acid infusion as an alternative to ischemic postconditioning in pigs," *Basic Res Cardiol***104**, 761 (2009)
82. Zhao, Z. Q., *et al.* "Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning," *Am J Physiol Heart Circ Physiol***285**, H579-H588 (2003)
83. Perez, V., *et al.* "Ischemic postconditioning confers cardioprotection and prevents reduction of Trx-1 in young mice, but not in middle-aged and old mice," *Mol Cell Biochem***415**, 67 (2016)

84. Insete, J., *et al.* "cGMP/PKG pathway mediates myocardial postconditioning protection in rat hearts by delaying normalization of intracellular acidosis during reperfusion," *J Mol Cell Cardiol***50**, 903 (2011)
85. Chiari, P. C., *et al.* "Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction: evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits," *Anesthesiology***102**, 102 (2005)
86. Staat, P., *et al.* "Postconditioning the human heart," *Circulation***112**, 2143 (2005)
87. Thibault, H., *et al.* "Long-term benefit of postconditioning," *Circulation***117**, 1037 (2008)
88. Yang, X. C., *et al.* "Reduction in myocardial infarct size by postconditioning in patients after percutaneous coronary intervention," *J Invasive Cardiol***19**, 424 (2007)
89. Lonborg, J., *et al.* "Cardioprotective effects of ischemic postconditioning in patients treated with primary percutaneous coronary intervention, evaluated by magnetic resonance," *Circ Cardiovasc Interv***3**, 34 (2010)
90. Tarantini, G., *et al.* "Postconditioning during coronary angioplasty in acute myocardial infarction: the POST-AMI trial," *Int J Cardiol***162**, 33 (2012)
91. Freixa, X., *et al.* "Ischaemic postconditioning revisited: lack of effects on infarct size following primary percutaneous coronary intervention," *Eur Heart J***33**, 103 (2012)
92. Sorensson, P., *et al.* "Effect of postconditioning on infarct size in patients with ST elevation myocardial infarction," *Heart***96**, 1710 (2010)
93. Hahn, J. Y., *et al.* "Ischemic postconditioning during primary percutaneous coronary intervention: the effects of postconditioning on myocardial reperfusion in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (POST) randomized trial," *Circulation***128**, 1889 (2013)
94. Limalanathan, S., *et al.* "Effect of ischemic postconditioning on infarct size in patients with ST-elevation myocardial infarction treated by primary PCI results of the POSTEMI (POstconditioning in ST-Elevation Myocardial Infarction) randomized trial," *J Am Heart Assoc***3**, e000679 (2014)
95. Heusch, G., Botker, H. E., Przyklenk, K., Redington, A., and Yellon, D. "Remote ischemic conditioning," *J Am Coll Cardiol***65**, 177 (2015)
96. Kharbanda, R. K., *et al.* "Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo," *Circulation***106**, 2881 (2002)
97. Schmidt, M. R., *et al.* "Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: first demonstration of remote ischemic preconditioning," *Am J Physiol Heart Circ Physiol***292**, H1883-H1890 (2007)
98. Kerendi, F., *et al.* "Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors," *Basic Res Cardiol***100**, 404 (2005)
99. Heusch, G. "Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning," *Circ Res***116**, 674 (2015)
100. Hausenloy, D. J., *et al.* "Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: a 30 year voyage of discovery," *Basic Res Cardiol***111**, 70 (2016)

101. Hausenloy, D. J., *et al.* "Cardiac innervation in acute myocardial ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection," *Cardiovasc Res***115**, 1167 (2019)
102. Dickson, E. W., *et al.* "Rabbit heart can be "preconditioned" via transfer of coronary effluent," *Am J Physiol***277**, H2451-H2457 (1999)
103. Shimizu, M., *et al.* "Transient limb ischaemia remotely preconditions through a humoral mechanism acting directly on the myocardium: evidence suggesting cross-species protection," *Clin Sci (Lond)***117**, 191 (2009)
104. Rassaf, T., *et al.* "Circulating nitrite contributes to cardioprotection by remote ischemic preconditioning," *Circ Res***114**, 1601 (2014)
105. Li, J., *et al.* "MicroRNA-144 is a circulating effector of remote ischemic preconditioning," *Basic Res Cardiol***109**, 423 (2014)
106. Albuquerque-Bejar, J. J., *et al.* "Remote ischemic conditioning provides humoral cross-species cardioprotection through glycine receptor activation," *Cardiovasc Res***113**, 52 (2017)
107. Giricz, Z., *et al.* "Cardioprotection by remote ischemic preconditioning of the rat heart is mediated by extracellular vesicles," *J Mol Cell Cardiol***68**, 75 (2014)
108. Yellon, D. M. and Davidson, S. M. "Exosomes: nanoparticles involved in cardioprotection?," *Circ Res***114**, 325 (2014)
109. Redington, K. L., *et al.* "Remote cardioprotection by direct peripheral nerve stimulation and topical capsaicin is mediated by circulating humoral factors," *Basic Res Cardiol***107**, 241 (2012)
110. Steensrud, T., *et al.* "Pretreatment with the nitric oxide donor SNAP or nerve transection blocks humoral preconditioning by remote limb ischemia or intra-arterial adenosine," *Am J Physiol Heart Circ Physiol***299**, H1598-H1603 (2010)
111. Donato, M., *et al.* "Role of the parasympathetic nervous system in cardioprotection by remote hindlimb ischaemic preconditioning," *Exp Physiol***98**, 425 (2013)
112. Jensen, R. V., Stottrup, N. B., Kristiansen, S. B., and Botker, H. E. "Release of a humoral circulating cardioprotective factor by remote ischemic preconditioning is dependent on preserved neural pathways in diabetic patients," *Basic Res Cardiol***107**, 285 (2012)
113. Mastitskaya, S., *et al.* "Identifying the Source of a Humoral Factor of Remote (Pre)Conditioning Cardioprotection," *PLoS One***11**, e0150108 (2016)
114. Przyklenk, K., Bauer, B., Ovize, M., Kloner, R. A., and Whittaker, P. "Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion," *Circulation***87**, 893 (1993)
115. Gho, B. C., Schoemaker, R. G., van den Doel, M. A., Duncker, D. J., and Verdouw, P. D. "Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue," *Circulation***94**, 2193 (1996)
116. Pell, T. J., Baxter, G. F., Yellon, D. M., and Drew, G. M. "Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels," *Am J Physiol***275**, H1542-H1547 (1998)
117. Weinbrenner, C., Nelles, M., Herzog, N., Sarvary, L., and Strasser, R. H. "Remote preconditioning by infrarenal occlusion of the aorta protects the heart from infarction: a newly identified non-neuronal but PKC-dependent pathway," *Cardiovasc Res***55**, 590 (2002)

118. Lim, S. Y., Yellon, D. M., and Hausenloy, D. J. "The neural and humoral pathways in remote limb ischemic preconditioning," *Basic Res Cardiol***105**, 651 (2010)
119. Hausenloy, D. J., *et al.* "Investigating the signal transduction pathways underlying remote ischemic conditioning in the porcine heart," *Cardiovasc Drugs Ther***26**, 87 (2012)
120. Albuquerque-Bejar, J. J., *et al.* "Combination therapy with remote ischaemic conditioning and insulin or exenatide enhances infarct size limitation in pigs," *Cardiovasc Res***107**, 246 (2015)
121. Hausenloy, D. J., *et al.* "Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial," *Lancet***370**, 575 (2007)
122. Thielmann, M., *et al.* "Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: a single-centre randomised, double-blind, controlled trial," *Lancet***382**, 597 (2013)
123. Meybohm, P., *et al.* "A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery," *N Engl J Med***373**, 1397 (2015)
124. Hausenloy, D. J., *et al.* "Remote Ischemic Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery," *N Engl J Med***373**, 1408 (2015)
125. Botker, H. E., *et al.* "Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial," *Lancet***375**, 727 (2010)
126. Sloth, A. D., *et al.* "Improved long-term clinical outcomes in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing remote ischaemic conditioning as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention," *Eur Heart J***35**, 168 (2014)
127. Hoole, S. P., *et al.* "Cardiac Remote Ischemic Preconditioning in Coronary Stenting (CRISP Stent) Study: a prospective, randomized control trial," *Circulation***119**, 820 (2009)
128. Davies, W. R., *et al.* "Remote ischemic preconditioning improves outcome at 6 years after elective percutaneous coronary intervention: the CRISP stent trial long-term follow-up," *Circ Cardiovasc Interv***6**, 246 (2013)
129. White, S. K., *et al.* "Remote ischemic conditioning reduces myocardial infarct size and edema in patients with ST-segment elevation myocardial infarction," *JACC Cardiovasc Interv***8**, 178 (2015)
130. McLeod, S. L., Iansavichene, A., and Cheskes, S. "Remote Ischemic Preconditioning to Reduce Reperfusion Injury During Acute ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction: A Systematic Review and Meta-Analysis," *J Am Heart Assoc***6** (2017)
131. Gaspar, A., *et al.* "Randomized controlled trial of remote ischaemic conditioning in ST-elevation myocardial infarction as adjuvant to primary angioplasty (RIC-STEMI)," *Basic Res Cardiol***113**, 14 (2018)
132. Crimi, G., *et al.* "Remote ischemic post-conditioning of the lower limb during primary percutaneous coronary intervention safely reduces enzymatic infarct size in anterior myocardial infarction: a randomized controlled trial," *JACC Cardiovasc Interv***6**, 1055 (2013)

133. Lavi, S., *et al.* "Remote ischemic postconditioning during percutaneous coronary interventions: remote ischemic postconditioning-percutaneous coronary intervention randomized trial," *Circ Cardiovasc Interv***7**, 225 (2014)
134. Masereel, B., Pochet, L., and Laeckmann, D. "An overview of inhibitors of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger," *Eur J Med Chem***38**, 547 (2003)
135. Piper, H. M., *et al.* "The role of Na⁺/H⁺ exchange in ischemia-reperfusion," *Basic Res Cardiol***91**, 191 (1996)
136. Siegmund, B., Schlack, W., Ladilov, Y. V., Balsler, C., and Piper, H. M. "Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture," *Circulation***96**, 4372 (1997)
137. Inserte, J., *et al.* "Activation of cGMP/protein kinase G pathway in postconditioned myocardium depends on reduced oxidative stress and preserved endothelial nitric oxide synthase coupling," *J Am Heart Assoc***2**, e005975 (2013)
138. Siegmund, B., Klietz, T., Schwartz, P., and Piper, H. M. "Temporary contractile blockade prevents hypercontracture in anoxic-reoxygenated cardiomyocytes," *Am J Physiol***260**, H426-H435 (1991)
139. Hernando, V., *et al.* "Calpain translocation and activation as pharmacological targets during myocardial ischemia/reperfusion," *J Mol Cell Cardiol***49**, 271 (2010)
140. Pittas, K., *et al.* "The role of calcium handling mechanisms in reperfusion injury," *Curr Pharm Des* (2018)
141. Higginson, L., Tang, A., Knoll, G., and Calvin, J. "Effect of intracoronary diltiazem on infarct size and regional myocardial function in the ischemic reperfused canine heart," *J Am Coll Cardiol***18**, 868 (1991)
142. Garcia-Dorado, D., *et al.* "Diltiazem and progression of myocardial ischemic damage during coronary artery occlusion and reperfusion in porcine hearts," *J Am Coll Cardiol***10**, 906 (1987)
143. Mirica, S. N., *et al.* "Magnesium orotate elicits acute cardioprotection at reperfusion in isolated and in vivo rat hearts," *Can J Physiol Pharmacol***91**, 108 (2013)
144. Imura, H., Lin, H., Griffiths, E. J., and Suleiman, M. S. "Controlled hyperkalemic reperfusion with magnesium rescues ischemic juvenile hearts by reducing calcium loading," *J Thorac Cardiovasc Surg***141**, 1529 (2011)
145. Herzog, W. R., *et al.* "Timing of magnesium therapy affects experimental infarct size," *Circulation***92**, 2622 (1995)
146. Christensen, C. W., Rieder, M. A., Silverstein, E. L., and Gencheff, N. E. "Magnesium sulfate reduces myocardial infarct size when administered before but not after coronary reperfusion in a canine model," *Circulation***92**, 2617 (1995)
147. Quan, W., *et al.* "Antioxidant properties of magnesium lithospermate B contribute to the cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo and in vitro," *J Tradit Chin Med***33**, 85 (2013)
148. Maulik, M., Maulik, S. K., and Kumari, R. "Importance of timing of magnesium administration: a study on the isolated ischemic-reperfused rat heart," *Magnes Res***12**, 37 (1999)

