



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

**PARTICIPACIÓN DEL UNIPORTADOR DE CALCIO
MITOCONDRIAL EN EL DAÑO POR REPERFUSIÓN
MIOCÁRDICA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A:

GERARDO DE JESÚS GARCÍA RIVAS

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ANA CECILIA ZAZUETA MENDIZÁBAL

Facultad de Medicina



MÉXICO, D.F.

MARZO, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

La presente tesis se realizó en el laboratorio de la Dra. Ana Cecilia Zazueta Mendizábal en el departamento de bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Gerardo de Jesús

Parada Rivas

FECHA: 31 Marzo 2006

FIRMA: [Firma]

ÍNDICE

I.- Introducción	1
II.- Marco teórico	3
1. Alteraciones metabólicas del miocardio durante la isquemia	3
2. Principales mecanismos del daño por reperfusión	4
2.1 Naturaleza del estrés oxidativo en la isquemia- reperfusión	4
2.2 Daño por sobrecarga de calcio	5
3. Manejo de calcio celular	6
3.1 El transporte del calcio a través de la membrana plasmática	7
3.2 El transporte del calcio a través del retículo sarcoplásmico	8
3.3 El manejo del calcio mitocondrial	9
3.3.1 Mecanismo de entrada de calcio	9
3.3.2 Estructura molecular del UCam.....	11
3.3.3 Salida de calcio y TPm	13
4. Estrategias de cardioprotección	14
4.1 Precondicionamiento isquémico	14
4.2 Modulación de la señalización dependiente de cinasas	17
4.3 Reducción del estrés oxidativo	17
4.4 Tratamiento con fármacos que actúan sobre el calcio intracelular	17
4.5 Inhibición del PTPm	18
III.- Antecedentes	21
IV.-Hipótesis y objetivos	22
V.- Metodología	24
1. Síntesis del Ru ₃₈₀ y ¹⁰³ Ru ₃₈₀	24
PROTOCOLOS UTILIZADOS EN EL CORAZÓN AISLADO	
2. Perfusión del corazón aislado	25
3. Análisis de la integridad mitocondrial	26
3.1 Aislamiento de las mitocondrias	26
3.2 Ensayos de la respiración mitocondrial	26
3.3 Medición del potencial transmembranal	27
3.4 Actividad del Ucam	27
4. Determinación de la actividad de la PDHa	27

5. Contenido de calcio libre y total en mitocondria	28
6. Unión de $^{103}\text{Ru}_{360}$	28
7. Pureza de las fracciones microsomal y mitocondrial	28
8. Transporte de calcio en vesículas de retículo sarcoplásmico	30
8.1 Preparación de VRS	30
8.2 Captación de calcio en VRS	31
8.3 Salida de calcio de VRS	31
8.4 Competencia entre la unión de ^{86}Rb rianodina y los complejos de rutenio en VRS	31
PROTOSOLOS UTILIZADOS EN EL MODELO DE RATA COMPLETA (MODELO <i>IN VIVO</i>)	
9. Inducción de reperfusión <i>in vivo</i>	31
10. Cuantificación de Ru_{360} circulante y unido al tejido cardíaco	33
11. Estadísticas	33
VI.- Resultados	34
VII.- Discusión	54
VIII.- Conclusiones	60
IX.- Perspectivas	61
X.- Referencias	64
XI.- Apéndices	74

Resumen

Los mecanismos descritos para explicar el daño por reperfusión son muy diversos y muchos de ellos están particularmente asociados a la disfunción mitocondrial. Durante la reperfusión, este organelo se transforma en el principal instrumento de daño, generando especies reactivas de oxígeno y amplificando las señales de muerte celular. Al parecer, el mecanismo molecular de esta transformación es la apertura de un poro en la membrana interna mitocondrial, llamado poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial. Una de las condiciones indispensables que promueve la apertura del poro es la sobrecarga de calcio mitocondrial, por ello se han utilizado diversas aproximaciones experimentales con el objetivo de evitarla. En este trabajo se reporta el efecto del complejo dinuclear de rutenio (Ru_{360}), un inhibidor selectivo y potente del uniportador de calcio mitocondrial, en la sobrecarga de calcio mitocondrial de corazones sometidos a reperfusión post-isquémica. Encontramos que en el modelo de corazón aislado después de la isquemia los corazones tratados con Ru_{360} recuperaron el trabajo cardíaco al menos tres veces por arriba, que los no tratados. El tratamiento con Ru_{360} inhibió el transporte de calcio mitocondrial, manteniendo la concentración de calcio mitocondrial a niveles basales, a pesar de la alta concentración de calcio citosólico. Adicionalmente, observamos que la perfusión con Ru_{360} no inhibió los movimientos de calcio en el retículo sarcoplásmico, ni bloqueó al receptor de rianodina, sugiriendo que la inhibición de este canal no participa de manera importante en el efecto protector del Ru_{360} sobre el corazón.

