



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**CARRERA DE BIOLOGÍA**

**EFFECTO PROTECTOR DEL COMPLEJO  $\mu$ -(OXO) BIS (TETRAAMONIO  
DE RUTENIO) (RTH<sub>360</sub>) SOBRE EL DAÑO POR REPERFUSIÓN POST-  
ISQUÉMICA MIOCÁRDICA.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**P R E S E N T A**

**GERARDO DE JESÚS GARCÍA RIVAS**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DRA. ANA CECILIA ZAZUETA MENDIZABAL**

**MAYO 2003**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**AL DOCTOR JAVIER ANTONIO GARCÍA HERNÁNDEZ  
Y A LA MAESTRA MARÍA DEL PILAR RIVAS VELASCO,  
MIS MARAVILLOSOS PADRES.**

## Índice

Abreviaturas	<b>IZT.</b>	4
Resumen		5
Summary		6
Introducción		7
1.- Efecto de la isquemia en el metabolismo miocárdico		7
2.- Efecto de la reperfusión post-isquémica		
2.1.- Daño por radicales libres		8
2.1 Sobrecarga de Calcio		9
3.- Sistema de transporte de calcio mitocondrial		10
4.- Inhibición del transporte de calcio mitocondrial por Rth360		11
Hipótesis		12
Objetivos		12
Metodología		13
Inducción de la reperfusión in vivo		13
Evaluación de daño tisular		13
Análisis de arritmias		14
Análisis de integridad mitocondrial		14
Transporte de calcio mitocondrial		14
Síntesis del Rth360 radioactivo		15
Acumulación del Rth360 en corazón aislado		15
Resultados		16
Discusión		28
Conclusiones		33
Referencias		34

## Abreviaturas

- Rth<sub>360</sub> : complejo  $\mu$ -(oxo) bis (tetraamonio de rutenio)
- ATP: adenosin 5' trifosfato
- ADP: adenosin 5' difosfato
- Pi: fosfato inorgánico
- CoA: acetil coenzima A
- NADH: nicotin adenin dinucleótido reducido
- HEPES: (N-(hidroxietil) piperacina N'-(2-etanosulfónico))
- EDTA: etilendiamina tetra ácido
- CCCP: carbonil cianuro m-cloro fenil hidrazona
- VDAC: canal aniónico dependiente de voltaje

## Resumen

Las enfermedades isquémicas miocárdicas son la principal causa de muerte en el mundo. En México también son el mayor problema de salud pública. La isquemia miocárdica es la disminución o interrupción de flujo sanguíneo, que reduce suministro de oxígeno y los sustratos oxidables. La reperfusión es la restitución de flujo sanguíneo.

Un creciente número de evidencias sugieren que el daño por reperfusión está mediado en gran parte por la mitocondria. El daño oxidativo mitocondrial, junto con la entrada de calcio incrementan durante la reperfusión. La sobrecarga de calcio mitocondrial es a través del uniportador de calcio, altas concentraciones en el calcio en la matriz promueven la aparición de un estado de alta permeabilidad en la membrana interna mitocondrial, llamado transición de la permeabilidad mitocondrial. El complejo dinuclear de rutenio es el más específico y potente inhibidor del uniportador de calcio mitocondrial.

Este trabajo reporta el efecto del Rth360 en un modelo in vivo de reperfusión post-isquémica miocárdica. Nuestros resultados en corazones in vivo tratados con Rth360, mostraron ausencia por completo de arritmias post-reperfusión, una disminución significativa en la liberación de enzimas marcadoras de daño tisular y mantuvieron en buen estado fosforilante a las mitocondrias. En corazón aislado el compuesto Rth360 se unió de forma más específica a la fracción microsomal. Estos resultados demuestran que el Rth360 disminuye el daño por reperfusión disminuyendo, la aparición de arritmias severas, lesión tisular, liberación de enzimas, manteniendo el metabolismo oxidativo y la función contráctil después de la reperfusión.

## Summary

Ischaemic heart disease is the most common cause of death in several countries around the world. In Mexico is a main public health problem. Myocardial ischaemia is the decrease or cessation of blood flow, reducing oxygen and oxidative substrates supply to the myocardium. Reperfusion restitutes the blood flow in those areas.

A growing body of evidence has demonstrated that reperfusion injury is mediated by mitochondria. Mitochondrial oxidative damage is enhanced during reperfusion, probably due to an enhanced mitochondrial calcium uptake. Mitochondrial calcium overload occurs via the calcium-uniporter, high free  $[Ca^{2+}]$  inside mitochondria induces the onset of a highly permeable state of the mitochondrial inner membrane, called the mitochondrial permeability transition pore. Oxygen-bridged dinuclear amine complex (Rth360) is the most potent and specific inhibitor of the mitochondrial calcium uniporter. This study reports the effect of Rth360 *in vivo* rat hearts after ischemic-reperfusion injury. Our results in the *in vivo* reperfused hearts treated with Rth360, showed that post-reperfusion induced arrhythmias are completely absent. Also it was observed a decrease of markers enzymes for tissular injury and an intact mitochondrial phosphorylating capacity. In isolated heart this compound Rth360, bind more specific to microsomal fraction (30 times). This data demonstrated that Rth360 treatment reduces reperfusion injury, severe arrhythmias, tissue lesion, enzyme release and maintains the oxidative metabolism and contractile performance in rat heart after ischemic-reperfusion injury.

## Introducción

La isquemia miocárdica es un proceso de etiología múltiple y resultado variable en la que se reduce o cesa la presión sanguínea en una área del músculo cardíaco, manifestándose en una disminución de oxígeno, de sustratos oxidables y en la acumulación de productos catabólicos. La restitución de flujo sanguíneo en el área tisular constituye el proceso de reperfusión. En general el daño por isquemia es un proceso dinámico, que seguido de una pronta reperfusión puede recuperar por completo el metabolismo cardíaco; sin embargo al cabo de unas horas produce la necrosis total del tejido.

### 1.- Efecto de la isquemia en el metabolismo miocárdico

La privación total de flujo sanguíneo perturba el metabolismo cardíaco. En varios segundos el oxígeno disuelto en el citoplasma o unido a mioglobinas se consume y por ello la fosforilación oxidativa y la producción de ATP mitocondrial se afecta seriamente. Los niveles de fosfatos de alta energía, mantenidos por la creatina fosfato y el ATP disminuyen y los productos de la ruptura de estos, la adenosina y el Pi aumentan. La adenosina actúa como agente protector endógeno, pues es un potente vasodilatador y reduce la demanda de oxígeno reduciendo la agregación de trombocitos y neutrófilos en el endotelio.

En la isquemia miocárdica se incrementa la circulación de catecolaminas, esto produce lipólisis y estimulación en la liberación de ácidos grasos, sin embargo la oxidación de ácidos grasos y ciclo de ácidos tricarboxílicos se inhibe. Esto produce mayor acumulación citosólica de ácidos grasos libres y CoA-ésteres que inhiben al translocador de adenín nucleótidos.

La gluconeogénesis y glicólisis anaerobia se estimulan permitiendo la acumulación de lactato y  $H^+$ , produciendo acidosis intracelular. Finalmente la acumulación de  $H^+$ , Lactato y NADH inhibe la glicólisis y la producción de energía anaeróbica. (Opie, 1976, Stanley et al. 1997).

El control transmembranal dependiente de energía se pierde cuando los iones  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  salen de la célula y el  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$  extracelulares ingresan. El  $Ca^{2+}$  se acumula en mitocondrias. La redistribución electrolítica produce cambios osmóticos y edema celular. Las enzimas lisosomales se activan y comienza la autólisis, muerte celular y finalmente necrosis (Pipper 2000).