149. Sheiban, I., Tonni, S., Chizzoni, A., Marini, A., and Trevi, G. "Recovery of left ventricular function following early reperfusion in acute myocardial infarction: a potential role for the calcium antagonist nisoldipine," *Cardiovasc Drugs Ther***11**, 5 (1997)
150. Pizzetti, G., *et al.* "Beneficial effects of diltiazem during myocardial reperfusion: a randomized trial in acute myocardial infarction," *Ital Heart J***2**, 757 (2001)
151. Theroux, P., *et al.* "Intravenous diltiazem in acute myocardial infarction. Diltiazem as adjunctive therapy to activase (DATA) trial," *J Am Coll Cardiol***32**, 620 (1998)
152. Woods, K. L., Fletcher, S., Roffe, C., and Haider, Y. "Intravenous magnesium sulphate in suspected acute myocardial infarction: results of the second Leicester Intravenous Magnesium Intervention Trial (LIMIT-2)," *Lancet* , 1553 (1992)
153. ISIS-4 Collaborative Group "ISIS-4: a randomised factorial trial assessing early oral captopril, oral mononitrate, and intravenous magnesium sulphate in 58,050 patients with suspected acute myocardial infarction. ISIS-4 (Fourth International Study of Infarct Survival) Collaborative Group," *Lancet***345**, 669 (1995)
154. Magnesium in Coronaries (MAGIC) Trial Investigators. "Early administration of intravenous magnesium to high-risk patients with acute myocardial infarction in the Magnesium in Coronaries (MAGIC) Trial: a randomised controlled trial," *Lancet***360**, 1189 (2002)
155. Grober, U., Schmidt, J., and Kisters, K. "Magnesium in Prevention and Therapy," *Nutrients***7**, 8199 (2015)
156. Madonna, R. and De Caterina, R. "Sodium-hydrogen exchangers (NHE) in human cardiovascular diseases: interfering strategies and their therapeutic applications," *Vascul Pharmacol***59**, 127 (2013)
157. Garcia-Dorado, D., *et al.* "Prevention of ischemic rigor contracture during coronary occlusion by inhibition of Na(+)-H+ exchange," *Cardiovasc Res***35**, 80 (1997)
158. Klein, H. H., Pich, S., Bohle, R. M., Lindert-Heimberg, S., and Nebendahl, K. "Na(+)/H(+) exchange inhibitor cariporide attenuates cell injury predominantly during ischemia and not at onset of reperfusion in porcine hearts with low residual blood flow," *Circulation***102**, 1977 (2000)
159. Ruiz-Meana, M., *et al.* "Cariporide preserves mitochondrial proton gradient and delays ATP depletion in cardiomyocytes during ischemic conditions," *Am J Physiol Heart Circ Physiol***285**, H999 (2003)
160. Rupprecht, H. J., *et al.* "Cardioprotective effects of the Na(+)/H(+) exchange inhibitor cariporide in patients with acute anterior myocardial infarction undergoing direct PTCA," *Circulation***101**, 2902 (2000)
161. Theroux, P., *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***102**, 3032 (2000)
162. Mentzer, R. M., Jr., *et al.* "Sodium-hydrogen exchange inhibition by cariporide to reduce the risk of ischemic cardiac events in patients undergoing coronary artery bypass grafting: results of the EXPEDITION study," *Ann Thorac Surg***85**, 1261 (2008)
163. Zeymer, U., *et al.* "The Na(+)/H(+) 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***38**, 1644 (2001)
164. Boyce, S. W., *et al.* "Impact of sodium-hydrogen exchange inhibition by cariporide on death or myocardial infarction in high-risk CABG surgery patients: results of the CABG surgery cohort of the GUARDIAN study," *J Thorac Cardiovasc Surg***126**, 420 (2003)
165. Ren, Y., Deng, L., Cai, Y., Lv, Y., and Jia, D. "The protective effect of Na⁺/Ca²⁺ exchange blocker kb-r7943 on myocardial ischemia-reperfusion injury in hypercholesterolemic rat," *Cell Biochem Biophys***70**, 1017 (2014)
166. Elias, C. L., *et al.* "Inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchange by KB-R7943: transport mode selectivity and antiarrhythmic consequences," *Am J Physiol Heart Circ Physiol***281**, H1334-H1345 (2001)
167. Schafer, C., *et al.* "Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury," *Cardiovasc Res***51**, 241 (2001)
168. Insete, J., *et al.* "Effect of inhibition of Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death," *Cardiovasc Res***55**, 739 (2002)
169. Magee, W. P., *et al.* "Differing cardioprotective efficacy of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibitors SEA0400 and KB-R7943," *Am J Physiol Heart Circ Physiol***284**, H903-H910 (2003)
170. Sventzouri, S., *et al.* "Pharmacologic inhibition of the mitochondrial Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchanger protects against ventricular arrhythmias in a porcine model of ischemia-reperfusion," *Hellenic J Cardiol***59**, 217 (2018)
171. Bar, F. W., *et al.* "Results of the first clinical study of adjunctive Caldaret (MCC-135) in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention for ST-Elevation Myocardial Infarction: the randomized multicentre CASTEMI study," *Eur Heart J***27**, 2516 (2006)
172. Jang, I. K., *et al.* "A randomized, double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of intravenous MCC-135 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention in patients with acute myocardial infarction: Evaluation of MCC-135 for left ventricular salvage in acute myocardial infarction (EVOLVE)," *Am Heart J***155**, 113 (2008)
173. Borel, J. F. "History of the discovery of cyclosporin and of its early pharmacological development," *Wien Klin Wochenschr***114**, 433 (2002)
174. Liu, J., *et al.* "Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes," *Cell***66**, 807 (1991)
175. Halestrap, A. P. and Pasdois, P. "The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease," *Biochim Biophys Acta***1787**, 1402 (2009)
176. Nazareth, W., Yafei, N., and Crompton, M. "Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin A," *J Mol Cell Cardiol***23**, 1351 (1991)
177. Arteaga, D., *et al.* "Impairment by cyclosporin A of reperfusion-induced arrhythmias," *Life Sci***51**, 1127 (1992)
178. Griffiths, E. J. and Halestrap, A. P. "Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion," *Biochem J***307 (Pt 1)**, 93 (1995)
179. Hausenloy, D. J., Maddock, H. L., Baxter, G. F., and Yellon, D. M. "Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning?," *Cardiovasc Res***55**, 534 (2002)

180. Argaud, L., *et al.* "Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury," *J Mol Cell Cardiol***38**, 367 (2005)
181. Lim, S. Y., Davidson, S. M., Hausenloy, D. J., and Yellon, D. M. "Preconditioning and postconditioning: the essential role of the mitochondrial permeability transition pore," *Cardiovasc Res***75**, 530 (2007)
182. Skyschally, A., Schulz, R., and Heusch, G. "Cyclosporine A at reperfusion reduces infarct size in pigs," *Cardiovasc Drugs Ther***24**, 85 (2010)
183. Shanmuganathan, S., Hausenloy, D. J., Duchen, M. R., and Yellon, D. M. "Mitochondrial permeability transition pore as a target for cardioprotection in the human heart," *Am J Physiol Heart Circ Physiol***289**, H237-H242 (2005)
184. Schneider, A., *et al.* "Protection of myocardium by cyclosporin A and insulin: in vitro simulated ischemia study in human myocardium," *Ann Thorac Surg***76**, 1240 (2003)
185. Schaller, S., *et al.* "TRO40303, a new cardioprotective compound, inhibits mitochondrial permeability transition," *J Pharmacol Exp Ther***333**, 696 (2010)
186. Hansson, M. J., *et al.* "Differences in the profile of protection afforded by TRO40303 and mild hypothermia in models of cardiac ischemia/reperfusion injury," *Eur J Pharmacol***760**, 7 (2015)
187. Piot, C., *et al.* "Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction," *N Engl J Med***359**, 473 (2008)
188. Mewton, N., *et al.* "Effect of cyclosporine on left ventricular remodeling after reperfused myocardial infarction," *J Am Coll Cardiol***55**, 1200 (2010)
189. Ottani, F., *et al.* "Cyclosporine A in Reperfused Myocardial Infarction: The Multicenter, Controlled, Open-Label CYCLE Trial," *J Am Coll Cardiol***67**, 365 (2016)
190. Cung, T. T., *et al.* "Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction," *N Engl J Med***373**, 1021 (2015)
191. Atar, D., *et al.* "Effect of intravenous TRO40303 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute ST-elevation myocardial infarction: MITOCARE study results," *Eur Heart J***36**, 112 (2015)
192. Sanchez, H., *et al.* "Effect of cyclosporin A and its vehicle on cardiac and skeletal muscle mitochondria: relationship to efficacy of the respiratory chain," *Br J Pharmacol***133**, 781 (2001)
193. Heusch, G. "CIRCUS: a kiss of death for cardioprotection?," *Cardiovasc Res***108**, 215 (2015)
194. Park, S. S., Zhao, H., Jang, Y., Mueller, R. A., and Xu, Z. "N⁶-(3-iodobenzyl)-adenosine-5'-N-methylcarboxamide confers cardioprotection at reperfusion by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening via glycogen synthase kinase 3 beta," *J Pharmacol Exp Ther***318**, 124 (2006)
195. Kis, A., Baxter, G. F., and Yellon, D. M. "Limitation of myocardial reperfusion injury by AMP579, an adenosine A₁/A_{2A} receptor agonist: role of A_{2A} receptor and Erk1/2," *Cardiovasc Drugs Ther***17**, 415 (2003)
196. Bell, R. M. and Yellon, D. M. "Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of PI3K, Akt and eNOS," *J Mol Cell Cardiol***35**, 185 (2003)

197. Gross, E. R., Hsu, A. K., and Gross, G. J. "Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts," *Circ Res***94**, 960 (2004)
198. Jonassen, A. K., *et al.* "Insulin administered at reoxygenation exerts a cardioprotective effect in myocytes by a possible anti-apoptotic mechanism," *J Mol Cell Cardiol***32**, 757 (2000)
199. Jonassen, A. K., Sack, M. N., Mjos, O. D., and Yellon, D. M. "Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling," *Circ Res***89**, 1191 (2001)
200. Gao, F., *et al.* "Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation," *Circulation***105**, 1497 (2002)
201. Mahaffey, K. W., *et al.* "Adenosine as an adjunct to thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: results of a multicenter, randomized, placebo-controlled trial: the Acute Myocardial Infarction Study of Adenosine (AMISTAD) trial," *J Am Coll Cardiol***34**, 1711 (1999)
202. Marzilli, M., Orsini, E., Marraccini, P., and Testa, R. "Beneficial effects of intracoronary adenosine as an adjunct to primary angioplasty in acute myocardial infarction," *Circulation***101**, 2154 (2000)
203. Kopecky, S. L., *et al.* "A randomized, double-blinded, placebo-controlled, dose-ranging study measuring the effect of an adenosine agonist on infarct size reduction in patients undergoing primary percutaneous transluminal coronary angioplasty: the ADMIRE (AmP579 Delivery for Myocardial Infarction REduction) study," *Am Heart J***146**, 146 (2003)
204. Quintana, M., *et al.* "Left ventricular function and cardiovascular events following adjuvant therapy with adenosine in acute myocardial infarction treated with thrombolysis, results of the ATTenuation by Adenosine of Cardiac Complications (ATTACC) study," *Eur J Clin Pharmacol***59**, 1 (2003)
205. Ross, A. M., Gibbons, R. J., Stone, G. W., Kloner, R. A., and Alexander, R. W. "A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of adenosine as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction (AMISTAD-II)," *J Am Coll Cardiol***45**, 1775 (2005)
206. Garcia-Dorado, D., *et al.* "Intracoronary injection of adenosine before reperfusion in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: a randomized controlled clinical trial," *Int J Cardiol***177**, 935 (2014)
207. Di Napoli, P., *et al.* "Simvastatin reduces reperfusion injury by modulating nitric oxide synthase expression: an ex vivo study in isolated working rat hearts," *Cardiovasc Res***51**, 283 (2001)
208. Bell, R. M. and Yellon, D. M. "Atorvastatin, administered at the onset of reperfusion, and independent of lipid lowering, protects the myocardium by up-regulating a pro-survival pathway," *J Am Coll Cardiol***41**, 508 (2003)
209. Pasceri, V., *et al.* "Randomized trial of atorvastatin for reduction of myocardial damage during coronary intervention: results from the ARMYDA (Atorvastatin for Reduction of MYocardial Damage during Angioplasty) study," *Circulation***110**, 674 (2004)
210. Briguori, C., *et al.* "Novel approaches for preventing or limiting events (Naples) II trial: impact of a single high loading dose of atorvastatin on periprocedural myocardial infarction," *J Am Coll Cardiol***54**, 2157 (2009)