En el modelo *in vivo* de reperfusión, se observó que el tratamiento con Ru_{360} disminuyó la incidencia de arritmias, el daño tisular y mantuvo la capacidad fosforilante de las mitocondrias. Los datos presentados en este trabajo muestran que el principal mecanismo de protección del Ru_{360} durante la reperfusión es la inhibición parcial del uniportador de calcio.

Summary

Many mechanisms describing reperfusion damage has been associated to mitochondrial dysfunction. During reperfusion it has been demonstrated that mitochondrial it is the main instrument of damage generating reactive oxygen species and amplifying cellular death signals. Apparently, the molecular mechanism involved in such transformation is the opening of an unspecific pore in the inner mitochondrial membrane, called the mitochondrial permeability transition pore. As mitochondrial calcium overload is the main inducer of permeability transition, many experimental approaches to inhibit calcium overload has been used. We have studied the effect of an oxygen-bridged dinuclear ruthenium amine complex (Ru_{360}), a selective and potent mitochondrial calcium uniporter blocker, on mitochondrial calcium overload in reperfused rat hearts. This study reports the effect of Ru_{360} in isolated and *in vivo* rat hearts after ischemic-reperfusion injury. Ru_{360} perfusion into isolated hearts subjected to global ischemia promoted a 3-fold recovery of mechanical performance over non-treated hearts. We found that Ru_{360} perfusion partially inhibited the mitochondrial calcium uniporter, maintaining matrix free-calcium concentration at basal levels, in spite of high cytosolic calcium concentration. Additionally, we observed that Ru_{360} did not inhibited Ca^{2+} cycling in the sarcoplasmic reticulum nor blocked ryanodine receptors, implying that inhibition of this channel do not explain the protective effect of Ru_{360} in isolated hearts. In the whole animal model, Ru_{360} completely abolished post-reperfusion arrhythmias, diminished tissular damage and maintained the phosphorylating capacity in mitochondria. This data demonstrated that the main protection mechanism of Ru_{360} on reperfusion injury is by direct attenuation of calcium mitochondrial transport.

ABREVIATURAS

[³ H]DOG	[³ H] 2-deoxiglucosa
[Ca ²⁺] _c	Concentración de calcio citosólico
[Ca ²⁺] _m	Concentración de calcio mitocondrial
·O ₂	Radical superóxido
·OH	Radical hidroxilo
³¹ P NMR	Resonancia magnética nuclear
5-HD	5-hidroxicanoato
ADP	Difosfato de adenosina
ADP/O	Relación entre producción de ATP y estado 3 de la respiración
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Trifosfato de adenosina
CADV	Canal aniónico dependiente de voltaje (porina)
CCCP	Cabonil metacloruro cianuro fenil hidrazona
CK	Creatina cinasa
CoA	Coenzima A
CR	Control respiratorio
CSA	Ciclosporina A
CyP-D	Ciclofilina D
DTT	Ditiotreitol
ECG	Electrocardiograma
EDTA	Ácido etilen diamino tetraácetico
EGTA	Ácido etilen glicol β bis aminoetil éter tetraácetico
FC	Frecuencia cardíaca
FV	Fibrilación ventricular
G6P	Glucosa 6-fosfato
HEPES	Hidroximetil piperazina etano sulfonato
HK	Hexocinasa
I/R	Grupo isquémico-reperfundido
I/R+Ru ₃₆₀	Grupo isquémico-reperfundido tratado previamente con Ru ₃₆₀
ICP-OES	Espectroscopía de emisión óptica-inductivamente acoplada a plasma
IN/C	Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺
K-H	Medio Krebs-Henseleit
LDH	Lactato deshidrogenasa
mIF	Mitocondrias interfibrilares
mSL	Mitocondrias subsarcolemales