## **2.- Efecto de la reperfusión postisquémica**

Resulta claro que el miocardio isquémico no puede recuperarse sin la restitución de un flujo coronario adecuado (Hearse,1977). Sin embargo, la reperfusión no es necesariamente benéfica, pues se ha reportado que puede acelerar y aumentar en forma paradójica el daño por isquemia (Manning & Hearse, 1984; Poole-Wilson et al,1980; Nayer,1981). La reperfusión no es solo un fenómeno experimental pues ocurre bajo un gran número de situaciones patológicas y clínicas; después de segundos o minutos de isquemia la reperfusión produce espasmos coronarios y serias arritmias incluyendo taquicardias y fibrilación ventricular; este tipo de arritmias están asociadas en muchos casos a muerte cardíaca (Tzivoni et al, 1983). La reperfusión después de un largo periodo de isquemia se puede observar bajo procesos quirúrgicos de by-pass cardiopulmonar, en el uso de terapia antitrombótica y angioplastia percutánea transluminal ( metodología que permite la recanalización de arterias ocluidas) (Lerch,1993).Bajo estas condiciones las arritmias por reperfusión son indicadores de recanalización y el beneficio real en términos de recuperar la función cardíaca se encuentran aún bajo consideración (Goldberg et al, 1983; Rentrop et al, 1984; Furberg, 1984; Hearse,1984).

Las dos hipótesis más importantes para explicar el daño celular subsecuente a la reperfusión, son la sobrecarga de calcio y la producción de especies reactivas de oxígeno.



## 2.1 Daño por radicales libres

**IZT.**

Se propone que la súbita reintroducción de oxígeno a las células produce daño por la formación de radicales libres (Hearse et al, 1978). Durante la isquemia, algunos componentes de la cadena respiratoria se reducen por ejemplo el  $c1-Fe^{2+}$  (Guarneri et al, 1980). Esto propicia condiciones favorables para la generación de radicales superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) por la cadena respiratoria mitocondrial, provocando un elevación de  $H_2O_2$  y radiales hidroxilo, que son altamente reactivos y tóxicos para la células (Guarneri et al, 1980; Myers, 1985); además se incrementa el GSH (glutación reducido), junto con la glutación peroxidasa y la superóxido dismutasa, que son agentes antioxidantes naturales. La activación de neutrófilos y oxidación de catecolaminas son otra fuente de radicales libres (Welbourn, 1991). Los radicales libres son químicamente muy reactivos y causan peroxidación de ácidos grasos insaturados y fosfolípidos, destruyendo las membranas e inhibiendo proteínas membranales.

## 2.2 Daño por sobrecarga de calcio

Cuando el  $Ca^{2+}$  es removido del espacio extracelular y reintroducido a la célula cardíaca produce severos daños como la destrucción masiva de tejido, liberación de enzimas y disfunción en bandas de contracción (Zimmerman & Hulsman, 1960). La reperfusión después de una isquemia prolongada, está asociada a un severo incremento en el contenido de  $Ca^{2+}$  intracelular. La excesiva acumulación de calcio ha sido relacionada como un evento primario en el daño irreversible al miocardio y la necrosis celular (Opie, 1989). El aumento en la entrada de

calcio durante la reperfusión se explica por la incapacidad de los sistemas de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  para expulsarlo, resultando en una elevación de  $\text{Ca}^{2+}$  libre citosólico. Aunque el mecanismo responsable de este incremento no se ha definido, deficiencias en el transporte del ión a través de la membrana sarcolemal parecen ser responsables de este incremento, mediante la liberación de este catión de receptáculos endógenos (especialmente retículo sarcoplásmico) (Langer, 1990; Fabiato & Baumgarten, 1984; Tada, 1984; Bers, 1991; Cannell et al, 1993; Cheng et al, 1996) . La entrada incontrolada de calcio produce la activación de fosfolipasas (Chien et al, 1980; Weglicki et al, 1972) y proteasas (Orgund et al, 1980) que producen daño en el citoesqueleto y las membranas celulares. Estudios recientes han demostrado que la reoxigenación se encuentra asociada a un incremento en el calcio mitocondrial, este incremento produce una marcada disminución de la fosforilación oxidativa (Moreno-Sánchez 1985, 1985), por lo que se ha especulado que la muerte celular ocurre cuando la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  afecta la producción de ATP (Darle et al, 1991; Silverman, 1993). Se ha observado que la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  actúa como detonante de la apoptosis, vía la transición de la permeabilidad. La apertura del mega canal asociado a la membrana interna mitocondrial (Crompton, 1990), permite la liberación de componentes mitocondriales como el citocromo c (Fan, 1999; Li et al, 1997) que se sabe es un intermediario en la cascada de la activación de caspasas y en la muerte celular programada o apoptosis.

### **3.-Sistema de transporte de $\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial**

Durante la reperfusión, el calcio citosólico al igual que la concentración de calcio mitocondrial se acumula vía el uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  intramembranal (Ferrari et al 1993). Este incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial induce la transición de permeabilidad mitocondrial.

El sistema de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial está mediado por tres mecanismos separados, el de entrada rápida a través de un uniportador, el de salida dependiente de  $\text{Na}^+$  y el de salida

no dependiente de  $\text{Na}^+$  (Gunter & Pfeiffer, 1990). La entrada a través del uniportador mitocondrial es dependiente de potencial de membrana negativo (Scarpa & Azzone, 1970). El uniportador es activado por  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  (Gunter & Pfeiffer, 1990; Kroner, 1987; 1988; Saris & Kroner, 1990), ADP (Rottemberg & Marbach, 1990; Gunter & Pfeiffer, 1990) trietilentetralamina, protamina y diversos antibióticos (Kroner, 1990). El uniportador transporta  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y lantánidos que además tienen efecto de inhibir competitivamente la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Akerman et al, 1977; Carafoli, 1965; Frandser & Schussboe 1991; Red, 1990; Romlos & Flatmark 1973; Vanio et al, 1970).

#### **4.- Inhibición de rutenio 360 sobre el transporte de calcio**

El rojo de rutenio es un colorante muy utilizado para teñir polisacáridos ácidos y mitocondrias en microscopia de luz y electrónica (Clarke, 1980). Inhibe en forma competitiva la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (Lehninger et al, 1967; Moore, 1971; Vasigton, 1972; Reed & Bygraves, 1974) y los canales de liberación de retículo sarcoplásmico (Antu et al, 1985; Chiesi et al, 1988; Chamberlain et al, 1984). En 1974 Reed y Bygraves propusieron que la inhibición se debía a otro compuesto presente en las muestras comerciales de rojo de rutenio. De estas preparaciones comerciales se aisló y caracterizó el complejo  $\mu$ -(oxo) bis (tetraamonio de rutenio) que inhibe el transporte de calcio mitocondrial con mayor potencia que otros compuestos polinucleares (Ying et al, 1991) y puede bloquear la entrada de calcio mitocondrial en células intactas (Matlib et al, 1998).

## Hipótesis

El complejo dinuclear de rutenio (Rth360) puede proteger de la sobrecarga de calcio en la reperfusión post-isquémica al inhibir el transporte de calcio mitocondrial, manteniendo la síntesis de ATP y evitando la transición de la permeabilidad mitocondrial.

## Objetivo

Evaluar el efecto protector del (Rth360) en el daño por reperfusión post-isquémica *in vivo*, en corazón de rata.

## Objetivos particulares

- i) Evaluar los parámetros electrofisiológicos y de daño tisular en un modelo *in vivo* de reperfusión post-isquémica en presencia de Rth<sub>360</sub>.
- ii) Determinar la funcionalidad mitocondrial, a través del consumo de oxígeno, potencial transmembranal y la medición del transporte de Ca<sup>2+</sup> en presencia de Rth<sub>360</sub>.
- iii) Identificar la fracción celular que une al compuesto en forma específica.