211. Veselka, J., *et al.* "Effect of two-day atorvastatin pretreatment on the incidence of periprocedural myocardial infarction following elective percutaneous coronary intervention: a single-center, prospective, and randomized study," *Am J Cardio***104**, 630 (2009)
212. Kloner, R. A. "Current state of clinical translation of cardioprotective agents for acute myocardial infarction," *Circ Res***113**, 451 (2013)
213. Insete, J. and Garcia-Dorado, D. "The cGMP/PKG pathway as a common mediator of cardioprotection: translatability and mechanism," *Br J Pharmacol***172**, 1996 (2015)
214. Kuhn, M. "Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A," *Circ Res***93**, 700 (2003)
215. Padilla, F., *et al.* "L-Arginine administration prevents reperfusion-induced cardiomyocyte hypercontracture and reduces infarct size in the pig," *Cardiovasc Res***46**, 412 (2000)
216. Duranski, M. R., *et al.* "Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver," *J Clin Invest***115**, 1232 (2005)
217. Lundberg, J. O., Weitzberg, E., and Gladwin, M. T. "The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics," *Nat Rev Drug Discov***7**, 156 (2008)
218. Ren, B., *et al.* "Brain natriuretic peptide limits myocardial infarct size dependent of nitric oxide synthase in rats," *Clin Chim Acta***377**, 83 (2007)
219. Padilla, F., *et al.* "Intravenous administration of the natriuretic peptide urodilatin at low doses during coronary reperfusion limits infarct size in anesthetized pigs," *Cardiovasc Res***51**, 592 (2001)
220. Hayashi, M., *et al.* "Intravenous atrial natriuretic peptide prevents left ventricular remodeling in patients with first anterior acute myocardial infarction," *J Am Coll Cardio***37**, 1820 (2001)
221. Kuga, H., *et al.* "Administration of atrial natriuretic peptide attenuates reperfusion phenomena and preserves left ventricular regional wall motion after direct coronary angioplasty for acute myocardial infarction," *Circ J***67**, 443 (2003)
222. Kitakaze, M., *et al.* "Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): two randomised trials," *Lancet***370**, 1483 (2007)
223. Grossman, A. N., *et al.* "Glucose-insulin-potassium revived: current status in acute coronary syndromes and the energy-depleted heart," *Circulation***127**, 1040 (2013)
224. Kones, R. J. and Phillips, J. H. "Glucose-insulin-potassium (GIK) therapy for ischemic heart disease," *Crit Care Med***3**, 143 (1975)
225. SODI-PALLARES, D., *et al.* "Effects of an intravenous infusion of a potassium-glucose-insulin solution on the electrocardiographic signs of myocardial infarction. A preliminary clinical report," *Am J Cardio***9**, 166 (1962)
226. CALVA, E., MUJICA, A., BISTENI, A., and SODI, P. D. "OXIDATIVE PHOSPHORYLATION IN CARDIAC INFARCT. EFFECT OF GLUCOSE-KCL-INSULIN SOLUTION," *Am J Physiol***209**, 371 (1965)
227. SODI-PALLARES, D., BISTENI, A., MEDRANO, G. A., TESTELLI, M. R., and DE MICHELI, A. "The polarizing treatment of acute myocardial infarction. Possibility of its use in other cardiovascular conditions," *Dis Chest***43**, 424 (1963)

228. Zierler, K., Rogus, E. M., Scherer, R. W., and Wu, F. S. "Insulin action on membrane potential and glucose uptake: effects of high potassium," *Am J Physiol***249**, E17-E25 (1985)
229. Maroko, P. R., *et al.* "Effect of glucose-insulin-potassium infusion on myocardial infarction following experimental coronary artery occlusion," *Circulation***45**, 1160 (1972)
230. Apstein, C. S., Gravino, F. N., and Haudenschild, C. C. "Determinants of a protective effect of glucose and insulin on the ischemic myocardium. Effects on contractile function, diastolic compliance, metabolism, and ultrastructure during ischemia and reperfusion," *Circ Res***52**, 515 (1983)
231. Jonassen, A. K., Aasum, E., Riemersma, R. A., Mjos, O. D., and Larsen, T. S. "Glucose-insulin-potassium reduces infarct size when administered during reperfusion," *Cardiovasc Drugs Ther***14**, 615 (2000)
232. Angelos, M. G., Murray, H. N., Gorsline, R. T., and Klawitter, P. F. "Glucose, insulin and potassium (GIK) during reperfusion mediates improved myocardial bioenergetics," *Resuscitation***55**, 329 (2002)
233. Cave, A. C., *et al.* "ATP synthesis during low-flow ischemia: influence of increased glycolytic substrate," *Circulation***101**, 2090 (2000)
234. Bellows, S. D. and Kloner, R. A. "Glucose-Insulin-Potassium Does Not Reduce Myocardial Infarct Size in an Ischemic/Reperfusion Rabbit Model," *J Thromb Thrombolysis***5**, 25 (1998)
235. Das, U. N. "Insulin and inflammation: further evidence and discussion," *Nutrition***18**, 526 (2002)
236. Abdallah, Y., *et al.* "Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture by a survival pathway targeting SR Ca²⁺ storage," *Cardiovasc Res***70**, 346 (2006)
237. Zhang, H. X., *et al.* "Physiologically tolerable insulin reduces myocardial injury and improves cardiac functional recovery in myocardial ischemic/reperfused dogs," *J Cardiovasc Pharmacol***48**, 306 (2006)
238. Wong, V. W., Mardini, M., Cheung, N. W., and Mihailidou, A. S. "High-dose insulin in experimental myocardial infarction in rabbits: protection against effects of hyperglycaemia," *J Diabetes Complications***25**, 122 (2011)
239. Bertrand, L., Horman, S., Beauloye, C., and Vanoverschelde, J. L. "Insulin signalling in the heart," *Cardiovasc Res***79**, 238 (2008)
240. Diaz, R., *et al.* "Metabolic modulation of acute myocardial infarction. The ECLA (Estudios Cardiologicos Latinoamerica) Collaborative Group," *Circulation***98**, 2227 (1998)
241. Ceremuzynski, L., *et al.* "Low-dose glucose-insulin-potassium is ineffective in acute myocardial infarction: results of a randomized multicenter Pol-GIK trial," *Cardiovasc Drugs Ther***13**, 191 (1999)
242. van, d. H., I, *et al.* "Glucose-insulin-potassium infusion inpatients treated with primary angioplasty for acute myocardial infarction: the glucose-insulin-potassium study: a randomized trial," *J Am Coll Cardiol***42**, 784 (2003)
243. Pache, J., *et al.* "A randomized evaluation of the effects of glucose-insulin-potassium infusion on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction treated with reperfusion therapy," *Am Heart J***148**, e3 (2004)

244. Timmer, J. R., *et al.* "Glucose-insulin-potassium infusion in patients with acute myocardial infarction without signs of heart failure: the Glucose-Insulin-Potassium Study (GIPS)-II," *J Am Coll Cardiol***47**, 1730 (2006)
245. Mehta, S. R., *et al.* "Effect of glucose-insulin-potassium infusion on mortality in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction: the CREATE-ECLA randomized controlled trial," *JAMA***293**, 437 (2005)
246. Selker, H. P., *et al.* "Out-of-hospital administration of intravenous glucose-insulin-potassium in patients with suspected acute coronary syndromes: the IMMEDIATE randomized controlled trial," *JAMA***307**, 1925 (2012)
247. Selker, H. P., *et al.* "One-year outcomes of out-of-hospital administration of intravenous glucose, insulin, and potassium (GIK) in patients with suspected acute coronary syndromes (from the IMMEDIATE [Immediate Myocardial Metabolic Enhancement During Initial Assessment and Treatment in Emergency Care] Trial)," *Am J Cardiol***113**, 1599 (2014)
248. Ying, Y., Zhu, H., Liang, Z., Ma, X., and Li, S. "GLP1 protects cardiomyocytes from palmitate-induced apoptosis via Akt/GSK3b/b-catenin pathway," *J Mol Endocrinol***55**, 245 (2015)
249. Fields, A. V., Patterson, B., Karnik, A. A., and Shannon, R. P. "Glucagon-like peptide-1 and myocardial protection: more than glycemic control," *Clin Cardiol***32**, 236 (2009)
250. Tasyurek, H. M., Altunbas, H. A., Balci, M. K., and Sanlioglu, S. "Incretins: their physiology and application in the treatment of diabetes mellitus," *Diabetes Metab Res Rev***30**, 354 (2014)
251. Baggio, L. L., *et al.* "GLP-1 Receptor Expression Within the Human Heart," *Endocrinology***159**, 1570 (2018)
252. Seufert, J. and Gallwitz, B. "The extra-pancreatic effects of GLP-1 receptor agonists: a focus on the cardiovascular, gastrointestinal and central nervous systems," *Diabetes Obes Metab***16**, 673 (2014)
253. Poudyal, H. "Mechanisms for the cardiovascular effects of glucagon-like peptide-1," *Acta Physiol (Oxf)***216**, 277 (2016)
254. Zhao, T., *et al.* "Direct effects of glucagon-like peptide-1 on myocardial contractility and glucose uptake in normal and postischemic isolated rat hearts," *J Pharmacol Exp Ther***317**, 1106 (2006)
255. Aravindhan, K., *et al.* "Cardioprotection Resulting from Glucagon-Like Peptide-1 Administration Involves Shifting Metabolic Substrate Utilization to Increase Energy Efficiency in the Rat Heart," *PLoS One***10**, e0130894 (2015)
256. Bose, A. K., Mocanu, M. M., Carr, R. D., Brand, C. L., and Yellon, D. M. "Glucagon-like peptide 1 can directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury," *Diabetes***54**, 146 (2005)
257. Nikolaidis, L. A., *et al.* "Glucagon-like peptide-1 limits myocardial stunning following brief coronary occlusion and reperfusion in conscious canines," *J Pharmacol Exp Ther***312**, 303 (2005)
258. Bao, W., *et al.* "Albiglutide, a long lasting glucagon-like peptide-1 analog, protects the rat heart against ischemia/reperfusion injury: evidence for improving cardiac metabolic efficiency," *PLoS One***6**, e23570 (2011)
259. Timmers, L., *et al.* "Exenatide reduces infarct size and improves cardiac function in a porcine model of ischemia and reperfusion injury," *J Am Coll Cardiol***53**, 501 (2009)

260. DeNicola, M., *et al.* "Stimulation of glucagon-like peptide-1 receptor through exendin-4 preserves myocardial performance and prevents cardiac remodeling in infarcted myocardium," *Am J Physiol Endocrinol Metab***307**, E630-E643 (2014)
261. Huang, D. D., Huang, H. F., Yang, Q., and Chen, X. Q. "Liraglutide improves myocardial fibrosis after myocardial infarction through inhibition of CTGF by activating cAMP in mice," *Eur Rev Med Pharmacol Sci***22**, 4648 (2018)
262. Lonborg, J., *et al.* "Exenatide reduces final infarct size in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction and short-duration of ischemia," *Circ Cardiovasc Interv***5**, 288 (2012)
263. Lonborg, J., *et al.* "Impact of system delay on infarct size, myocardial salvage index, and left ventricular function in patients with ST-segment elevation myocardial infarction," *Am Heart J***164**, 538 (2012)
264. Lonborg, J., *et al.* "Impact of acute hyperglycemia on myocardial infarct size, area at risk, and salvage in patients with STEMI and the association with exenatide treatment: results from a randomized study," *Diabetes***63**, 2474 (2014)
265. Woo, J. S., *et al.* "Cardioprotective effects of exenatide in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: results of exenatide myocardial protection in revascularization study," *Arterioscler Thromb Vasc Biol***33**, 2252 (2013)
266. Roos, S. T., *et al.* "No benefit of additional treatment with exenatide in patients with an acute myocardial infarction," *Int J Cardiol***220**, 809 (2016)
267. Ibanez, B., *et al.* "Early metoprolol administration before coronary reperfusion results in increased myocardial salvage: analysis of ischemic myocardium at risk using cardiac magnetic resonance," *Circulation***115**, 2909 (2007)
268. Ibanez, B., Heusch, G., Garcia-Dorado, D., Fuster, V., and Yellon, D. "CHAPTER 38: MOLECULAR AND CELLULAR MECHANISMS OF MYOCARDIAL ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY," in 14 ed.(McGraw-Hill Education , 2017).
269. Hausenloy, D. J., *et al.* "Targeting reperfusion injury in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: trials and tribulations," *Eur Heart J***38**, 935 (2017)
270. Garcia-Prieto, J., *et al.* "Neutrophil stunning by metoprolol reduces infarct size," *Nat Commun***8**, 14780 (2017)
271. Ibanez, B., *et al.* "Effect of early metoprolol on infarct size in ST-segment-elevation myocardial infarction patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: the Effect of Metoprolol in Cardioprotection During an Acute Myocardial Infarction (METOCARD-CNIC) trial," *Circulation***128**, 1495 (2013)
272. Pizarro, G., *et al.* "Long-term benefit of early pre-reperfusion metoprolol administration in patients with acute myocardial infarction: results from the METOCARD-CNIC trial (Effect of Metoprolol in Cardioprotection During an Acute Myocardial Infarction)," *J Am Coll Cardiol***63**, 2356 (2014)
273. Roolvink, V., *et al.* "Early Intravenous Beta-Blockers in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction Before Primary Percutaneous Coronary Intervention," *J Am Coll Cardiol***67**, 2705 (2016)
274. Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., and Kalayci, O. "Oxidative stress and antioxidant defense," *World Allergy Organ J***5**, 9 (2012)