mitK _{ATP}	Canal mitocondrial de potasio sensible a ATP
NAD ⁺	Dinucleótido de adenina y niacina oxidado
NADH	Dinucleótido de adenina y niacina reducido
NADPH	Dinucleótido de adenina y niacina fosfato oxidado
OG	Octil guanidina
PCI	Precondicionamiento isquémico
PDHa	Forma activa de la piruvato deshidrogenasa
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PLB	Fosfolambán
PKA	Proteína cinasa A
PTPm	Poros de la transición de la permeabilidad mitocondrial
RBD	Receptor de benzodiazepina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RR	Rojo de rutenio
RRFen	Rojo de rutenio con sustituyentes de fenantrolina
RS	Retículo sarcoplásmico
Ru ₃₆₀	Complejo dinuclear de rutenio ((μ-O){(HCO ₂)(NH ₃)Ru} ₂ Cl ₃)
RyR	Receptor de rianodina
SERCA	ATPasa de calcio de retículo endo/sarcoplásmico
SFA	Sangliferina A
SOD	Superóxido dismutasa
TAN	Translocador de adenín nucleótidos
TCA	Ácido tricloro acético
TMPD	Tetrametil fenilendiamina
TPm	Transición de la permeabilidad mitocondrial
TPP	Pirofosfato de tiamina
Tris	Tris-hidroxi metil amino metano
TV	Taquicardia ventricular
UCam	Uniportador de calcio mitocondrial
VRS	Vesículas de retículo sarcoplásmico
Δφ	Potencial transmembranal

1.- INTRODUCCIÓN

Según el reporte de la Organización Mundial de la Salud en 2003, más de 15 millones de personas mueren cada año por enfermedades del corazón, la mayor parte con diagnóstico de infarto del miocardio. En México, estas enfermedades constituyen la primera causa de muerte y anualmente ocurren cerca de 70,000 defunciones por este motivo. Las enfermedades producidas por una disminución en la irrigación sanguínea (enfermedades isquémicas) son la primera causa de mortalidad general, con una incidencia mayor en hombres que en mujeres; de 44,070 muertes por enfermedad isquémica del corazón, 24,105 fueron varones y 19,965 mujeres (1).

La pérdida de equilibrio entre el aporte de oxígeno al miocardio (riego coronario) y la demanda de este tejido (consumo de oxígeno miocárdico) produce la patología isquémica, que puede manifestarse en forma aguda —como sucede en el infarto del miocardio, angina inestable o muerte súbita— o bien puede manifestarse como un padecimiento crónico, como la angina de pecho estable. La consecuencia más obvia de la isquemia miocárdica es la pérdida transitoria de la función contráctil, que puede ser irreversible si la isquemia persiste o si se desarrolla un infarto miocárdico.

La única estrategia que ha demostrado realmente reducir el tamaño del miocardio infartado, es la reperfusión arterial coronaria, mediante el uso de terapia fibrinolítica, de angioplastia coronaria, la colocación de puentes arteriales o la administración de soluciones cardiopléjicas, por citar algunos ejemplos. Paradójicamente, se ha demostrado que el restablecimiento del flujo coronario durante la reperfusión puede producir efectos dañinos adicionales sobre el miocardio isquémico (2).

En la clínica, el daño por reperfusión se manifiesta en la reducción de la fuerza contráctil, fenómeno conocido como "aturdimiento miocárdico". Este padecimiento se caracteriza por una disminución significativa en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo. Aunque dicha condición generalmente es transitoria, puede poner en riesgo la restauración del flujo coronario. Adicionalmente, después de la terapia trombolítica o de una cirugía cardíaca se pueden presentar arritmias, que se ha sugerido pueden ser las responsables de la muerte súbita del paciente (3).

Los mecanismos descritos para explicar el daño por reperfusión son muy diversos: la pérdida de energía, la alteración de la homeostasis iónica y la generación de radicales libres de oxígeno; dichos eventos están particularmente asociados a la disfunción mitocondrial (4). Este organelo se transforma en el principal instrumento de daño generando especies reactivas de oxígeno (ERO) y amplificando las señales de muerte celular durante la reperfusión (5). Al parecer, el mecanismo molecular de esta transformación es la apertura de un poro en la

INTRODUCCIÓN

membrana interna mitocondrial, que permite la salida inespecífica de iones, proteínas y metabolitos de la mitocondria hacia el citosol. La pérdida de permeabilidad selectiva en la mitocondria contribuye al desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y a partir de ello a una dramática disminución en la síntesis del ATP (6).