## **Metodología**

### **Inducción de la reperfusión *in vivo***

Se utilizaron ratas Wistar machos con peso entre 300 y 350 gramos, anestesiadas con pentobarbital (50mg/Kg de peso corporal i.p. ). Se realizó traqueotomía para proporcionar apoyo ventilatorio en modalidad controlada . Se conectaron a los animales 3 electrodos de superficie para el registro de electrocardiograma en derivación DII, (polarógrafo GRASS modelo 79 D). La tensión arterial se registró utilizando un transductor de presión conectado a la arteria femoral mediante una cánula heparinizada. Para producir la isquemia se realizó toracotomía izquierda, se expuso el corazón y se ligó la arteria coronaria izquierda cerca de su origen. Al minuto 5 de la oclusión se cortó la ligadura para producir la reperfusión con una duración de 5 minutos. Para evaluar la actividad eléctrica del corazón se tomó registro del electrocardiograma y la tensión arterial durante los últimos 20 segundos de la isquemia y durante los últimos 20 segundos del periodo de reperfusión.

### **Evaluación de daño tisular**

Después de 10 minutos de isquemia/reperfusión se obtuvieron muestras sanguíneas del ventrículo izquierdo . Se obtuvo el plasma para determinar la liberación de las enzimas marcadoras de daño tisular: creatina cinasa y lactato deshidrogenasa, cuya actividad se determinó por espectrometría (Szasz & Busch, 1979).

Los niveles séricos basales fueron obtenidos de ratas donde se simuló el experimento (toracotomía sin isquemia/reperfusión).

## **Análisis de las arritmias**

Se llevó a cabo en los electrocardiogramas obtenidos. El análisis incluyó frecuencia cardíaca, proporción de los latidos normales, taquiarritmias ventriculares y fibrilaciones ventriculares por minuto. Se consideraron latidos normales aquellos capaces de provocar una onda positiva en el registro gráfico de la tensión arterial y que conservaran la morfología de la onda P (activación y desactivación auricular) y el complejo QRS (activación y desactivación ventricular).

## **Análisis de integridad mitocondrial**

A partir de los ventrículos sujetos a reperfusión post-isquémica en el modelo *in vivo*, se aislaron mitocondrias de acuerdo al método descrito por Moreno-Sánchez y Hansford (1988). Por medio de técnicas polarográficas con un electrodo tipo Clark, se obtuvieron las velocidades de consumo de oxígeno, se determinaron los parámetros control respiratorio (C.R.) y P/O como indicadores de integridad mitocondrial. También se midió el potencial transmembranal por medio del colorante catiónico safranina de acuerdo al método descrito por Zarotti y Azzone en 1980. La concentración final de proteína fue determinada por el método de Lowry (1951).

## **Transporte de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial**

A partir de los ventrículos sujetos a reperfusión post-isquémica en el modelo *in vivo* se aislaron mitocondrias de acuerdo al método descrito por Moreno-Sánchez y Hansford (1988). La entrada de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial se midió usando 10-50  $\mu\text{M}$  de <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub> (actividad específica 1000 cpm/nmol). Las mitocondrias se filtraron a través de una membrana con un tamaño de poro de 45 $\mu\text{M}$ , en un medio que contenía 125mM KCl, 10mM HEPES, 10mM Succinato, 200 $\mu\text{M}$  de ADP,

10µg de Rotenona, 3mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 50-10µM de <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub>, pH 7.3, los experimentos se iniciaron con 0.5mg de proteína mitocondrial.

### **Síntesis de inhibidor marcado <sup>103</sup>Rth<sub>360</sub>**

Se disolvió un 1mCi de cloruro de rutenio marcado radioactivamente, con 0.015 mL de ácido clorhídrico a una concentración de 6 N junto con 0.002 mL de etanol absoluto. Esta mezcla se calentó por 60 minutos a una temperatura de 90 °C, después se adicionó 0.002 mL de amoniaco concentrado y 0.2 mL de hidróxido de amonio 12 N. Esta mezcla se calentó por 20 minutos a 90 °C, finalmente se incubó 12 horas a 40 °C.

El volumen que se recuperó se pasó por una columna de carboximetilcelulosa que previamente se equilibró con formiato de amonio 0.2 M, pH 5.0. La elusión se hizo con formiato de amonio en gradiente lineal de concentración de 0.2 a 0.6 M. Para finalizar se realizó un espectro donde se seleccionaron aquellos tubos que presentaban un pico de absorbancia a 360 nm. Estos tubos se colectaron en uno solo y finalmente se cuantificó la concentración final de rutenio 360(ε= 2.6X10<sup>4</sup> l/mol.cm).

### **Acumulación de <sup>103</sup>Rutenio<sub>360</sub> *in situ* en el sistema de corazón aislado**

Se montó el corazón en un sistema de Langendorff, perfundiendo solución Krebs-Ringer suplementada con 1.2mM de CaCl<sub>2</sub> y 50nM de <sup>103</sup>Rth<sub>360</sub> recirculante por 20 minutos. Para descontar la unión inespecífica se perfundió 20 minutos más con la solución Krebs-Ringer sin el <sup>103</sup>Rth<sub>360</sub>. Posteriormente se aislaron las mitocondrias y la fracción microsomal a 45,000 rpm en un medio que contenía 250 mM de sacarosa 10 mM de Hepes y 10 mM de EDTA a pH de 7.3 en estas fracciones se determinó la radioactividad en un contador de emisiones gama. A estas fracciones se les determinó la actividad de Citocromo c oxidasa como enzima marcadora para mitocondria y glucosa 6-fosfatasa para retículo sarcoplásmico.

## Resultados

### 1.- Efecto del Rutenio<sub>360</sub> en la actividad eléctrica del corazón después de la reperfusión post-isquémica.

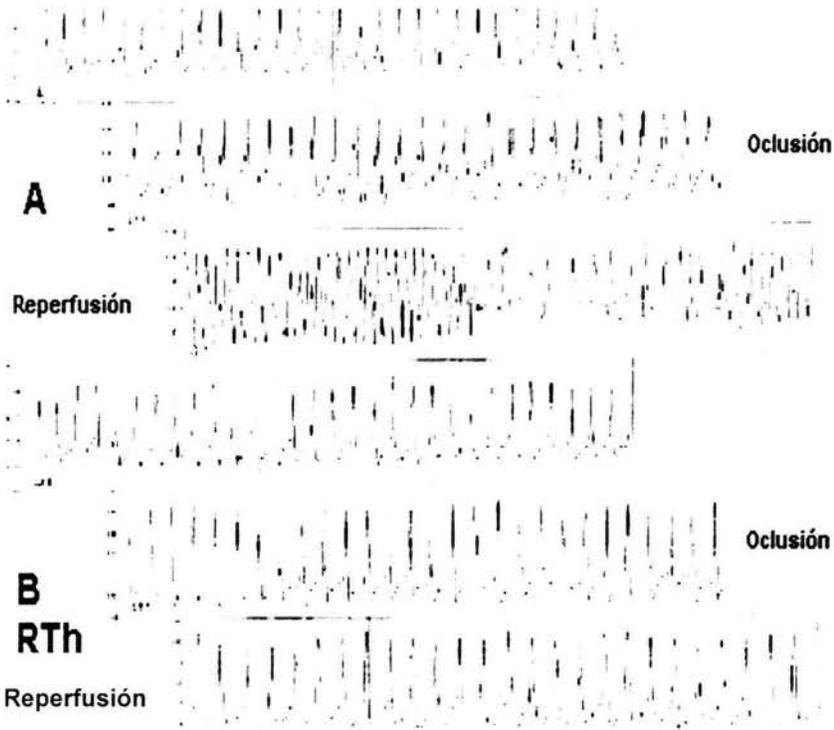


Fig1 Trazo característico de Electrocardiograma (ECG) en ratas sometidas a reperfusión post-isquémica. En el panel A se muestra el ECG control. En el panel B se muestra el ECG bajo la administración del complejo dinuclear de rutenio (Rth360).