275. Nishida, N., *et al.* "Reactive oxygen species induce epigenetic instability through the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in human hepatocarcinogenesis," *Dig Dis***31**, 459 (2013)
276. Yasui, M., *et al.* "Tracing the fates of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome," *DNA Repair (Amst)***15**, 11 (2014)
277. Siu, G. M. and Draper, H. H. "Metabolism of malonaldehyde in vivo and in vitro," *Lipids***17**, 349 (1982)
278. Dhalla, N. S., Temsah, R. M., and Netticadan, T. "Role of oxidative stress in cardiovascular diseases," *J Hypertens***18**, 655 (2000)
279. Kelly, F. J. and Mudway, I. S. "Protein oxidation at the air-lung interface," *Amino Acids***25**, 375 (2003)
280. Halliwell, B. "Biochemistry of oxidative stress," *Biochem Soc Trans***35**, 1147 (2007)
281. Berry, C. E. and Hare, J. M. "Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications," *J Physiol***555**, 589 (2004)
282. Granger, D. N. and Kvietys, P. R. "Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept," *Redox Biol***6**, 524 (2015)
283. Kehrer, J. P. "The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity," *Toxicology***149**, 43 (2000)
284. Houston, M., Chumley, P., Radi, R., Rubbo, H., and Freeman, B. A. "Xanthine oxidase reaction with nitric oxide and peroxynitrite," *Arch Biochem Biophys***355**, 1 (1998)
285. Matsuki, T., Shirato, C., Cohen, M. V., and Downey, J. M. "Oxypurinol limits myocardial infarct size in closed chest dogs without pretreatment," *Can J Cardiol***6**, 123 (1990)
286. Tan, Z., *et al.* "Preservation of cardiac contractility after long-term therapy with oxypurinol in post-ischemic heart failure in mice," *Eur J Pharmacol***621**, 71 (2009)
287. Werns, S. W., *et al.* "Xanthine oxidase inhibition does not limit canine infarct size," *Circulation***83**, 995 (1991)
288. Zhao, L., *et al.* "Chronic xanthine oxidase inhibition following myocardial infarction in rabbits: effects of early versus delayed treatment," *Life Sci***82**, 495 (2008)
289. Bredemeier, M., *et al.* "Xanthine oxidase inhibitors for prevention of cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials," *BMC Cardiovasc Disord***18**, 24 (2018)
290. Stamp, L. K., *et al.* "Myeloperoxidase and oxidation of uric acid in gout: implications for the clinical consequences of hyperuricaemia," *Rheumatology (Oxford)***53**, 1958 (2014)
291. Brandes, R. P., Weissmann, N., and Schroder, K. "NADPH oxidases in cardiovascular disease," *Free Radic Biol Med***49**, 687 (2010)
292. Braunersreuther, V., *et al.* "Role of NADPH oxidase isoforms NOX1, NOX2 and NOX4 in myocardial ischemia/reperfusion injury," *J Mol Cell Cardiol***64**, 99 (2013)
293. Doerries, C., *et al.* "Critical role of the NAD(P)H oxidase subunit p47phox for left ventricular remodeling/dysfunction and survival after myocardial infarction," *Circ Res***100**, 894 (2007)

294. Kleikers, P. W., *et al.* "NADPH oxidases as a source of oxidative stress and molecular target in ischemia/reperfusion injury," *J Mol Med (Berl)***90**, 1391 (2012)
295. Dusting, G. J., Selemidis, S., and Jiang, F. "Mechanisms for suppressing NADPH oxidase in the vascular wall," *Mem Inst Oswaldo Cruz***100 Suppl 1**, 97 (2005)
296. Meischl, C., *et al.* "Ischemia induces nuclear NOX2 expression in cardiomyocytes and subsequently activates apoptosis," *Apoptosis***11**, 913 (2006)
297. Borchi, E., *et al.* "Role of NADPH oxidase in H9c2 cardiac muscle cells exposed to simulated ischaemia-reperfusion," *J Cell Mol Med***13**, 2724 (2009)
298. Wind, S., *et al.* "Comparative pharmacology of chemically distinct NADPH oxidase inhibitors," *Br J Pharmacol***161**, 885 (2010)
299. Heumuller, S., *et al.* "Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant," *Hypertension***51**, 211 (2008)
300. Lambeth, J. D., Krause, K. H., and Clark, R. A. "NOX enzymes as novel targets for drug development," *Semin Immunopathol***30**, 339 (2008)
301. Looi, Y. H., *et al.* "Involvement of Nox2 NADPH oxidase in adverse cardiac remodeling after myocardial infarction," *Hypertension***51**, 319 (2008)
302. Forstermann, U. and Sessa, W. C. "Nitric oxide synthases: regulation and function," *Eur Heart J***33**, 829 (2012)
303. Wu, M. Y., *et al.* "Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury," *Cell Physiol Biochem***46**, 1650 (2018)
304. Wajima, T., Shimizu, S., Hiroi, T., Ishii, M., and Kiuchi, Y. "Reduction of myocardial infarct size by tetrahydrobiopterin: possible involvement of mitochondrial KATP channels activation through nitric oxide production," *J Cardiovasc Pharmacol***47**, 243 (2006)
305. Tratsiakovich, Y., *et al.* "Myocardial protection by co-administration of L-arginine and tetrahydrobiopterin during ischemia and reperfusion," *Int J Cardiol***169**, 83 (2013)
306. Masano, T., *et al.* "Beneficial effects of exogenous tetrahydrobiopterin on left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats: the possible role of oxidative stress caused by uncoupled endothelial nitric oxide synthase," *Circ J***72**, 1512 (2008)
307. Darra, E., *et al.* "Dual modulation of nitric oxide production in the heart during ischaemia/reperfusion injury and inflammation," *Thromb Haemost***104**, 200 (2010)
308. Sullivan, J. C. and Pollock, J. S. "Coupled and uncoupled NOS: separate but equal? Uncoupled NOS in endothelial cells is a critical pathway for intracellular signaling," *Circ Res***98**, 717 (2006)
309. Kitamoto, S., *et al.* "Increased activity of nuclear factor-kappaB participates in cardiovascular remodeling induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis in rats," *Circulation***102**, 806 (2000)
310. Chen, Y. R. and Zweier, J. L. "Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation," *Circ Res***114**, 524 (2014)
311. Hirst, J., King, M. S., and Pryde, K. R. "The production of reactive oxygen species by complex I," *Biochem Soc Trans***36**, 976 (2008)

312. Quinlan, C. L., *et al.* "Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions," *J Biol Chem***287**, 27255 (2012)
313. Siebels, I. and Drose, S. "Q-site inhibitor induced ROS production of mitochondrial complex II is attenuated by TCA cycle dicarboxylates," *Biochim Biophys Acta***1827**, 1156 (2013)
314. CHANCE, B. "The interaction of energy and electron transfer reactions in mitochondria. V. The energy transfer pathway," *J Biol Chem***236**, 1569 (1961)
315. CHANCE, B. and HOLLUNGER, G. "The interaction of energy and electron transfer reactions in mitochondria. I. General properties and nature of the products of succinate-linked reduction of pyridine nucleotide," *J Biol Chem***236**, 1534 (1961)
316. Liu, Y., Fiskum, G., and Schubert, D. "Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain," *J Neurochem***80**, 780 (2002)
317. Bagheri, F., *et al.* "Reactive oxygen species-mediated cardiac-reperfusion injury: Mechanisms and therapies," *Life Sci***165**, 43 (2016)
318. Pchejetski, D., *et al.* "Oxidative stress-dependent sphingosine kinase-1 inhibition mediates monoamine oxidase A-associated cardiac cell apoptosis," *Circ Res***100**, 41 (2007)
319. Huang, H. M., Ou, H. C., Chen, H. L., Hou, R. C., and Jeng, K. C. "Protective effect of alpha-keto-beta-methyl-n-valeric acid on BV-2 microglia under hypoxia or oxidative stress," *Ann N Y Acad Sci***1042**, 272 (2005)
320. Starkov, A. A. "An update on the role of mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase in oxidative stress," *Mol Cell Neurosci***55**, 13 (2013)
321. Adam-Vizi, V. and Tretter, L. "The role of mitochondrial dehydrogenases in the generation of oxidative stress," *Neurochem Int***62**, 757 (2013)
322. Zinkevich, N. S. and Gutterman, D. D. "ROS-induced ROS release in vascular biology: redox-redox signaling," *Am J Physiol Heart Circ Physiol***301**, H647-H653 (2011)
323. Rhee, S. G., Bae, Y. S., Lee, S. R., and Kwon, J. "Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation," *Sci STKE***2000**, e1 (2000)
324. Gonzalez-Montero, J., Brito, R., Gajardo, A. I., and Rodrigo, R. "Myocardial reperfusion injury and oxidative stress: Therapeutic opportunities," *World J Cardiol***10**, 74 (2018)
325. Nimse, SB. and Pal, D. "Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms," **5**, 27986 (2015)
326. Garcarena, C. D., *et al.* "Myocardial reperfusion injury: reactive oxygen species vs. NHE-1 reactivation," *Cell Physiol Biochem***27**, 13 (2011)
327. Kris-Etherton, P. M., Lichtenstein, A. H., Howard, B. V., Steinberg, D., and Witztum, J. L. "Antioxidant vitamin supplements and cardiovascular disease," *Circulation***110**, 637 (2004)
328. Newaz, M. A., Nawal, N. N., Rohaizan, C. H., Muslim, N., and Gapor, A. "alpha-Tocopherol increased nitric oxide synthase activity in blood vessels of spontaneously hypertensive rats," *Am J Hypertens***12**, 839 (1999)
329. Taddei, S., Viridis, A., Ghiadoni, L., and Salvetti, A. "Endothelial dysfunction in hypertension: fact or fancy?," *J Cardiovasc Pharmacol***32 Suppl 3**, S41-S47 (1998)