II.-MARCO TEÓRICO

1. Alteraciones metabólicas del miocardio durante la isquemia.

El sistema cardiovascular depende de complejas interacciones mecánicas, hemodinámicas y metabólicas que en conjunto garantizan su función: proporcionar oxígeno, nutrientes y otras moléculas esenciales a diferentes órganos y tejidos y a la vez acarrear productos de desecho a los órganos responsables para su eliminación. En este sistema, el corazón es una bomba altamente especializada que se encarga del movimiento de la sangre, cuya función es absolutamente dependiente del flujo coronario (7). Durante condiciones normales de reposo, el corazón utiliza aproximadamente 75% del oxígeno aportado por la circulación coronaria, mientras que en condiciones hipóxicas su función es muy limitada y cuando se interrumpe el flujo sanguíneo el tejido miocárdico deja de latir. La dependencia del proceso contráctil por el oxígeno, se debe a que la actividad de ATPasa de la miosina requiere el 75% de la producción energética del miocardio, que es soportada exclusivamente a través de la fosforilación oxidativa mitocondrial (8). Esto indica que la función cardíaca es muy sensible al estado funcional mitocondrial.

La oclusión súbita de una arteria epicárdica deriva en cambios fisiológicos y metabólicos que aparecen en el miocardio segundos después de haber sido interrumpido el flujo sanguíneo. En 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 afectan seriamente. El metabolismo aeróbico cambia a glicolítico disminuyendo drásticamente los niveles de fosfatos de alta energía (9). El aumento en la glicólisis, favorece la acumulación de lactato y su protón asociado, produciendo acidosis intracelular. Después de sólo 10 minutos de isquemia, el pH intracelular desciende de 7.4 a cerca de 5.9 (10). En la isquemia global de un corazón aislado, bastan 40 minutos para que la acumulación de protones y lactato inhiban la glicólisis y la producción de energía anaeróbica, generando un daño irreversible(11). En condiciones de isquemia prolongada, el potencial transmembranal dependiente de energía se pierde, ocasionando la salida de potasio y de magnesio de la célula y permitiendo la acumulación de sodio y de calcio intracelular, a favor de su gradiente de concentración. Experimentalmente se ha demostrado que la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_c$) aumenta durante la isquemia y se ha propuesto que esto ocurre a través de un mecanismo que involucra al intercambiador Na^+/Ca^{2+} (IN/C): la estimulación glicolítica en la isquemia, permite la acumulación de protones que se intercambian por sodio con la estequiometría $2Na^+/3H^+$, a través de un intercambiador de la membrana plasmática (12). El aumento en la concentración de sodio intracelular favorece su intercambio electroneutro por calcio, a través del intercambiador $3Na^+/Ca^{2+}$ sensible a 2-[4-[(2,5-difluorofenil)metoxi]fenoxi]-5-etoxianilina (SEA0400) (13). A pesar del aumento de $[Ca^{2+}]_c$ durante la isquemia, la concentración de calcio mitocondrial ($[Ca^{2+}]_m$) no aumenta significativamente, pues la falta de oxígeno colapsa

el potencial transmembranal y por ello, como revisaremos posteriormente, se limita significativamente la entrada de calcio a la mitocondria (14).

La redistribución electrolítica produce cambios osmóticos y edema celular; adicionalmente se activan las enzimas lisosomales produciendo autólisis. La debacle energética en la isquemia en conjunto con los mecanismos anteriormente mencionados puede llevar al tejido miocárdico a la muerte por necrosis.

2. Principales mecanismos del daño por reperfusión.

Con lo anteriormente mencionado, es claro que el miocardio isquémico no puede recuperarse sin la restitución del flujo coronario. La única intervención que ha demostrado realmente reducir el tamaño del miocardio infartado, es la reperfusión arterial coronaria; sin embargo, este procedimiento no es necesariamente benéfico pues se ha reportado que en algunos casos puede acelerar y aumentar el daño por la isquemia (15, 2).