Para evaluar las propiedades rítmicas y la conductividad del órgano cardiaco, se hicieron mediciones electrofisiológicas. En la Fig. 1 se presenta un trazo característico del

electrocardiograma obtenido; en el panel A se observa un registro control antes de la oclusión, durante la oclusión ( isquemia ) y en la reperfusión post-isquémica . En el panel B se observa un registro del grupo experimental previamente tratado con 115 picomoles de Rutenio<sub>360</sub> i.v. Se observan en los dos paneles latidos normales (sinusales) antes de la ligadura. Durante la oclusión, la apertura del complejo QRS característico de la isquemia es evidente en ambos grupos, mientras que durante la reperfusión , la diferencia entre los latidos de las ratas controles en las que se observan taquicardias ventriculares principalmente, contrastan con los latidos normales observados en ratas a las que se les administró el complejo dinuclear de rutenio.

## **2.- Efecto del Rutenio<sub>360</sub> sobre la aparición de arritmias en la reperfusión post-isquémica.**

En la tabla 1 se presenta un análisis de arritmias hecho a partir de la comparación entre la frecuencia cardiaca, los latidos normales y diversos tipos de arritmias después de 5 minutos de reperfusión post- isquémica . Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar de n experimentos realizados . El asterisco ( \* ) indica diferencia significativa entre los animales tratados y no tratados (P <0.05). En la tabla 2 se presenta el análisis de la aparición de fibrilación ventricular, después de 5 minutos de reperfusión post-isquémica, que aparece 7 de 13 veces representando el 53.8%. En ratas tratadas con el rutenio no se observó fibrilación ventricular en ningún experimento, este particular tipo de arritmias esta asociada a muerte por falla cardiaca.

	Reperusión	Reperusión + Rth <sub>360</sub>
Frecuencia cardiaca (latidos/min) Antes de la isquemia	325±13	318±17
Frecuencia cardiaca (latidos/min) Durante la isquemia	285±14.7	307±28
Latidos normales (s/min)	9.2±3.51	57.1±4.8 *
Taquicardia ventricular (s/min)	38±5.4	0*
Latidos ventriculares prematuros (extrasístoles) (s/min)	8.5±2.2	8.4±3.7
Fibrilación ventricular (s/min)	32±8	0*

n=13

n=16

Tabla 1. Comparación entre frecuencia cardiaca, latidos normales y diversos tipos de arritmias después de 5 minutos de reperusión post- isquémica en ratas no tratadas y en ratas a las que se les administró Rth<sub>360</sub>.

---

<b>Fibrilación ventricular</b>	<b>reperfusión</b>	<b>reperfusión + Rth<sub>360</sub></b>
--------------------------------	--------------------	--

---

Número de apariciones	7	0
-----------------------	---	---

Porcentaje	53.8	0
------------	------	---

---

Tabla2. Análisis de la aparición de fibrilación ventricular en ratas no tratadas y tratadas con el inhibidor ( Rth<sub>360</sub>).

### **3.- Efecto del Rth<sub>360</sub> sobre el daño tisular asociado a la reperfusión post-isquémica miocárdica.**

Para evaluar el daño tisular se midió la actividad de las enzimas marcadoras creatina cinasa (CK) y lactato deshidrogenasa (LDH) en el suero.

En la tabla 3 se presentan los valores obtenidos. Las muestras controles son de ratas "simuladas" a las que se les practicó el proceso quirúrgico sin someterlas a reperfusión post-isquémica. En ratas sometidas a reperfusión, se observa un aumento significativo en la actividad de ambas enzimas, este valor disminuye significativamente en las ratas tratadas con Rth<sub>360</sub>.

Enzima	Control	Reperusión	Reperusión +Rth360
CK	263.16±68	1448.18±213*	604.9±252*
LDH	270±69	1642±179*	714.3±125*

Tabla 3. Actividad de las enzimas creatina cinasa (CK) y lactato deshidrogenasa (LDH) en suero de ratas controles (n=10), en suero de ratas sometidas a reperusión postisquémica (n=14) y en suero de ratas tratadas con Rth<sub>360</sub> (n=16).

\* Significancia estadística con  $P < 0.05$  según prueba de ANOVA; promedio  $\pm$  desviación estándar.

#### 4.-Efecto del Rth<sub>360</sub> en la integridad mitocondrial, después de la reperusión post-isquémica.

Los parámetros para determinar la integridad mitocondrial que utilizamos, fueron el control respiratorio (CR): coeficiente que relaciona el consumo de oxígeno asociado a la respiración y el asociado a la fosforilación oxidativa. (P/O) que se relaciona con la síntesis de ATP. Las mitocondrias fueron aisladas de los ventrículos sometidos a reperusión, identificamos diferencias significativas en el control respiratorio de mitocondrias tratadas con el inhibidor en un 30% comparadas con las no tratadas. El valor de control respiratorio de las mitocondrias controles es similar al de las tratadas con Rth<sub>360</sub> (5.5 y 5.68). Al agregar al medio de reacción CaCl<sub>2</sub> (15μM) para observar la susceptibilidad a este catión durante la respiración, se observó que las mitocondrias de ventrículo reperfundido están desacopladas en relación a las controles o tratadas con el inhibidor (4.37 y 5.1 respectivamente).

La relación P/O también disminuyó en mitocondrias aisladas del ventrículo sometido a reperusión post-isquémica, los valores controles se recuperaron en mitocondrias tratadas con el inhibidor. Las velocidades de estado IV son iguales en las tres clases de mitocondrias. Las velocidades de estado III presentaron diferencias significativas entre las mitocondrias reperfundidas y las

tratadas con el inhibidor , respecto a las no tratadas. La velocidad de estado III no cambia en las controles ni en las tratadas con Rth<sub>360</sub>.

Mitocondrias		Control	reperfusión	reperfusión + Rth <sub>360</sub>
C.R.		5.68± 1.2	4.4±.5*	5.5±1.1*
	+15µM Ca	4.37±.1.2	1.35±1.5*	5.1±1.4*
P/O		1.32±.08	.96±.06*	1.4±.1*
Edo. III (natO <sub>2</sub> /min)		372±34	205±18*	428±75*
Edo. IV (natO <sub>2</sub> /min)		50±13	30±8	55±16

Tabla 4. Parámetros de integridad mitocondrial evaluados por técnicas polarográficas. CR:Control respiratorio, relación P/O. Las condiciones experimentales se describen en la metodología.\* Significancia estadística con P < 0.05.

También como parámetro de integridad mitocondrial, se registró el potencial transmembranal en las mitocondrias de las tres condiciones experimentales. Observamos para las mitocondrias control y reperfundidas mas el inhibidor (Rth360) que el potencial transmembranal ( $\Delta\Psi$ ) se mantiene aún después de agregar 15µM de CaCl<sub>2</sub>, pero en ambos casos el  $\Delta\Psi$  es sensible al desacoplante CCCP. En el caso de las mitocondrias reperfundidas sin el inhibidor se observa la pérdida del potencial al suplementar el medio con 15µM de calcio, lo que sugiere mayor susceptibilidad a Ca<sup>2+</sup> de las mitocondrias aisladas de ventrículo reperfundido.