330. Wu, F., Schuster, D. P., Tyml, K., and Wilson, J. X. "Ascorbate inhibits NADPH oxidase subunit p47phox expression in microvascular endothelial cells," *Free Radic Biol Med***42**, 124 (2007)
331. Ramos, C., *et al.* "Effects of a novel ascorbate-based protocol on infarct size and ventricle function in acute myocardial infarction patients undergoing percutaneous coronary angioplasty," *Arch Med Sci***13**, 558 (2017)
332. Basili, S., *et al.* "Intravenous ascorbic acid infusion improves myocardial perfusion grade during elective percutaneous coronary intervention: relationship with oxidative stress markers," *JACC Cardiovasc Interv***3**, 221 (2010)
333. Rushworth, G. F. and Megson, I. L. "Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits," *Pharmacol Ther***141**, 150 (2014)
334. Winterbourn, C. C. and Metodieva, D. "Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide," *Free Radic Biol Med***27**, 322 (1999)
335. Abe, M., Takiguchi, Y., Ichimaru, S., Tsuchiya, K., and Wada, K. "Comparison of the protective effect of N-acetylcysteine by different treatments on rat myocardial ischemia-reperfusion injury," *J Pharmacol Sci***106**, 571 (2008)
336. Thiele, H., *et al.* "Impact of high-dose N-acetylcysteine versus placebo on contrast-induced nephropathy and myocardial reperfusion injury in unselected patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. The LIPSIAC-N-ACC (Prospective, Single-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Leipzig Immediate Percutaneous Coronary Intervention Acute Myocardial Infarction N-ACC Trial)," *J Am Coll Cardiol***55**, 2201 (2010)
337. Pasupathy, S., *et al.* "Early Use of N-acetylcysteine With Nitrate Therapy in Patients Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention for ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction Reduces Myocardial Infarct Size (the NACIAM Trial [N-acetylcysteine in Acute Myocardial Infarction])," *Circulation***136**, 894 (2017)
338. Williams, R. E., Zweier, J. L., and Flaherty, J. T. "Treatment with deferoxamine during ischemia improves functional and metabolic recovery and reduces reperfusion-induced oxygen radical generation in rabbit hearts," *Circulation***83**, 1006 (1991)
339. Lesnefsky, E. J., Repine, J. E., and Horwitz, L. D. "Deferoxamine pretreatment reduces canine infarct size and oxidative injury," *J Pharmacol Exp Ther***253**, 1103 (1990)
340. Reddy, B. R., Kloner, R. A., and Przyklenk, K. "Early treatment with deferoxamine limits myocardial ischemic/reperfusion injury," *Free Radic Biol Med***7**, 45 (1989)
341. Paraskevaidis, I. A., *et al.* "Deferoxamine infusion during coronary artery bypass grafting ameliorates lipid peroxidation and protects the myocardium against reperfusion injury: immediate and long-term significance," *Eur Heart J***26**, 263 (2005)
342. Chan, W., *et al.* "Effect of iron chelation on myocardial infarct size and oxidative stress in ST-elevation-myocardial infarction," *Circ Cardiovasc Interv***5**, 270 (2012)
343. Karahaliou, A., *et al.* "Ventricular arrhythmias and antioxidative medication: experimental study," *Hellenic J Cardiol***49**, 320 (2008)
344. Sugamura, K. and Keaney, J. F., Jr. "Reactive oxygen species in cardiovascular disease," *Free Radic Biol Med***51**, 978 (2011)

345. Adluri, R. S., *et al.* "Cardioprotective efficacy of a novel antioxidant mix VitaePro against ex vivo myocardial ischemia-reperfusion injury," *Cell Biochem Biophys***67**, 281 (2013)
346. Reiter, R. J., *et al.* "Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers," *J Pineal Res***61**, 253 (2016)
347. Petrosillo, G., *et al.* "Melatonin protects against heart ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening," *Am J Physiol Heart Circ Physiol***297**, H1487-H1493 (2009)
348. Ambrosio, G., Weisfeldt, M. L., Jacobus, W. E., and Flaherty, J. T. "Evidence for a reversible oxygen radical-mediated component of reperfusion injury: reduction by recombinant human superoxide dismutase administered at the time of reflow," *Circulation***75**, 282 (1987)
349. Grill, H. P., Zweier, J. L., Kuppusamy, P., Weisfeldt, M. L., and Flaherty, J. T. "Direct measurement of myocardial free radical generation in an in vivo model: effects of postischemic reperfusion and treatment with human recombinant superoxide dismutase," *J Am Coll Cardiol***20**, 1604 (1992)
350. Ambrosio, G., Becker, L. C., Hutchins, G. M., Weisman, H. F., and Weisfeldt, M. L. "Reduction in experimental infarct size by recombinant human superoxide dismutase: insights into the pathophysiology of reperfusion injury," *Circulation***74**, 1424 (1986)
351. Flaherty, J. T., *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***89**, 1982 (1994)
352. Smith, R. A. and Murphy, M. P. "Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ," *Ann N Y Acad Sci***1201**, 96 (2010)
353. Adlam, V. J., *et al.* "Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury," *FASEB J***19**, 1088 (2005)
354. Dare, A. J., *et al.* "The mitochondria-targeted anti-oxidant MitoQ decreases ischemia-reperfusion injury in a murine syngeneic heart transplant model," *J Heart Lung Transplant***34**, 1471 (2015)
355. Szeto, H. H. "Mitochondria-targeted peptide antioxidants: novel neuroprotective agents," *AAPS J***8**, E521-E531 (2006)
356. Dai, D. F., *et al.* "Global proteomics and pathway analysis of pressure-overload-induced heart failure and its attenuation by mitochondrial-targeted peptides," *Circ Heart Fail***6**, 1067 (2013)
357. Cho, J., *et al.* "Potent mitochondria-targeted peptides reduce myocardial infarction in rats," *Coron Artery Dis***18**, 215 (2007)
358. Kloner, R. A., *et al.* "Reduction of ischemia/reperfusion injury with bendavia, a mitochondria-targeting cytoprotective Peptide," *J Am Heart Assoc***1**, e001644 (2012)
359. Chakrabarti, A. K., *et al.* "Rationale and design of the EMBRACE STEMI study: a phase 2a, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the safety, tolerability and efficacy of intravenous Bendavia on reperfusion injury in patients treated with standard therapy including primary percutaneous coronary intervention and stenting for ST-segment elevation myocardial infarction," *Am Heart J***165**, 509 (2013)

360. Turrens, J. F., Alexandre, A., and Lehninger, A. L. "Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria," *Arch Biochem Biophys***237**, 408 (1985)
361. Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L., and Lesnefsky, E. J. "Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III," *J Biol Chem***278**, 36027 (2003)
362. Chen, Q., Moghaddas, S., Hoppel, C. L., and Lesnefsky, E. J. "Reversible blockade of electron transport during ischemia protects mitochondria and decreases myocardial injury following reperfusion," *J Pharmacol Exp Ther***319**, 1405 (2006)
363. Becker, L. B., vanden Hoek, T. L., Shao, Z. H., Li, C. Q., and Schumacker, P. T. "Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion," *Am J Physiol***277**, H2240-H2246 (1999)
364. Lesnefsky, E. J., *et al.* "Blockade of electron transport during ischemia protects cardiac mitochondria," *J Biol Chem***279**, 47961 (2004)
365. Chen, Q., Hoppel, C. L., and Lesnefsky, E. J. "Blockade of electron transport before cardiac ischemia with the reversible inhibitor amobarbital protects rat heart mitochondria," *J Pharmacol Exp Ther***316**, 200 (2006)
366. Ambrosio, G., *et al.* "Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow," *J Biol Chem***268**, 18532 (1993)
367. Park, J. W., Chun, Y. S., Kim, Y. H., Kim, C. H., and Kim, M. S. "Ischemic preconditioning reduces Op6 generation and prevents respiratory impairment in the mitochondria of post-ischemic reperfused heart of rat," *Life Sci***60**, 2207 (1997)
368. Stewart, S., Lesnefsky, E. J., and Chen, Q. "Reversible blockade of electron transport with amobarbital at the onset of reperfusion attenuates cardiac injury," *Transl Res***153**, 224 (2009)
369. Chouchani, E. T., *et al.* "Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I," *Nat Med***19**, 753 (2013)
370. Methner, C., *et al.* "Mitochondria selective S-nitrosation by mitochondria-targeted S-nitrosothiol protects against post-infarct heart failure in mouse hearts," *Eur J Heart Fail***16**, 712 (2014)
371. Chouchani, E. T., *et al.* "A Unifying Mechanism for Mitochondrial Superoxide Production during Ischemia-Reperfusion Injury," *Cell Metab***23**, 254 (2016)
372. Adam-Vizi, V. and Chinopoulos, C. "Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species," *Trends Pharmacol Sci***27**, 639 (2006)
373. Bleier, L. and Drose, S. "Superoxide generation by complex III: from mechanistic rationales to functional consequences," *Biochim Biophys Acta***1827**, 1320 (2013)
374. Drose, S., Hanley, P. J., and Brandt, U. "Ambivalent effects of diazoxide on mitochondrial ROS production at respiratory chain complexes I and III," *Biochim Biophys Acta***1790**, 558 (2009)
375. Drose, S., Bleier, L., and Brandt, U. "A common mechanism links differently acting complex II inhibitors to cardioprotection: modulation of mitochondrial reactive oxygen species production," *Mol Pharmacol***79**, 814 (2011)

376. Wojtovich, A. P. and Brookes, P. S. "The complex II inhibitor atpenin A5 protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via activation of mitochondrial KATP channels," *Basic Res Cardio***104**, 121 (2009)
377. Anastacio, M. M., *et al.* "Cardioprotective mechanism of diazoxide involves the inhibition of succinate dehydrogenase," *Ann Thorac Surg***95**, 2042 (2013)
378. Chouchani, E. T., *et al.* "Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS," *Nature***515**, 431 (2014)
379. Valls-Lacalle, L., *et al.* "Succinate dehydrogenase inhibition with malonate during reperfusion reduces infarct size by preventing mitochondrial permeability transition," *Cardiovasc Res***109**, 374 (2016)
380. Valls-Lacalle, L., *et al.* "Selective Inhibition of Succinate Dehydrogenase in Reperfused Myocardium with Intracoronary Malonate Reduces Infarct Size," *Sci Rep***8**, 2442 (2018)
381. Wang, F., Peng, Q., Liu, J., Alolga, R. N., and Zhou, W. "A novel ferulic acid derivative attenuates myocardial cell hypoxia reoxygenation injury through a succinate dehydrogenase dependent antioxidant mechanism," *Eur J Pharmacol***856**, 172417 (2019)
382. Kim, Y. S. "Malonate metabolism: biochemistry, molecular biology, physiology, and industrial application," *J Biochem Mol Biol***35**, 443 (2002)
383. Wojtovich, A. P. and Brookes, P. S. "The endogenous mitochondrial complex II inhibitor malonate regulates mitochondrial ATP-sensitive potassium channels: implications for ischemic preconditioning," *Biochim Biophys Acta***1777**, 882 (2008)
384. Traverse, J. H., *et al.* "NHLBI-Sponsored Randomized Trial of Postconditioning During Primary Percutaneous Coronary Intervention for ST-Elevation Myocardial Infarction," *Circ Res***124**, 769 (2019)
385. Rodriguez, M., Lucchesi, B. R., and Schaper, J. "Apoptosis in myocardial infarction," *Ann Med***34**, 470 (2002)
386. Sanchis, D., Llovera, M., Ballester, M., and Comella, J. X. "An alternative view of apoptosis in heart development and disease," *Cardiovasc Res***77**, 448 (2008)
387. Inserte, J., *et al.* "Studies on the role of apoptosis after transient myocardial ischemia: genetic deletion of the executioner caspases-3 and -7 does not limit infarct size and ventricular remodeling," *Basic Res Cardio***111**, 18 (2016)
388. Fernandez-Gomez, F. J., *et al.* "Malonate induces cell death via mitochondrial potential collapse and delayed swelling through an ROS-dependent pathway," *Br J Pharmacol***144**, 528 (2005)
389. Henshaw, R., *et al.* "Malonate produces striatal lesions by indirect NMDA receptor activation," *Brain Res***647**, 161 (1994)
390. Barba, I., Jaimez-Auguets, E., Rodriguez-Sinovas, A., and Garcia-Dorado, D. "1H NMR-based metabolomic identification of at-risk areas after myocardial infarction in swine," *MAGMA***20**, 265 (2007)
391. Kakinuma, Y., Matsubara, T., Hashimoto, T., and Sakamoto, N. "Myocardial metabolic markers of total ischemia in vitro," *Nagoya J Med Sci***57**, 35 (1994)