Se han señalado diversos mecanismos como los responsables de este daño adicional, sin embargo el estrés oxidativo y la sobrecarga de calcio se reconocen como los más importantes.

2.1 Naturaleza del estrés oxidativo en la isquemia- reperfusión.

Durante la respiración normal, de 2 a 4% del flujo electrones se fuga a través de la cadena respiratoria, generando especies de oxígeno parcialmente reducidas, particularmente radicales superóxido ($\cdot\text{O}_2$). Los sitios donde se acumulan y fugan electrones durante la respiración normal, al parecer son también las principales fuentes de la producción de ERO en estados patológicos como la isquemia-reperfusión (16). Se ha demostrado que la NADH-ubiquinona oxidoreductasa y la ubiquinol-citocromo c oxidoreductasa de la cadena respiratoria mitocondrial, generan $\cdot\text{O}_2$. (17). Durante la isquemia, el contenido de NADH y FADH aumenta, y el transporte de los electrones disminuye, lo que favorece la fuga de electrones durante los primeros momentos de la reintroducción de oxígeno a las células. Por ello en la reperfusión, la mitocondria aumenta la producción de ERO que induce un daño adicional al miocardio (18,19). Además, durante la reperfusión la reacción catalizada por la xantina deshidrogenasa/oxidasa se convierte en otra fuente generadora de $\cdot\text{O}_2$. Esta enzima, que convierte a la hipoxantina en xantina y la xantina en ácido úrico, se encuentra en las células endoteliales principalmente como deshidrogenasa, utilizando al NAD^+ como aceptor de electrones:



Al parecer durante la isquemia, esta enzima -en un proceso que involucra proteasas dependientes de calcio- favorece su forma de oxidasa, que reduce al oxígeno a $\cdot\text{O}_2$ (20).



En los tejidos isquémicos, la hipoxantina se acumula como producto de la degradación de nucleótidos de adenosina, por lo que durante la reoxigenación se favorece la actividad de la xantina oxidasa (21). El papel de esta enzima en el daño oxidativo por reperfusión ha sido estudiado por medio de su inhibidor más clásico: el allopurinol. La perfusión con este compuesto disminuye la producción de $\cdot\text{O}_2$ durante la reoxigenación, en correlación con la inhibición de la xantina oxidasa (22). Otra fuente productora de ERO son los neutrófilos, que se acumulan en los sitios de daño y a través de la NADPH oxidasa liberan radicales $\cdot\text{O}_2$. El reclutamiento de neutrófilos en la zona reperfundida del miocardio, es regulado aparentemente por células endoteliales, a través de la expresión de moléculas de adhesión en la superficie celular (23). Estas moléculas de adhesión en el endotelio también permiten el reclutamiento plaquetario que produce por su lado, grandes cantidades de $\cdot\text{O}_2$ durante la reoxigenación (24). El aumento en la generación de ERO durante la reperfusión a través de estos y otros mecanismos da lugar a la oxidación de proteínas, lípidos membranales y DNA, superando la protección de los sistemas antioxidantes de la célula (i.e. superóxido dismutasa dependiente de Mg^{2+} , catalasa y sistema redox del glutatión). Un esquema del metabolismo de las ERO en el miocardio reperfundido se presenta en la Figura 1.