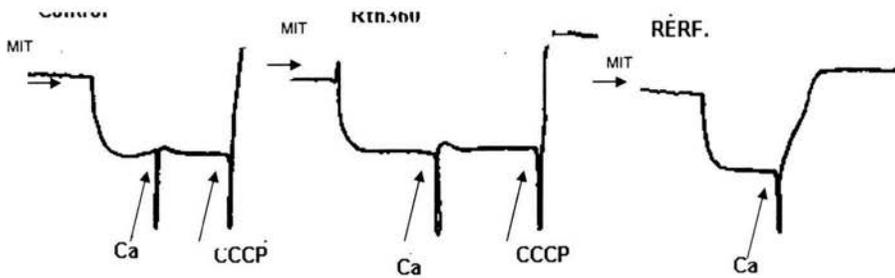


Figura 2. Potencial transmembranal evaluado por técnicas fluorométricas de las mitocondrias (MIT) de las tres condiciones experimentales; mitocondrias controles (Control), de ventrículo sometido a reperusión más el inhibidor (RPF. Rth360) y sometido a reperusión sin el tratamiento (RERF). El efecto de  $15\mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$  (Ca) y el desacoplante (CCCP). Las condiciones experimentales se describen en la metodología.

### 5.- Efecto del Rth<sub>360</sub> en el transporte de $\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial después de la reperusión post-isquémica.

En la Figura 3 se observa el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en mitocondrias aisladas a partir de un ventrículo control, de uno sometido a reperusión y reperfundido previo tratamiento con el inhibidor (Rth360). El transporte en las mitocondrias controles describe una hipérbola rectangular que no muestra diferencia significativa con el transporte de mitocondrias que se trataron con el inhibidor. Por otro lado en mitocondrias no tratadas con el complejo de rutenio se observa una disminución en el transporte del 70%. Si a estas mitocondrias se les administra Ciclosporina A (CSA), que es un inhibidor del poro inespecífico asociado a la membrana interna mitocondrial, el transporte aumenta al doble (Fig 4) por lo que se sugiere que esta disminución en el transporte podría deberse a la transición de la permeabilidad mitocondrial. También se evaluó el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  bajo condiciones fisiológicas de sobrecarga de calcio ( $10\mu\text{M}$ ) en mitocondrias controles y en mitocondrias obtenidas de ventrículo reperfundido más Rth<sub>360</sub>. (Fig. 5) Identificamos una ligera disminución (18%) en el transporte de calcio. Los puntos se expresan como media  $\pm$  desviación estándar y la significancia estadística (\*) se obtuvo con la prueba de

ANOVA. Los parámetros no lineales en la comparación de curvas, también describen ligeras diferencias después de una regresión no lineal y una prueba t-student.

#### **6.- Acumulación de $^{103}\text{Rth}_{360}$ en diferentes fracciones celulares**

Para evaluar la fracción que une al rutenio en forma específica se perfundió un corazón con el inhibidor marcado radiactivamente y se aislaron las fracciones celulares: fracción microsomal (retículo sarcoplásmico), mitocondrial y citosólica. En la tabla 5 se observan las concentraciones del inhibidor asociadas a cada fracción; observamos que la fracción microsomal une aproximadamente 30 veces más  $\text{Rth}_{360}$  que la mitocondrial. Para verificar la pureza de las fracciones se midieron enzimas marcadoras de mitocondrias (Citocromo C) y retículo sarcoplásmico (glucosa 6 fosfatasa) (Fig 6). Observamos que la fracción mitocondrial presenta 10 veces más actividad de TMPD oxidasa que de Glucosa 6 fosfatasa, en la fracción microsomal se observa solo una cuarta parte de actividad de TMPD oxidasa y aproximadamente 7 veces más de actividad de glucosa 6 fosfatasa que en la fracción mitocondrial. En la fracción citosólica se observan porcentajes bajos de actividad para las dos enzimas, lo que indica que nuestras fracciones tiene un grado de pureza aceptable.

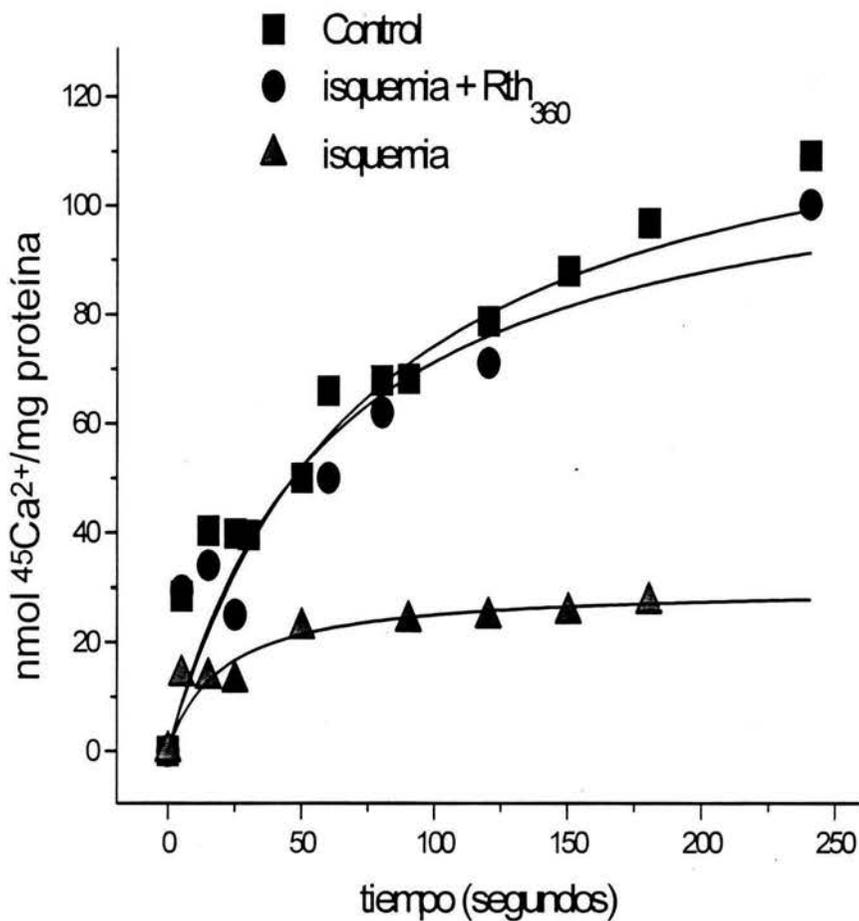


Fig 3. Transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en mitocondrias. El transporte se midió por técnicas de filtración en medio estándar con  $50 \mu\text{M}$  de  $^{45}\text{CaCl}_2$ , pH 7.4. Temperatura 25 grados C.

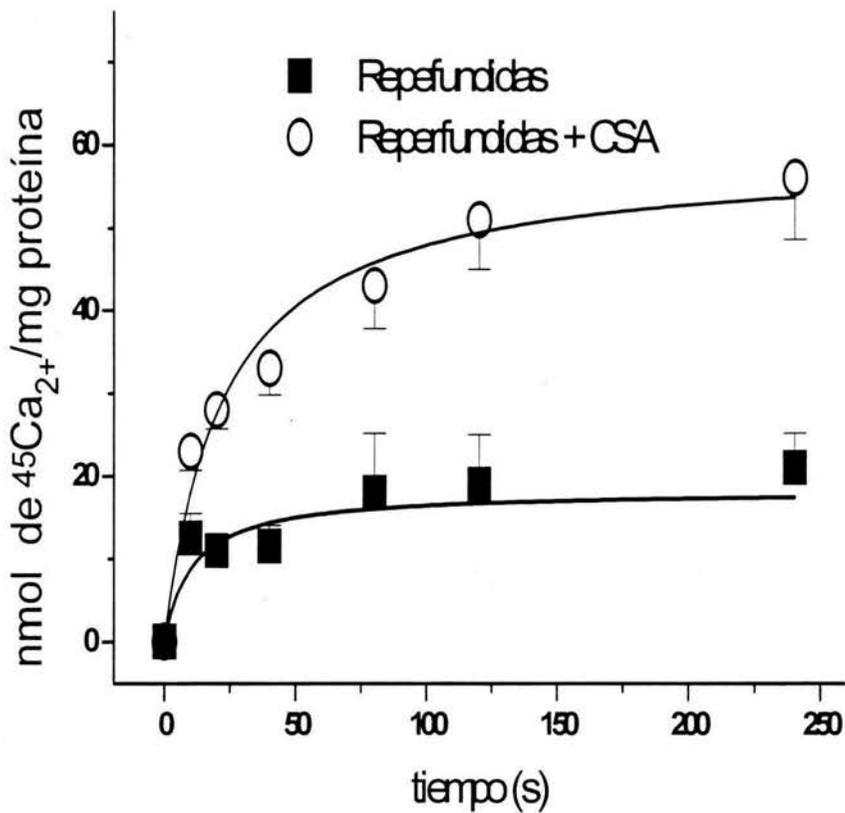


Fig 4. Transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en mitocondrias aisladas de un ventrículo sometido a reperfusión en presencia de  $0.5 \mu\text{M}$  de Ciclosporina A. El transporte se midió por medio de técnicas de filtración en medio estándar con  $50 \mu\text{M}$  de  $^{45}\text{CaCl}_2$  como se describe en la sección de métodos.