392. Starkov, A. A. "The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling," *Ann N Y Acad Sci***1147**, 37 (2008)
393. Hochachka, P. W. and Dressendorfer, R. H. "Succinate accumulation in man during exercise," *Eur J Appl Physiol Occup Physiol***35**, 235 (1976)
394. Zhang, J., *et al.* "Accumulation of Succinate in Cardiac Ischemia Primarily Occurs via Canonical Krebs Cycle Activity," *Cell Rep***23**, 2617 (2018)
395. Andrienko, T. N., Pasdois, P., Pereira, G. C., Ovens, M. J., and Halestrap, A. P. "The role of succinate and ROS in reperfusion injury - A critical appraisal," *J Mol Cell Cardiol***110**, 1 (2017)
396. Kohlhauer, M., *et al.* "Metabolomic Profiling in Acute ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction Identifies Succinate as an Early Marker of Human Ischemia-Reperfusion Injury," *J Am Heart Assoc***7** (2018)
397. Ramirez, E., *et al.* "Eplerenone attenuated cardiac steatosis, apoptosis and diastolic dysfunction in experimental type-II diabetes," *Cardiovasc Diabetol***12**, 172 (2013)
398. Chen, E. P., Bittner, H. B., Davis, R. D., Folz, R. J., and Van Trigt, P. "Extracellular superoxide dismutase transgene overexpression preserves postischemic myocardial function in isolated murine hearts," *Circulation***94**, 11412-11417 (1996)
399. Li, G., Chen, Y., Saari, J. T., and Kang, Y. J. "Catalase-overexpressing transgenic mouse heart is resistant to ischemia-reperfusion injury," *Am J Physiol***273**, H1090-H1095 (1997)
400. Xu, A., *et al.* "Transient complex I inhibition at the onset of reperfusion by extracellular acidification decreases cardiac injury," *Am J Physiol Cell Physiol***306**, C1142-C1153 (2014)
401. Korge, P., John, S. A., Calmettes, G., and Weiss, J. N. "Reactive oxygen species production induced by pore opening in cardiac mitochondria: The role of complex II," *J Biol Chem***292**, 9896 (2017)
402. Wu, N. C., *et al.* "N-acetylcysteine improves cardiac contractility and ameliorates myocardial injury in a rat model of lung ischemia and reperfusion injury," *Transplant Proc***45**, 3550 (2013)
403. Morciano, G., *et al.* "Molecular identity of the mitochondrial permeability transition pore and its role in ischemia-reperfusion injury," *J Mol Cell Cardiol***78**, 142 (2015)
404. Hausenloy, D. J., Lecour, S., and Yellon, D. M. "Reperfusion injury salvage kinase and survivor activating factor enhancement pro-survival signaling pathways in ischemic postconditioning: two sides of the same coin," *Antioxid Redox Signal***14**, 893 (2011)
405. Sanchez, J. A., *et al.* "Activation of RISK and SAFE pathways is not involved in the effects of Cx43 deficiency on tolerance to ischemia-reperfusion injury and preconditioning protection," *Basic Res Cardiol***108**, 351 (2013)
406. Bhatt, A. S., Ambrosy, A. P., and Velazquez, E. J. "Adverse Remodeling and Reverse Remodeling After Myocardial Infarction," *Curr Cardiol Rep***19**, 71 (2017)
407. Davidson, S. M., *et al.* "Multitarget Strategies to Reduce Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: JACC Review Topic of the Week," *J Am Coll Cardiol***73**, 89 (2019)
408. Pickard, J. M., *et al.* "Remote ischemic conditioning: from experimental observation to clinical application: report from the 8th Biennial Hatter Cardiovascular Institute Workshop," *Basic Res Cardiol***110**, 453 (2015)

BIBLIOGRAFIA

409. Bothwell, J. H. and Griffin, J. L. "An introduction to biological nuclear magnetic resonance spectroscopy," *Biol Rev Camb Philos Soc***86**, 493 (2011)

ANNEXOS

33rd Meeting of the International Society for Heart Research - European Section (ISHR-ES).

1-4/7/2015. Bourdeus, Aquitaine, Francia.



Format: Pòster.

Journal of Molecular and Cellular Cardiology 2015. 86, Supplement 1, pàg. 20-22.

Journal of Molecular and Cellular Cardiology 86 (2015) 51–578



Abstracts from the 33rd Meeting of the ISHR-ES,
*July 1-4, 2015,
Bordeaux, France*

Abstract n° P-06-17

Succinate dehydrogenase inhibition with malonate during reperfusion reduces infarct size in isolated mice hearts.

Laura Valls-Lacalle, Juan José Albuquerque-Béjar, Ignasi Barba, Antonio RODRÍGUEZ-SINOVAS, David García-Dorado

Laboratorio de Cardiología Experimental, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

Background: Previous studies have suggested that extensive reactive oxygen species (ROS) generation during reperfusion by reverse electron transfer from mitochondrial complex II to complex I plays a key role in reperfusion injury, and that pretreatment before ischemia with malonate, a reversible inhibitor of succinate dehydrogenase (mitochondrial complex II), reduces infarct size. However, it is not known whether administration of malonate during reperfusion is protective.

Methods and results: Isolated mice hearts were treated, under normoxic conditions, with increasing concentrations of disodium malonate (0.03-30 mM, n = 4). Malonate did not induce significant changes in end-diastolic pressure, heart rate, or perfusion pressure. However, a concentration-dependent decrease in left ventricular developed pressure was apparent, with a half-maximal concentration of 8.05 ± 2.11 mM. In hearts submitted to 35 min of ischemia followed by reperfusion (60 min), infarct size was significantly reduced by continuous treatment with malonate, from 15 min before ischemia to the end of reperfusion, at either 3 or 10 mM (26.86 ± 3.73 and $34.46 \pm 4.86\%$ vs. $50.77 \pm 5.29\%$ in control hearts, $p < 0.05$, n = 7-8/group), an effect associated with reduced LDH release and improved functional recovery during reperfusion. When malonate 3 mM was given only during the first 15 min of reperfusion, it was still able to reduce infarct size (24.57 ± 2.32 vs. 39.84 ± 2.78 in controls, $p = 0.001$, n = 7-8/group) and LDH release (125.41 ± 16.82 vs. 189.20 ± 13.74 U/g dry tissue/15 min, $p = 0.015$) and to improve functional recovery at the end of reperfusion (20.06 ± 3.82 vs. $7.76 \pm 2.53\%$ of baseline left ventricular developed pressure, $p = 0.017$). ^1H NMR spectroscopy from tissue extracts from mice hearts reperfused only for 5 min of reperfusion allow to investigate the mechanisms of protection.

Conclusion: Succinate dehydrogenase inhibition with malonate at the onset of reperfusion reduces infarct size in isolated mice hearts.

SUCCINATE DEHYDROGENASE INHIBITION WITH MALONATE DURING REPERFUSION REDUCES INFARCT SIZE IN ISOLATED MICE HEARTS.

Laura Valls-Lacalle, Juan José Alburquerque-Béjar, Ignasi Barba, Antonio Rodríguez-Sinovas, David García-Dorado.
Laboratorio de Cardiología Experimental, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

BACKGROUND

Previous studies have suggested that extensive reactive oxygen species (ROS) generation during reperfusion by reverse electron transfer from mitochondrial complex II to complex I plays a key role in reperfusion injury, and that pretreatment before ischemia with malonate, a reversible inhibitor of succinate dehydrogenase (mitochondrial complex II), reduces infarct size. However, it is not known whether administration of malonate during reperfusion is protective.

AIMS

To assess the effects of malonate, given during reperfusion, on myocardial ischemia-reperfusion injury, and to analyze the mechanisms involved in the effects observed.

METHODS

1. Effects of malonate in isolated mice hearts.

- Anesthetized male C57BL6 mice (8-10 weeks old, 25-30 g).
- Quick heart isolation, aortic cannulation and retrograde Krebs perfusion in a Langendorff system.
- Recording of left ventricular developed pressure (LVdvp), perfusion pressure (PP).
- Spectrophotometric assessment of lactate dehydrogenase (LDH) release and infarct size (TTC staining).

Experimental protocols:

- Concentration-response curves to malonate (from 0.03 to 10 mM) under normoxic conditions (n=4).
- Global ischemia (35') and reperfusion (60') (n=7-8) without or with malonate (1, 3 and 10 mM), given 15 min before ischemia to the end of reperfusion.
- Global ischemia (35') and reperfusion (60') (n=7-8) without or with malonate (3 mM), given during the first 15 min of reperfusion.

2. Mechanisms of protection.

- Anesthetized male C57BL6 mice (8-10 weeks old, 25-30 g).
- Quick heart isolation, aortic cannulation and retrograde Krebs perfusion in a Langendorff system.
- Recording of left ventricular developed pressure (LVdvp), perfusion pressure (PP).

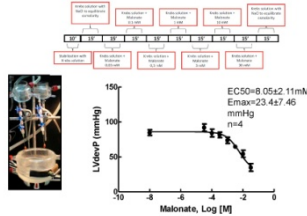
Experimental protocol:

- Global ischemia (35') and reperfusion (5') (n=7-8) without or with malonate (3 mM), given during the first 5 min of reperfusion.

- Obtention of myocardial extracts.
- Metabolomic analysis by ¹H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.

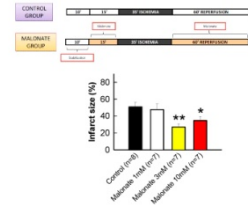
RESULTS

1. Effects of malonate perfusion in normoxic isolated, Langendorff-perfused, mice hearts.



Malonate induces in normoxic hearts a concentration-dependent decrease in left ventricular developed pressure (LVdvp)

2. Effects of continuous malonate perfusion in isolated, Langendorff-perfused, mice hearts submitted to global ischemia-reperfusion.

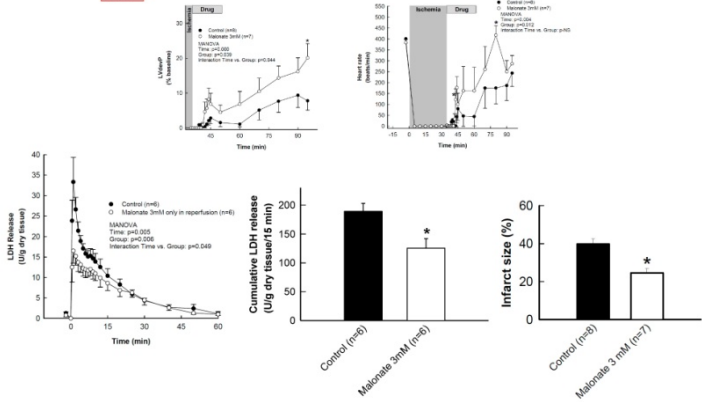


Infarct size was significantly reduced in hearts treated with a continuous infusion with malonate (at 3 and 10 mM).

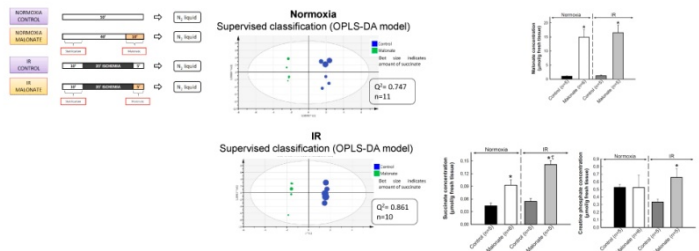
3. Effects of malonate (3 mM), given during reperfusion, on ischemia-reperfusion injury in isolated, Langendorff-perfused, mice hearts submitted to global transient ischemia.



Malonate 3 mM, given during reperfusion improves left ventricular function and reduces LDH release and infarct size in isolated mice hearts submitted to global ischemia-reperfusion.



4. Effects of malonate (3 mM), given during reperfusion, on metabolite concentrations determined by NMR in extracts from isolated, Langendorff-perfused, mice hearts submitted to global transient ischemia.



Discriminant analysis (OPLS-DA) of ¹H-NMR spectra from myocardial extracts discriminates between control hearts and those treated with malonate. Succinate concentrations are increased after malonate and creatine phosphate is better preserved in treated hearts.

CONCLUSIONS

Succinate dehydrogenase inhibition with malonate at the onset of reperfusion reduces infarct size in isolated mice hearts. Reduced reverse transfer of electrons from complex II to I and ROS production may explain protection.

29 Congrés de la Societat Catalana de Cardiologia.**25-26/5/2017. Barcelona, Catalunya, Espanya.**

Format: Presentació oral.

- ❖ La inhibició de la succinat deshidrogenasa mitjançant l'administració intracoronària de malonat a l'inici de la reperfusió disminueix la mida de l'infart en el model porcí.

Laura Valls-Lacalle, Ignasi Barba, Elisabet Miró Casas, Marisol Ruiz-Meana, Antonio Rodríguez-Sinovas, David García-Dorado.

Laboratori Malalties Cardiovasculars – Vall d'Hebrón Institut de Recerca (VHIR).

Antecedents: La inhibició de la succinat deshidrogenasa (SDH) amb malonat a l'inici de la reperfusió redueix la mida de l'infart en cors aïllats de ratolins sotmesos a isquèmia global transitòria, efecte associat amb una reducció en la producció d'espècies reactives d'oxigen.

Objectiu: Avaluar si la inhibició selectiva de la SDH amb malonat intracoronari, administrat en el moment de la reperfusió, limita la mida de l'infart en un model porcí d'oclusió coronària transitòria.