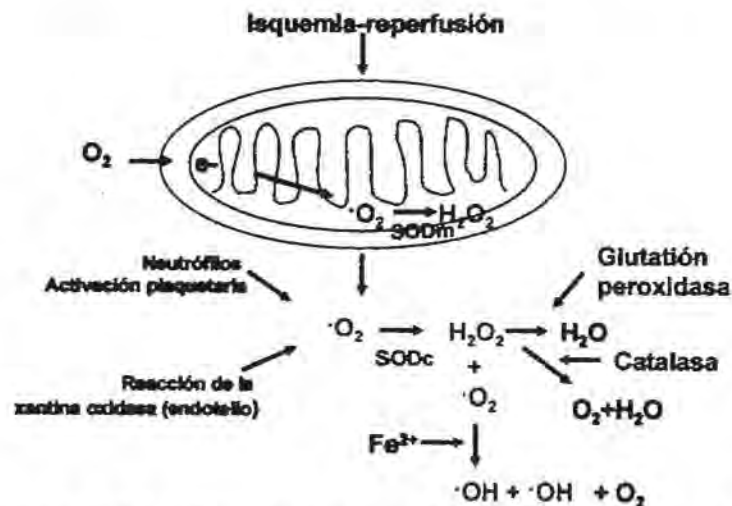


Figura 1. Esquema general de la formación de radicales libres. Durante la isquemia, diversos componentes de la cadena respiratoria mitocondrial se encuentran reducidos, generando las condiciones ideales para la formación de $\cdot\text{O}_2$. La superóxido dismutasa (SOD) citosólica y mitocondrial cataliza la eliminación de estos radicales produciendo H_2O_2 que puede ser eliminada por el sistema antioxidante de la glutatión peroxidasa y la catalasa; si estos sistemas de eliminación fallan, la reacción de Fenton catalizada por Fe^{2+} , genera el radical $\cdot\text{OH}$ que es muy reactivo. Adicionalmente la activación plaquetaria y de neutrófilos, así como la reacción de la xantina oxidasa contribuyen generando $\cdot\text{O}_2$.

2.2 Daño por sobrecarga de calcio.

La reperfusión también está asociada con un severo aumento del contenido de calcio intracelular. La excesiva acumulación de este ion se debe a perturbaciones del transporte en

la membrana sarcolemal; pero principalmente a su liberación de los receptáculos endógenos, especialmente del retículo sarcoplásmico (RS) (25). Experimentalmente se ha observado que si la anoxia es menor de 20 minutos, los sistemas de transporte en el cardiomiocito pueden manejar el calcio intracelular y mantienen los niveles fisiológicos durante la reoxigenación; sin embargo, cuando la anoxia es más larga, los niveles de ATP disminuyen drásticamente permitiendo que la sobrecarga de calcio exceda concentraciones de $2\mu\text{mol.L}^{-1}$. Bajo estas circunstancias, la reperfusión sólo puede recuperar parcialmente el tejido (26). Diversos autores han propuesto que la sobrecarga de calcio es uno de los factores que determinan la irreversibilidad en el daño por reperfusión (27). La entrada incontrolada de calcio al citosol produce la activación de proteasas dependientes de calcio (28). Por ejemplo, la calpaína que está localizada en diversos tipos de tejidos incluido el miocardio se activa durante la reperfusión (29) y se le ha relacionado con la degradación de proteínas intracelulares del citoesqueleto como la fodrina, la desmina, la α -actina y la espectrina (30); también se ha descrito recientemente que la activación de esta proteasa produce disfunción contráctil, posiblemente por la degradación de troponina y proteínas del RS, como el receptor de rianodina (RyR), la Ca-ATPasa del retículo (SERCA) y el fosfolambán (PLB) (31). Por otro lado, la sobrecarga de calcio activa fosfolipasas que tienen un papel importante en el daño por isquemia-reperfusión (32). Por ejemplo, la activación de la fosfolipasa A_2 (PLA₂) produce cambios en la integridad de los fosfolípidos; alterando la permeabilidad de la membrana plasmática y mitocondrial. La lipoperoxidación producida por las ERO aumenta la susceptibilidad de las membranas a ser degradadas por la PLA₂ (33). Particularmente en este punto podemos notar que los mecanismos de daño asociados al estrés oxidativo y la sobrecarga de calcio convergen, indicando que ambos se presentan juntos y que de forma sinérgica, exacerban el daño durante la reperfusión. En la Figura 2 se muestra la asociación de los mecanismos que producen el daño por reperfusión en el miocardio.

Estudios de diversos grupos han mostrado que la reoxigenación se encuentra asociada a un aumento en el contenido de calcio mitocondrial; este aumento produce una marcada disminución de la fosforilación oxidativa (34), por lo que se ha especulado que la muerte celular ocurre cuando la sobrecarga de calcio afecta la producción de ATP (35,36). Los mecanismos propuestos para explicar este daño irreversible, se describirán más adelante.

3. El manejo de calcio celular.

En la mayoría de las células, la membrana plasmática es prácticamente impermeable al calcio, creando un gradiente de concentración en el espacio extracelular e intracelular. En las células excitables la concentración extracelular de calcio libre es aproximadamente 1.2 mmol.L^{-1} , mientras que en el citosol el calcio sólo alcanza la concentración de $0.1-1\mu\text{mol.L}^{-1}$. En esta sección se revisan los principales sistemas de transporte de calcio en diversos compartimentos de la célula cardíaca.