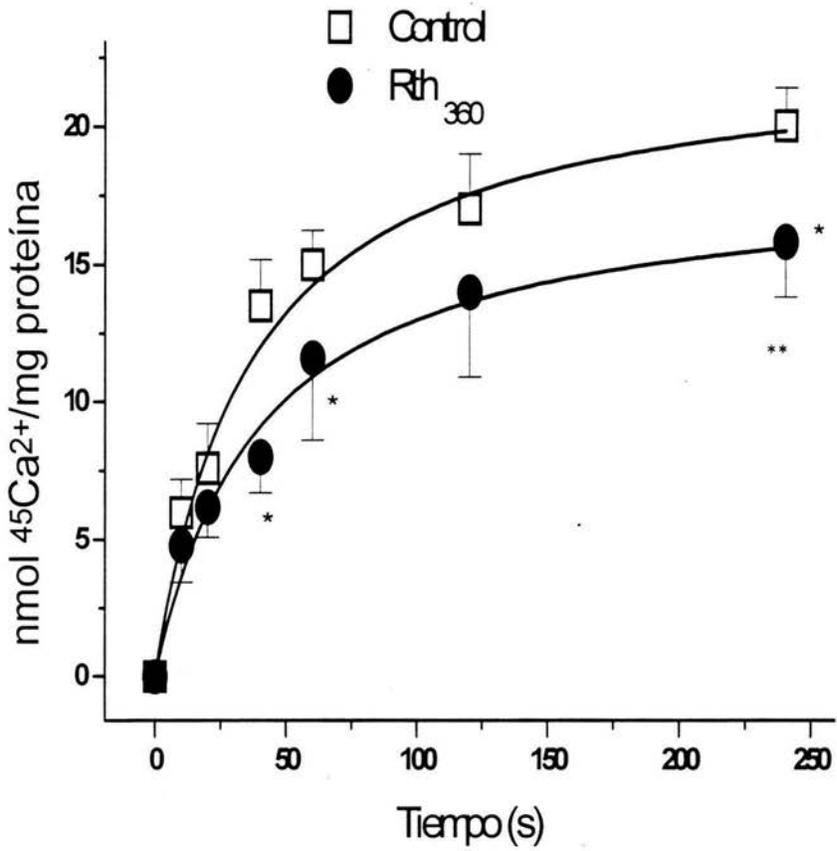


Fig 5. Transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en mitocondrias Control y reperfundidas + Rth360. el transporte se midió por medio de técnicas de filtración en un medio con  $10 \mu\text{M}$  de  $^{45}\text{CaCl}_2$ . \* Significancia estadística con una prueba de ANOVA con una  $P < .05$ . \*\* Significancia estadística con una prueba t-student.

---

## Fracción celular

---

Mitocondrial	$.397 \pm .14$	pmoles de $^{103}\text{Rth}_{360}/\text{mg}$
Microsomal	$18.3 \pm 8.5$	pmoles de $^{103}\text{Rth}_{360}/\text{mg}$
Citosólica	$1.3 \pm .26$	pmoles de $^{103}\text{Rth}_{360}/\text{mg}$

---

Tabla 5. Unión de  $^{103}\text{Rth}_{360}$  marcado radiactivamente en diversas fracciones celulares.

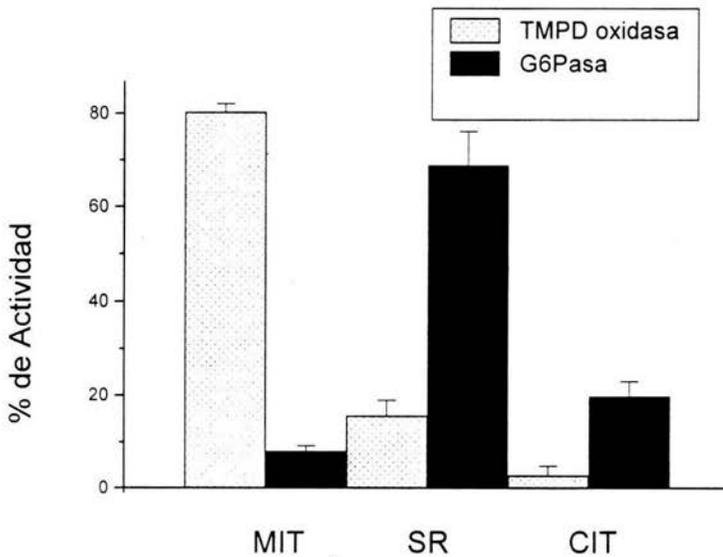


Fig.6. Actividad de TMP oxidasa y glucosa 6 fosfatasa (G6Pasa) en diferentes fracciones subcelulares: MIT (fracción mitocondrial); SR (fracción microsomal) y CIT (fracción citosólica de corazón de rata).

## Discusión

Las células musculares cardíacas pueden excitarse para producir un potencial de acción. El potencial de acción se debe a flujo iónicos a través de la membrana. La primera manifestación del potencial de acción es la depolarización que se debe a canales proteicos sensibles a voltaje que cambiando de conformación hacen la membrana permeable a  $\text{Na}^+$ . El  $\text{Na}^+$  que se encuentra en mayor concentración extracelular entra hasta alcanzar su potencial de equilibrio; después la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por medio de canales dependientes de voltaje mantiene el potencial alrededor de 90 y 120 mV. La salida de  $\text{K}^+$  de la células se manifiesta en el potencial de acción como la repolarización. El proceso mediante el cual la depolarización por medio de señales manifiesta una contracción se conoce como acoplamiento contracción-excitación (Bers, 2002). El rojo de ruteno actúa en la función contráctil produciendo ionotropismo negativo (Grupta et al. 1988), sugiriendo interacción con la membrana plasmática o sarcolema por medio de residuos de ácido siálico (Dorresscheidt-Katter, 1979, Limas 1977) o por la interacción con receptáculos de  $\text{Ca}^{2+}$  (Miyamoto y Racker. 1982; Smith et al. 1985) que disminuyen la disponibilidad de  $\text{Ca}^{2+}$  para la contracción. La contracción se inicia con el enlazamiento de troponina C dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . En el músculo en reposo, la troponina I se encuentra fuertemente unida a la actina, la tropomiosina cubre los sitios en donde la cabeza de miosina enlaza a la actina. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la depolarización en el potencial de acción por medio de los receptores a dehidropiridinas (Verapamil) desencadena liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (Fabiato. 1980) por medio del canal receptor a Rianodina (RyR)(Messneir, 1997). La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de retículo es modulada por una serie de factores que incluye la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el lumen del retículo,  $\text{Mg}^{2+}$ , ATP, el potencial redox citoplásmico y algunas proteínas auxiliares como Calmodulina y la de unión proteínas cinasas (Meissnes y Henderson 1987, Reddy et al., 1996). Al aumentar la concentración del catión se fija a la

troponina C, lo que permite el movimiento lateral de la troponina; este movimiento descubre los sitios para el enlace de las cabezas de miosina y tiene lugar la hidrólisis de ATP y la contracción. El retículo sarcoplásmico inicia la reacumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  por medio de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  y el intercambiado  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Inter sarcolermal y en condiciones de sobrecarga la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria. Una vez que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  disminuye lo suficiente, cesa la interacción entre la miosina y la actina y el músculo se relaja.