Mètodes: Vint-i-dos porcs mascles (25-30 kg) van ser anestesiats i sotmesos a esternotomia mitja, cateterització de l'artèria coronària descendent anterior (DA) i a 40 minuts d'oclusió de la DA seguida de 2 h de reperfusió. Els animals van rebre per via intracoronària (primers 5 minuts de la reperfusió) solució salina o malonat 10 mmol/L (n=11/grup). L'àrea en risc i la mida de l'infart van mesurar-se al final de l'experiment. La concentració de malonat va analitzar-se al plasma mitjançant espectroscòpia de ¹H-NMR.

Resultats: L'àrea en risc i la temperatura corporal van ser similars en ambdós grups. Per contra, la mida de l'infart va reduir-se significativament en els animals tractats amb malonat (36,46±5,35 vs. 59,62±4,00%, p<0,05), sense que hi hagués afectació contràctil del miocardi distant o canvis en la incidència d'arítmies de reperfusió. La droga va ser indetectable al plasma d'aquests animals.

Conclusions: La inhibició de la SDH amb malonat 10 mmol/L a l'inici de la reperfusió redueix la mida de l'infart en un model porcí d'oclusió coronària transitòria, sense efectes indesitjables al miocardi distant o sobre les arítmies.

37th SEF National Meeting with guest society: the British Pharmacology Society. Sociedad Española de Farmacología.



18-21/6/2017. Barcelona, Catalunya, Espanya.

Format: Conferència invitada.

Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 2017. 121, Supplement 2, pàg. 10.

Volume 121 · Supplement 2 · August 2017

BCPT
Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology

S3-4

PROTECTION AGAINST MYOCARDIAL REPERFUSION INJURY BY TARGETING MITOCHONDRIAL SUCCINATE DEHYDROGENASE

Rodríguez-Sinovas A., Valls-Lacalle L., Barba I., Miró-Casas E., Ruíz-Meana M., García-Dorado D.

Cardiovascular Diseases Research Group, Vall d'Hebron Research Institute, Barcelona, Spain

Background: Previous studies have demonstrated the importance of reactive oxygen species (ROS) generation during flow restoration after ischemia in reperfusion injury. In a recent study we analyzed the role played by reverse electron transfer from mitochondrial complex II to complex I in ROS generation during reperfusion. For this purpose, we reversibly inhibited succinate dehydrogenase with malonate, and analyzed its effects on infarct size.

Methods and results: Before testing the effects of succinate dehydrogenase inhibition in reperfusion injury, we assessed malonate actions in normoxic hearts. Isolated mice hearts were treated, under normoxic conditions, with increasing concentrations of disodium malonate (0.03–30 mM, $n = 4$). Malonate induced a concentration-dependent decrease in left ventricular developed pressure ($EC_{50} = 8.05 \pm 2.11$ mM). In isolated mice hearts submitted to 35 min of ischemia followed by reperfusion (60 min), malonate, given continuously from 15 min before ischemia to the end of reperfusion, at either 3 or 10 mM ($n = 7-8$ /group) reduced infarct size, an effect associated with reduced LDH release and improved functional recovery during reperfusion. To assess its effects on reperfusion injury, malonate 3 mM was given only during the first 15 min of reperfusion. Under these conditions, malonate was still able to reduce infarct size (24.57 ± 2.32 vs. 39.84 ± 2.78 in controls, $p = 0.001$, $n = 7-8$ /group) and LDH release (125.41 ± 16.82 vs. 189.20 ± 13.74 U/g dry tissue/15 min, $p = 0.015$) and to improve functional recovery at the end of reperfusion. Furthermore, malonate increased myocardial succinate content (1H -NMR), reduced tissue ROS production (MitoSOX staining) during reperfusion, and reduced mitochondrial permeabilization (calcein retention). These data have been recently confirmed in an in situ pig model of transient coronary occlusion (infarct size of $59.62 \pm 4.00\%$ of area at risk in control animals vs. $36.46 \pm 5.35\%$ in animals treated with 10 mM malonate).

Conclusion: Succinate dehydrogenase inhibition with malonate at the onset of reperfusion reduces reperfusion injury in mice and pig hearts.

European Society of Cardiology (ESC) Congress 217.**26-30/8/2017. Barcelona, Catalunya, Espanya.**

Format: Pòster moderat.

European Heart Journal 2017. 38, Suplement 1, pàg. 230.**P1096 | BENCH****Succinate dehydrogenase inhibition with intracoronary malonate at the onset of reperfusion reduces infarct size in pigs**

L. Valls-Lacalle, I. Barba, E. Miro-Casas, M. Ruiz-Meana, A. Rodriguez-Sinovas, D. Garcia-Dorado. *Vall d'Hebron University Hospital and Research Institute, Cardiovascular Diseases Research Group, Barcelona, Spain*

Background: Previous studies have demonstrated that succinate dehydrogenase (SDH) inhibition with malonate at the onset of reperfusion reduces infarct size and improves functional recovery in isolated mice hearts submitted to global ischemia-reperfusion, an effect associated with reduced reverse electron transfer from mitochondrial complex II and reactive oxygen production during reperfusion. However, translation to humans of systemic inhibition of SDH is problematic.

Purpose: We aimed to assess whether selective SDH inhibition with malonate in reperfused myocardium with intracoronary malonate limits infarct size in a pig model of transient coronary occlusion followed by reperfusion.

Methods: Twenty five male pigs (25–30 kg) were anesthetized and submitted to a midsternotomy, whereas a 2.5F intracoronary infusion catheter was advanced into the left anterior descending coronary artery (LAD). To assess the effects of inhibition of SDH on myocardial function, saline without or with increasing concentrations of disodium malonate (1, 10 and 50 mmol/L) were administered through the intracoronary catheter (n=3, 15 ml/min, for 5 min), under baseline conditions. The remaining 22 animals were submitted to 40 min of LAD occlusion followed by 2 h of reperfusion. Control animals received intracoronary saline for 6 minutes (from 39 min of ischemia to the first 5 min of reperfusion, 15 ml/min), whereas treated animals received malonate 10 mmol/L (n=11/group). Area at risk and infarct size were measured at the end of reperfusion by 10% fluorescein and 1% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining, respectively. Plasma samples were analyzed by 1H-NMR spectroscopy.

Results: Intracoronary administration of 50 mmol/L of disodium malonate, but not lower concentrations, caused, under baseline conditions, a significant decrease in systolic segment shortening at the end of infusion (from 0.13 ± 0.03 a.u. at baseline to 0.02 ± 0.01 a.u.) in the area receiving the treatment. These changes recovered quickly (less than 2.5 min) and were associated with an increase in plasma malonate concentrations. In pigs submitted to transient LAD occlusion, no differences were observed between control and malonate-treated pigs in hemodynamics or systolic shortening at the area at risk during ischemia-reperfusion. Area at risk, body temperature and incidence of reperfusion arrhythmias were also homogeneous between both groups. In contrast, infarct size, that averaged $59.62 \pm 4.00\%$ of area at risk in control animals, was significantly reduced in animals treated with malonate 10 mmol/L during reperfusion ($36.46 \pm 5.35\%$, $p \leq 0.05$). Malonate was undetectable (1H-NMR spectroscopy) in plasma from these animals.

Conclusions: SDH inhibition with malonate 10 mmol/L at the onset of reperfusion reduces infarct size in in situ pig hearts submitted to transient coronary occlusion. These results were not associated with increased reperfusion arrhythmias or undesirable side effects in distant myocardium.

Acknowledgement/Funding: Instituto de Salud Carlos III (grants PI14/01431 and RETICS-RIC, RD12/0042/0021). Regional Development Fund (ERDF-FEDER, a way to build Europe)

SUCCINATE DEHYDROGENASE INHIBITION WITH INTRACORONARY MALONATE AT THE ONSET OF REPERFUSION REDUCES INFARCT SIZE IN PIGS.

L. Valls-Lacalle, I. Barba, M. Ruiz-Meana, A. Rodríguez-Sinovas, D. García-Dorado.
Cardiovascular Diseases Research Group, Vall d'Hebron University Hospital and Research Institute, Barcelona, Spain

BACKGROUND

Previous studies have demonstrated that succinate dehydrogenase (SDH) inhibition with malonate at the onset of reperfusion reduces infarct size and improves functional recovery in isolated mice hearts submitted to global ischemia-reperfusion, an effect associated with reduced reverse electron transfer from mitochondrial complex II and reactive oxygen species during reperfusion. However, the effect of SDH inhibition in intact animals, unless selectively applied at the area at risk.

PURPOSE

To assess the effect of selective SDH inhibition with intracoronary malonate in reperfused myocardium on infarct size in a pig model of transient coronary occlusion.

MATERIALS & METHODS

- 1. ANIMALS**
Twenty eight male pigs (25-30 kg) were anesthetized and submitted to a mid sternotomy. These a coronary infusion catheter was advanced into the left anterior descending coronary artery (LAD).
- 2. Experimental protocols**
 - Concentration-response curves to malonate (1, 3, 10 mM) under baseline conditions (n=3)
 - Left anterior descending coronary artery (LAD) occlusion for 15 or 40 min followed by reperfusion in two groups:
 - Control group
 - Malonate group
 - Control group intracoronary infusion of saline, during the first 5 min of reperfusion (15 min/min)
 - Treated group intracoronary malonate 10 mM, during the first 5 min of reperfusion (15min/min)
- 3. Measurements**
Recording of ECG, aortic pressure, LV pressure, LV dp/dt, coronary blood flow at the LAD and regional myocardial function with ultrasonic crystals.
- 4. Measurements**
 - Measurement of area at risk (fluorescence 10%) and infarct size (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 1%).
 - Plasma succinate and malonate concentrations were analyzed by ¹H-NMR in plasma samples obtained from pigs treated under baseline conditions and after ischemia.
- 5. Quantification of reactive oxygen species (ROS) production**
ROS production was quantified in myocardial biopsies, from animals submitted to 40 min of ischemia, and treated or not with malonate 10mM, by incubation with MitoSOX Red 50µM.



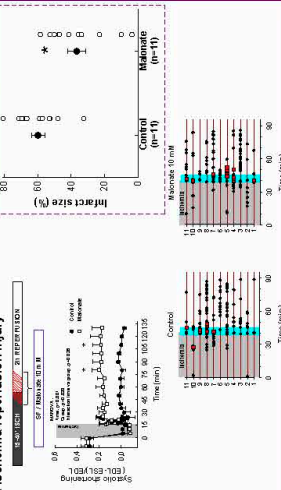
RESULTS

1. Concentration-response curve to malonate under baseline conditions

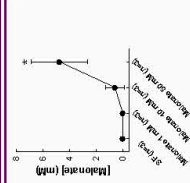


Infusion of 50 mM of disodium malonate, but not of lower concentrations, caused a significant increase in ESI in the LAD-perfused region (ischemic area) (Fig. 1A), that correlated with a marked increase in systolic segment clustering in the ischemic area (Fig. 1B).

2. Ischemia reperfusion injury

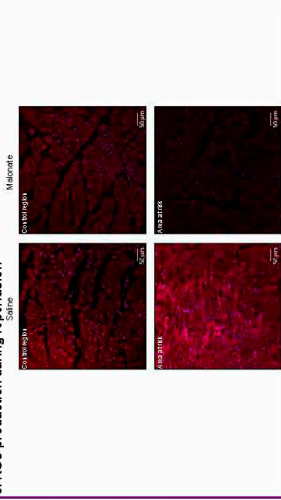


Treatment with malonate 10mM on the onset of the reperfusion significantly reduced myocardial infarct size (Fig. 2). The incidence of ventricular arrhythmias was similar in both groups.



Only plasma samples obtained after treatment with 30 mM of malonate showed an increased concentration of this metabolite, with a clear peak at about 3.12 ppm.

3. ROS production during reperfusion



MitoSOX Red staining was increased in the area at risk compared with that observed in control animals. This increase was attenuated in pigs selectively treated with malonate at the onset of reperfusion.

CONCLUSIONS

Our data demonstrate that selective intracoronary administration of malonate into the area at risk at the onset of reperfusion protects against myocardial infarction in situ pig hearts, through a reduction in ROS production, and that this effect is not associated with undesirable effects in distant myocardium or with an increased incidence of reperfusion arrhythmias.

SEC 2017 – El Congreso de las Enfermedades Cardiovasculares. Sociedad Española de Cardiología.



26-28/10/2017 – Madrid, Comunitat de Madrid, Espanya.

Format: Comunicació oral.

Revista Española de Cardiología 2017. 70, Suplement 1, pàg. 166.