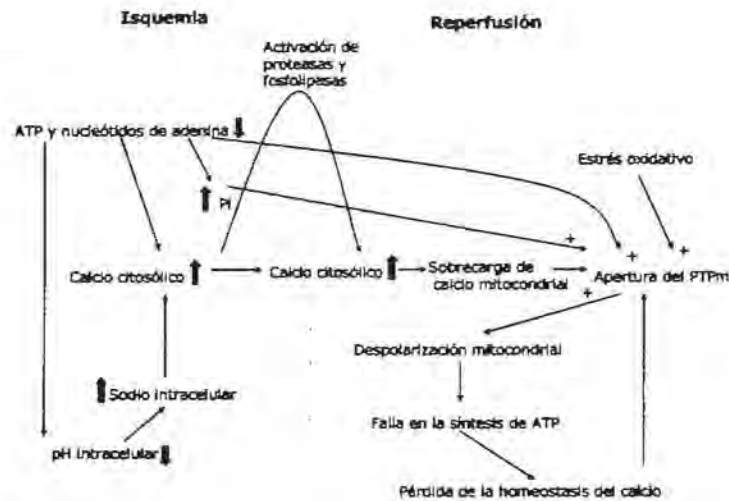


Figura 2. Alteraciones bioquímicas durante la isquemia (izquierda) y reperfusión miocárdica (derecha). Los cambios inciden sobre la función mitocondrial, llevando a la célula miocárdica a la debacle energética y a la apertura generalizada del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial. (↑) Representa aumento, (↓) disminución y (+) estimulación.

3.1 Transporte del calcio a través de la membrana plasmática.

La absorción del calcio se lleva a cabo en el intestino delgado, por medio de una proteína inducible por la vitamina D, que une calcio en la mucosa y lo acumula cerca de los transportadores de este catión en la membrana plasmática (37). El principal mecanismo de entrada de calcio a las células consiste en la apertura corta y transitoria de canales. Las células cardiacas exhiben principalmente dos clases de canales de calcio dependientes de voltaje: los tipo L y los tipo T. Los tipo L (sensibles a dehidropiridinas) se localizan principalmente en donde la sarcolema se encuentra en proximidad con el sistema longitudinal del RS y son los responsables de la corriente entrante de calcio que activa la liberación de calcio del RS (38). Los canales tipo T se abren a potenciales de membrana más negativos y participan de forma mínima en la corriente iónica entrante de calcio.

El IN/C, se describió por primera vez a mediados de los años sesenta y es el principal responsable de la salida de calcio del citosol a través de la membrana plasmática. Se sabe que el 28% de la remoción de calcio durante la sístole se lleva a cabo a través de esta proteína en el músculo cardíaco humano (39). La dirección de la translocación del calcio a través de este intercambiador depende de la concentración de los cationes en el citosol y en el medio externo. Este intercambiador opera con la estequiometría $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y como anteriormente se mencionó, tiene particular interés durante la isquemia cuando la sobrecarga de sodio promueve el aumento de calcio intracelular.

La ATPasa de calcio sarcolemal ayuda a mantener la concentración del calcio citosólico en el orden de 0.1- 0.2 μM . Esta bomba fue descrita por primera vez en eritrocitos por Schatzmann (40), tiene alta afinidad por calcio ($K_m = 1\mu\text{mol.L}^{-1}$) y baja velocidad de transporte: aproximadamente 0.5 nmol. mg^{-1} . sec^{-1} . Esta enzima es activada por calmodulina, fosfolípidos ácidos y ácidos grasos insaturados de cadena larga; por otro lado, varias hormonas como la tiroxina, la oxitocina y la insulina, pueden inhibirla, dependiendo del tipo de tejido (41).