El rojo de rutenio ha manifestado interacción con diversos componentes del sistema contracción-excitación por ello podemos pensar que el complejo dinuclear puede también actuar a diferentes niveles.

El rojo de rutenio presenta fuerte interacción con vesículas de sarcolema, que disminuye significativamente con la extracción de lípidos membranales, el ATP reduce marcadamente su afinidad por las membranas. El colorante rojo de rutenio inhibe en 90% la asociación de  $\text{Ca}^{2+}$  con el sarcolema y tiene efecto inhibitorio en la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  sarcolermal, dicha inhibición disminuye al incrementar la concentración de ATP al medio (Madeira y Madeira, 1974).

Kargari y colaboradores, en 1998 por medio de estudios de fluorescencia han observado que el rojo de rutenio provoca una disminución significativa en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en vesículas de retículo sarcoplásmico en manera dependiente de la dosis; en este sentido Alves y de Meis encontraron que el colorante inhibe la reversibilidad de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  en retículo por Pi y ADP. Sin embargo el grupo de Moutin (1992) observó que el inhibidor interactúa con algunos sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  sin observar efecto en la velocidad inicial de internalización de catión a las vesículas. A concentraciones de 1nM a 20 $\mu\text{M}$  se sabe que en músculo estriado y liso, el rojo de rutenio aumenta la velocidad de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  (Howell 1982; Kanmura et al. 1989; Vale y Carvalho 1973. ).

**IZT.**

El rojo de rutenio es uno de los más potentes inhibidores de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en retículo sarcoplásmico. Cuando se mide la unión de [ $^3\text{H}$ ]rianodina en presencia de rutenio, la unión máxima disminuye y la constante de afinidad aumenta (Chu et al. 1990) manifestando interacción



con este canal. Camberlain y colaboradores demostraron en 1984 que el rojo de rutenio bloquea el canal liberador de  $\text{Ca}^{2+}$  en retículo (RyR) uniéndose en forma dependiente de voltaje a múltiples sitios en el conducto de canal. La administración del análogo del rojo de rutenio ( $\text{Rth}_{360}$ ) puede actuar a este nivel, inhibiendo el canal liberador de  $\text{Ca}^{2+}$  en retículo, evitando el aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y evitando la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial. Esta sobrecarga juega un papel crucial en el daño por reperfusión, sin embargo, la inhibición de los canales de RyR evitaría el fenómeno de contracción (situación que no se presenta). En 1999, Xu y colaboradores, intentaron clarificar el tipo de inhibición que sufre el canal RyR por el rojo de rutenio. Sus resultados demuestran, que a concentraciones fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, el colorante no puede inhibir al receptor; pero en condiciones de sobrecarga  $10\text{-}50\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  libre el rojo de rutenio inhibe a los receptores  $\text{RyR}_2$  presentes en el corazón, esta observación fue interpretada como un cambio conformacional en la estructura del canal dependiente de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre citosólico.

A través de los años el rojo de rutenio se ha utilizado para proteger al miocardio en el daño de isquémica - hipoxia y reperfusión (Ferrari et al. 1982; Smith 1980, Peng et al. 1980, Lerch y Benzi, 1993); sin embargo, no existe información disponible en la literatura sobre el efecto de un análogo de rojo de rutenio como el  $\text{Rth}_{360}$ . Los resultados de este estudio indican que el  $\text{Rth}_{360}$  efectivamente protege el miocardio tras la reperfusión post- isquémica evitando la aparición de arritmias post- reperfusión, disminuyendo el daño tisular, manteniendo la actividad fosforilante en las mitocondrias y evitando la aparición de la transición de la permeabilidad mitocondrial.

El rojo de rutenio permea pobremente a través de las membranas celulares (Baux et al. 1979, Kawamura y Yabu 1978; Lufth 1971) y la penetración de este inhibidor se ha asociado a daño en la membrana plasmática (Babai, 1978; Baldiwin 1977). Sin embargo Forges y Speralakis (1979) demostraron la presencia de rojo de rutenio en mioplasma de células cardíacas después de algunos minutos de exposición a este agente. La penetración a músculo esquelético (Forbes y Sperelakis 1979; Howell 1974), músculo liso (Kawamura y Yabu 1978) y células

nerviosas es todavía más lenta (Singer et al. 1972). El principal impedimento para el ingreso del rojo de rutenio a las células es su carga, sin embargo el complejo dinuclear de rutenio ( $Rth_{360}$ ) tiene una carga mas deslocalizada y se ha reportado que es permeable en cardiocitos (Matlib,1998).

La inhibición de  $Rth_{360}$  sobre el uniportador de  $Ca^{2+}$  mitocondrial ha sido reportado por diversos grupos, convirtiendo a este análogo del rojo de rutenio en el más específico y potente inhibidor del uniportador (Ying et al. 1991. Zazueta et al. 1999). Durante la sobrecarga de  $Ca^{2+}$  en la reperusión post-isquémica, la concentración de  $Ca^{2+}$  mitocondrial aumenta vía el uniportador de  $Ca^{2+}$  (Grover et al. 1990), nuestros resultados sugieren que al estar inhibido evitaría la sobrecarga de calcio mitocondrial que promueve la permeabilidad no selectiva de la intermembrana, evitando así la liberación de citocromo C y la vía de señalización apoptótica. Hemos observado que las mitocondrias aisladas de ventrículo sometido a reperusión presentan una disminución significativa en el transporte de calcio, sugiriendo la apertura del poro de la transición, el calcio es liberado de la mitocondria, generando ciclos fútiles de liberación y recaptura de  $Ca^{2+}$  (Gunter y Pfeiffer,1990). Al agregar la CSA, un conocido inhibidor del poro de la transición (Founier et al. 1987), la entrada de calcio aumenta más del doble; lo que nos sugiere que el daño en estas mitocondrias se debe en parte a la apertura del poro inespecífico sensible a CSA. Si al administrar  $Rth_{360}$  se evita la sobrecarga mitocondrial de  $Ca^{2+}$ , podría disminuir la liberación de citocromo C apoptogénico, evitando la asociación de VDAC, Bax y otras proteínas proapoptóticas presentes en el daño por reperusión (Cai, et al. 1998, Doran y Halestrap, 2000 Jones, 1995 Kroemer, 1997, Jacobson, 1997, Reed 1997).

Nuevas técnicas de microscopia especializadas en células vivas han revelado un retículo continuo interconectado con mitocondrias y asociado con retículo sarcoplásmico (Bakeeva et al.1978. Mannella et al.1998. Rizzuto et al. 1993), lo que sugiere la participación de esta asociación en la señalización y control de la homeostasis del  $Ca^{2+}$  celular (Duchen et al.1998, Rizzuto et al. 1993).

Si la tan cercana relación entre los canales liberadores de  $\text{Ca}^{2+}$  en retículo y los de entrada en la mitocondria, constituyen un microdominio que censa los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ , el sitio de inhibición del rojo de rutenio y su análogo más específico  $\text{Rth}_{360}$  se encontraría en este lugar y parte del mecanismo de protección de este compuesto podría involucrar al "retículo mitocondrial" (MR).