Rev Esp Cardiol. 2017;70(Supl 1):166

REVISTA ESPAÑOLA DE CARDIOLOGÍA

4001-3 - LA INHIBICIÓN DE LA SUCCINATO DESHIDROGENASA CON MALONATO INTRACORONARIO REDUCE EL DAÑO POR REPERFUSIÓN EN CERDOS SOMETIDOS A OCLUSIÓN CORONARIA TRANSITORIA

Laura Valls-Lacalle, Ignasi Barba, Elisabet Miró-Casas, Marisol Ruiz-Meana, Antonio Rodríguez Sinovas y David García-Dorado del Hospital Universitari Vall d'Hebron i Institut de Recerca, Grupo de Investigación en Enfermedades Cardiovasculares; Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona; CIBER-CV.

Resumen

Introducción y objetivos: Estudios previos han demostrado que el malonato, un inhibidor de la succinato deshidrogenasa (SDH), administrado al inicio de la reperfusión, reduce el tamaño del infarto en corazones aislados de ratón sometidos a isquemia global y reperfusión. Sin embargo, antes de su uso clínico, dichos efectos deben ser investigados en un modelo clínicamente más relevante, como el porcino.

Métodos: El efecto del malonato sobre el tamaño del infarto, el aturdimiento miocárdico y la incidencia de arritmias de la reperfusión se investigó en 28 cerdos (machos, 25-30 kg) anestesiados y sometidos a esternotomía media. Tras cateterizar la arteria coronaria descendente anterior (DA) mediante un catéter de infusión intracoronaria (2,5F), los animales se sometieron a 15 (n = 3/grupo) o 40 (n = 11/grupo) minutos de oclusión de la DA seguida de reperfusión (2h). Los animales control recibieron suero fisiológico de forma intracoronaria durante los primeros 5 minutos de la reperfusión (15 ml/min), mientras que los animales tratados recibieron suero con malonato 10 mmol/L. El área en riesgo y el tamaño del infarto, además de la recuperación funcional (cristales piezoeléctricos), se determinaron mediante tinción con fluoresceína y cloruro de trifeniltetrazolio.

Resultados: La evolución de las variables hemodinámicas o de función miocárdica en los cerdos sometidos a 40 minutos de oclusión coronaria y reperfusión fue similar en ambos grupos de animales. Sin embargo, el tamaño del infarto fue significativamente inferior en los animales tratados con malonato 10 mmol/L (figura), que fue indetectable en sangre periférica (espectroscopia de ¹H-NMR). La incidencia de arritmias fue similar en ambos grupos (4 de 11 animales en controles frente a 6 de 11 en los animales tratados). En los cerdos sometidos a 15 minutos de isquemia y tratados con malonato se observó una reducción del aturdimiento miocárdico con una mayor fracción de acortamiento en el área en riesgo que sus respectivos controles (0,17 ± 0,09 frente a -0,03 ± 0,02, p < 0,05). En ningún caso hubo afección de la función del miocardio a distancia.

American Heart Association 2017. Scientific Sessions.

11-15/11/2017. Anaheim, Califòrnia, Estats Units d'Amèrica.

Format: Pòster.

Circulation 2017. 136, Supplement 1, A16497.



Circulation

Abstracts and presentations are embargoed for release at date and time of presentation or time of AHA/ASA news event. Failure to honor embargo policies (<http://newsroom.heart.org/newsmedia/embargo-policy>) will result in the abstract being withdrawn and barred from presentation.

ARTERIOSCLEROSIS, THROMBOSIS, VASCULAR BIOLOGY
SESSION TITLE: BEST OF BASIC SCIENCE

Abstract 16497: Selective Succinate Dehydrogenase Inhibition at the Area at Risk With Intracoronary Malonate Reduces Reperfusion Injury in Pigs Submitted to Transient Coronary Occlusion

Laura Valls-Lacalle, Ignasi Barba, Elisabet Miro-Casas, Marisol Ruiz-Meana, David Garcia-Dorado, Antonio Rodriguez-Sinovas

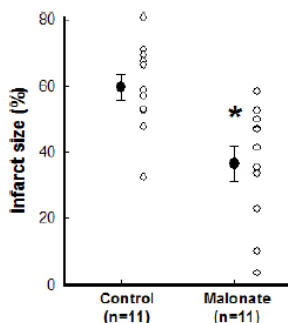
Circulation. 2017;136:A16497

Abstract

Introduction: Previous studies demonstrated that succinate dehydrogenase (SDH) inhibition with malonate during reperfusion reduces infarct size in isolated mice hearts submitted to global ischemia. However, malonate has toxic effects that preclude its systemic administration in intact animals. **Purpose:** To assess the effects of selective intracoronary administration of malonate into the area at risk on reperfusion injury in pigs submitted to transient coronary occlusion.

Methods and results: Disodium malonate (0, 1, 10 and 50 mmol/L) was given to three anesthetized, open-chest, male pigs (25-30 kg) under baseline conditions (5min, 15ml/min), through an intracoronary catheter placed at the left anterior descending coronary artery (LAD). Malonate 50 mmol/L, but not lower concentrations, transiently reduced systolic segment shortening (from 0.13 ± 0.03 to 0.02 ± 0.01 a.u.) in the LAD-perfused region, the only concentration detectable in peripheral blood by $^1\text{H-NMR}$. To assess the effects of SDH inhibition on reperfusion injury, saline or malonate 10 mmol/L were selectively given into the area at risk in 28 animals submitted to 15 or 40min of LAD occlusion followed by reperfusion. Malonate reduced infarct size (36.46 ± 5.35 vs. $59.62 \pm 4.00\%$, $p < 0.05$, $n=11$) and improved systolic shortening in the area at risk (0.18 ± 0.07 vs. 0.00 ± 0.01 a.u., $p < 0.05$, $n=3$) after 40 or 15 min of ischemia, respectively, with no changes in the incidence of reperfusion arrhythmias (ventricular fibrillation: 4 out of 11 animals in controls vs. 6 out of 11 in malonate-treated). Malonate reduced reactive oxygen species (ROS) production (MitoSOX) in myocardial samples obtained 5 min after reperfusion.

Conclusions: SDH inhibition with intracoronary malonate at the onset of reperfusion reduces reperfusion injury in pigs submitted to transient coronary occlusion. These results were not associated with increased reperfusion arrhythmias or undesirable side effects in distant myocardium.



Reperfusion injury Infarct size Mitochondria Ischemia reperfusion

Author Disclosures: L. Valls-Lacalle: None. I. Barba: None. E. Miro-Casas: None. M. Ruiz-Meana: None. D. Garcia-Dorado: None. A. Rodriguez-Sinovas: None.

SELECTIVE SUCCINATE DEHYDROGENASE INHIBITION AT THE AREA AT RISK WITH INTRACORONARY MALONATE REDUCES REPERFUSION INJURY IN PIGS SUBMITTED TO TRANSIENT CORONARY OCCLUSION.

Laura Vallis-Lacalle, Ignasi Barba, Elisabet Miró-Casas, Marisol Ruiz-Meana, Antonio Rodríguez-Sinovas, David García-Dorado. Cardiovascular Diseases Research Group, Vall d'Hebron University Hospital and Research Institute, CIBER-CV, Barcelona, Spain.

BACKGROUND

- Previous studies demonstrated that succinate dehydrogenase (SDH) inhibition with malonate at the onset of reperfusion reduces infarct size and improves functional recovery in isolated mice hearts submitted to global ischemia-reperfusion.
- This protective effect was associated with reduced reverse electron transfer from mitochondrial complex II to complex I and diminished reactive oxygen (ROS) production during reperfusion.
- However, malonate may have toxic effects that would preclude its systemic administration in intact animals, unless selectively applied at the area at risk.

AIMS

To assess the effects of selective intracoronary administration of malonate into the area at risk on reperfusion injury in pigs submitted to transient coronary occlusion.

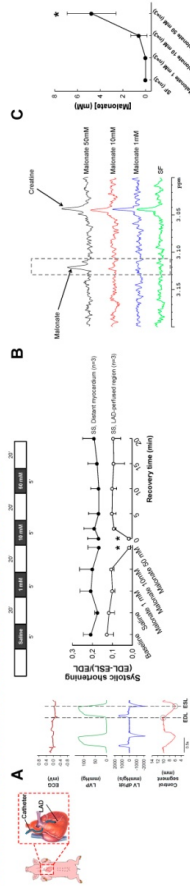
METHODS

- Animals.** Eight male pigs (25-30 kg) were anesthetized and submitted to a mid-thoracotomy whereas a 2.5F intracoronary infusion catheter was advanced into the left anterior descending coronary artery (LAD).
- Experimental protocols.**
 - Concentration-response curves to malonate (1, 3, 10 mM) under baseline conditions (n=5).
 - Control group: descending coronary artery (LAD) occlusion for 15 or 40 min followed by reperfusion.
 - Control group: intracoronary infusion of saline, during the first 5 min of reperfusion (15 min).
 - Malonate group: intracoronary malonate 10 mM, during the first 5 min of reperfusion (15 min).
- Measures.**
 - Recording of ECG, aortic pressure, LV pressure, LV dP/dt, coronary blood flow at the LAD and regional myocardial function with ultrasonic crystals.
 - Infarct size (fluorescein 10%) and infarct size (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) %).
- Nuclear magnetic resonance.** Malonate concentrations were analyzed by ¹H-NMR in plasma samples obtained from pigs reperfused under baseline conditions and all ROS production in cardiac tissue.
- Quantification of ROS production.** ROS production was quantified in myocardial biopsies obtained 5 min after reperfusion, in animals submitted to 40 min of ischemia, and treated or not with malonate 10mM, by incubation with MitoSOX Red 50µM.



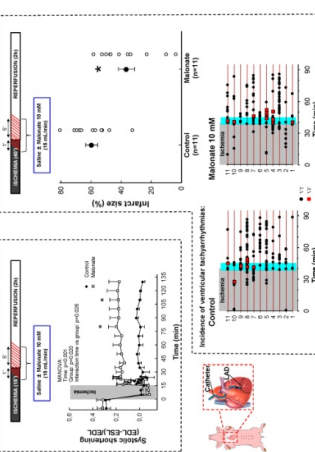
RESULTS

1. Concentration-response curve to malonate under baseline conditions.



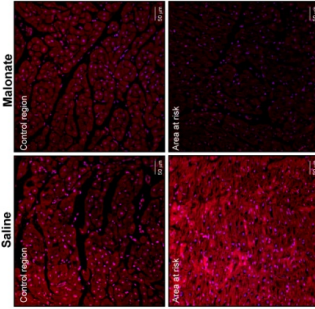
Only 50 mM of disodium malonate, but not lower concentrations, induced a reduction in cardiac contractility (systolic shortening) in the LAD-perfused region (A). In addition, this was the only concentration that was detectable in peripheral blood by ¹H-NMR spectroscopy (B,C).

2. Ischemia-reperfusion injury.



Treatment with malonate 10mM at the onset of reperfusion significantly attenuated myocardial stunning and reduced infarct size. These effects were not associated with changes in the incidence of reperfusion arrhythmias.

3. ROS production during reperfusion.



Treatment with malonate 10 mM at the onset of reperfusion reduced ROS production in the area at risk, as assessed by MitoSOX. Red staining in myocardial biopsies obtained 5 minutes after flow restoration.

CONCLUSIONS

Succinate dehydrogenase inhibition with intracoronary malonate at the onset of reperfusion reduces reperfusion injury in pigs submitted to transient coronary occlusion. These results were not associated with increased reperfusion arrhythmias or undesirable side effects in distant myocardium.

This work was funded by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (grants FIS P14/01431, P17/01397, RETICS-RC, RD12/0042/0021 and CIVERCV) cofinanced by the European Regional Development Fund (ERDF-FEDER) and Fundació La Marató TV3 (grant.2015.3610).

ANNEX ESPECIAL

BEQUES I PREMIS ATORGATS

- Beca Fundació la Marató de Tv3 (2014): “Paper de la conexina 43 en la cicatrització miocàrdica postinfart, en el remodelat advers del ventricle esquerre i en la insuficiència cardíaca”. Duració: 1/1/16 – 31/12/18.
- Instituto de Salud Carlos III (FIS), Ministerio de Economía y Competitividad (PI17/01397). “ Prevención del daño por reperfusión en el infarto de miocardio mediante inhibición de la succinato deshidrogenasa”. Duració: 1/1/18-31/12/20.
- Proyecto de la Fundación Española del Corazón para Investigación Básica en Cardiología 2018: “Prevención del daño por reperfusión en el infarto de miocardio mediante inhibición de la succinato deshidrogenasa”. Duració: 1/1/19-31/12/19.