En este sentido Beurtner et al. por medio de microscopia electrónica y western blot ha identificado en la membrana interna mitocondrial un RyR que sugieren pudiera ser el uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial. Diversos grupos han tratado de purificar este transportador (Evtodienko, 1971; Lenhinger, 1971, Gómez-Puyou et al. 1972; Sottocassa, 1974, Mirova et al, 1982, Crompton et al. 1976, Zazueta et al. 1998). Se ha sugerido que pudiera estar constituido por más de un componente, y que podría tener una subunidad regulatoria de 18 kDa (Zazueta et al. 1994)

El complejo  $\mu$ -(oxo) bis(trans-formato tetramonio de rutenio)  $\text{Rth}_{360}$  es un herramienta poderosa para la purificación del uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial y aunque Matlib et al. (1998) observaron que este inhibidor no tiene efecto sobre otros movimientos de  $\text{Ca}^{2+}$ , por ejemplo sobre los canales lentos dependientes de voltaje, RyR en retículo sarcoplásmico, nuestros resultados muestran que este complejo, en mitocondrias aisladas tiene una alta afinidad por el uniportador (5 pmol/ mg de proteína) y no se asocia a otras proteínas; sin embargo en la célula cardiaca puede presentar afinidad por otros componentes y por ello el mecanismo de protección en la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la reperusión podría involucrar más sitios que solo el uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial.

## Conclusiones

-La administración de Rth<sub>360</sub> mantiene la función contráctil del corazón durante la reperfusión post-isquémica, evita la aparición de arritmias y disminuye el daño tisular.

-El Rth<sub>360</sub> conserva la integridad mitocondrial después de sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> en la reperfusión post-isquémica.

-Los resultados sugieren que la protección del rutenio 360, involucran el sistema de transporte de calcio mitocondrial, sin embargo, la unión específica del rutenio marcado identifica a la fracción microsomal (retículo sarcoplásmico y sarcolema) como sitios de más alta afinidad que podría indirectamente disminuir la sobrecarga de calcio. Por ello se debe medir el efecto del compuesto sobre estos sistemas.

## Referencias

1. Alves E.W. y de Meis L. 1986. *J. Biol. Chem.* 261:16854-165859.
2. Bakeeva L.E., et al. 1978. *Biochim Biophys Acta.* 501: 349-369.
3. Benzi R.H, Lerch R. 1992. *Circ. Res.* 71:567-576.
4. Beutner G., Sharma V.K., Giavannucci D., Yule I. Sheu S-S.2001. *J. Biol. Chem.* 276:21482-21488.
5. Cai J., Yang J., Jones D. P.1998. *Biochim Biophys Acta.* 1399 :139-149.
6. Crompton M., Capano M., Carafoli E. 1976. *Eur. J. Biochem.* 69 :453-462.
7. Chamberlain B.K., Volpe P. Fleischer S. 1984. *J.Biol Chem.* 259:7547-7556.
8. Doran E. y Halestrap P.2000. *Biochem J.* 348:343-350.
9. Duchen M.R., et al. 1998. *J. Cell. Biol.* 142 : 975-988.
10. Evtodienko Y., Azarashvili T., Kudin A. 1971. *FEBS lett.* 423 : 45-48.
11. Fournier N., Ducent G., Crevant A. 1987.*J. Bioenerg Biomembr.* 17 :297-303.
12. Furberg D. 1984. *Am J Cardiol.* 53:626-627.
13. Goldberg S., Greenspon J., Urban P. 1983. *Am Heart J.*105:26-32.
14. Gómez-Puyou A., Tuena de Gómez-Poyou M., Becker G., Lehninger A. 1972. *Biochem Biophys Res Commun* 47 :814-819.
15. Hearse D.J. 1977. *J Mol Cell Cardiol.* 9:607-621
16. Hearse D.J.1984. En Opie LH. ed. *Calcium antagonist and cardiovascular disease.* N Y. Raven Press,129-145.
17. Howell J.N. 1982. *Membr. Biochem.* 4:235-245.
18. Jennings R.B., Reimer K.A., Steembergen C. 1986 *J. Mol Cell Cardiol* 18:769-780.
19. Kanmura Y., Raeymaekers L., Casteels R.1989. *Cell Calcium.* 10:433-439.
20. Kargacin G.J., Ali Z., Kargacin M.E. 1998. *Eur J Physiol.* 436:338-342.
21. Lenhinguier A. 1971. *Biochem Biophys Res. Commun.* 42 :312-318.

22. Lerch R. 1993. *Basic Res Cardiol.* 88:525-544.
23. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
24. Madeira V. M. C. y Antunes-Madeira M. C. 1974. *J. Membrane Biol.* 17:41-50.
25. Maltib M.A., Zhou, Z., Knigth S., Ahmed S., Choi K., Krause J., Phillips R. Altshuld R., Katsube Y., Sperelakis N y Bers D. 1998 *J. Biol.. Chem.* 273:17 1023-1031.
26. Mannella C.A., et al. 1998. *Biofactors.* 8 :225-228.
27. Manning A.S., Hearse D.J. 1984. *J Mol Cell Cardiol.* 16:497-518.
28. Marcel E., Bolli R. 1994. *Ann NY Acad Sci;* 723:218-228
29. McCormack J., Halestrap A., Denton R. 1990. *Physiol. Rev.* 70: 391-425.
30. Meissner G. y Henderson J.S. 197. *J Biol. Chem.* 262:3065-3073.
31. Mirova G., Sirota T., Pronevich L., Trofimenko N., Mironov G., Grigorjrv P., Kondrashova M. 1982. *J. Bioenerg. Biomembr.* 213 :225.
32. Moreno-Sánchez R. 1985. *J. Biochim Biophys Acta.* 724:278-285.
33. Moreno-Sanchez. R. y Hansford, R. 1988. *Biochem. J.* 256:403-412.
34. Moutin M.J., Rapin C., Dupont Y. 1992. *Biochim Biophys Acta.* 1100 :321-328.
35. Nayer V.G. 1981. *Am J Phatol.* 102:262-270.
36. Opie L.H. 1989. *Circulation.* 80:1049-1062.
37. Opie LH. 1976. *Circulation research.* 38( Suplem I):52-74.
38. Peuhkurinen KJ. 2000. *Journal of the International Society for Bioelectromagnetism* 1:2.
39. Pippier H.M. 2000. *Cardiovascular Research* 45:123-127.
40. Poole-Wilson P.A., Harding D.P., Burdillon P.D.V. 1981.
41. Powell, T. Twist A. 1976. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72:327-333
42. Reddy L.G., Jones L.R., Pace R.C., Stokes D.L. 1996. *J. Biol. Chem.* 271:14964-14970.
43. Rentrop K.P., Cohen M., Hosat S.T. 1984. *Am J Cardiol.* 54:21-31.
44. Rizzuto R., Brini M., Murgia M., Pozzan T. 1993. *Science.* 262 :744-747.
45. Rizzuto R., et al. 1998. *Science* 280 : 1766-1766.

46. Stanley W.C., Lopaschuck G.D, McCormack J.G, Hall J.L. 1997. *Cardio. Res.* 33:243-257.
47. Tzivoni D., Keren A., Granot H., Gottlieb S., Benhorin G., Stens S. 1983. *Am Heart J.* 105:323-325.
48. Vale M.G. P y Carvalho A.P. 1973. *Biochim Biophys Acta* 352:29-31.
49. Xu L., Tripathy A., Pasek D.A., Meissner G. 1999. *J. Biol. Chem.* 274:32680-32691.
50. Ying W., Emerson J., Clarke M., y Sandi R. 1991. *Biochemistry.* 30:4949-4952.
51. Zazueta C., Zafra G., Vera G., Sánchez C., Chávez E. 1998. *J. Bioenerg. Biomembr.* 30:489-498.
52. Zazueta C., Massó F., Paez A., Bravo C., Vega A., Montañó L., Vázquez M., Ramírez J., Chávez E. 1994. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26:555-562.