3.2 El transporte del calcio a través del retículo sarcoplásmico.

El 70% del calcio citosólico, que no es expulsado de las células por medio del IN/C durante la sístole, es recapturado en el RS por medio de la SERCA. Esta bomba facilita la captura de grandes cantidades de calcio, y es capaz de removerlo hasta de los componentes del sistema contráctil (troponina C), permitiendo por lo tanto la relajación de la fibra muscular. Experimentos con la SERCA purificada y reconstituida han mostrado que la hidrólisis de una molécula de ATP puede transportar dos moléculas de calcio (42). La actividad de la SERCA se modula hormonalmente, vía la fosforilación del proteolípido PLB, por medio de cinasas dependientes de calcio-calmodulina o AMPc que actúan en sitios diferentes (43). En su forma no fosforilada, el PLB es un potente inhibidor de la SERCA, por lo que al fosforilarse, la ATPasa recupera su actividad bombeadora de calcio hacia el RS.

En el corazón la entrada de calcio a través de los canales en la membrana plasmática no es suficiente para activar directamente al sistema contráctil, pero sí lo es para activar la subsecuente liberación de calcio almacenado en el RS, a través de un proceso conocido como "calcio que induce la liberación de calcio". La liberación de calcio del RS se lleva a cabo por medio del RyR. Estos canales son estructuras tetraméricas formadas por cuatro subunidades. El monómero tiene un peso molecular cercano a los 600 KDa, por lo que un canal completo pesa 2.4 millones de daltones. Se han descrito al menos tres isoformas, la isoforma RyR₂ es la responsable del acoplamiento contracción-excitación en el corazón. Este canal con compuerta se activa a bajas concentraciones de calcio (0.1-1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) y se inhibe a altas concentraciones en el orden de mmol.L^{-1} (44). De igual manera, la concentración del calcio en el lumen del retículo regula la actividad de este canal, dado que su disminución dentro de este compartimiento puede disminuir la probabilidad de su apertura (45). Además de la regulación por calcio, los RyR₂ también son modulados por proteínas accesorias adosadas a su andamiaje citosólico por ejemplo: la FKBP12.6, la subunidad catalítica y la reguladora de la proteína cinasa A (PKA), la proteína fosfatasa 1, la proteína fosfatasa A2 (46). Lo antes mencionado se representa de forma esquemática en la Figura 3.

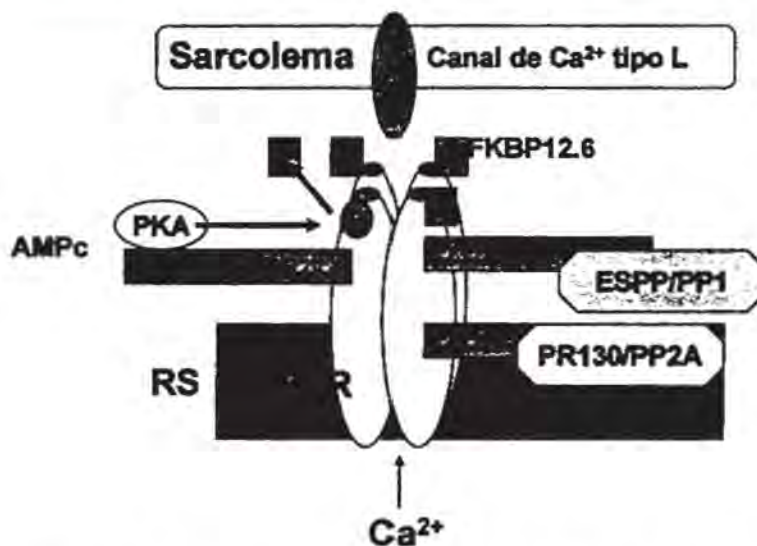


Figura 3. Representación del megacomplejo que constituye el RyR₂. La unión de la proteína FKBP12.6 a la estructura del RyR₂ promueve la disminución de su actividad. La unión de esta proteína está fisiológicamente regulada, por un proceso de fosforilación/defosforilación por medio de la PKA y las fosfatasas PP1 y PP2A. La subunidad catalítica de estas proteínas se adosa al andamiaje citosólico de los canales por medio de cierres de leucinas (LZ) y por medio de proteínas de anclaje como la esfingofilina (ESPP) y la RP120.

3.3 Transporte del calcio mitocondrial.

El sistema de transporte de Ca²⁺ mitocondrial está mediado por dos mecanismos separados: el de entrada, a través de un uniportador (UCam) electroforético que facilita el movimiento de calcio a favor de su gradiente electroquímico (presumiblemente un canal con compuerta) y que no requiere que otra molécula o ion lo acompañe, y el de salida de calcio, que se lleva a cabo mediante un mecanismo de intercambio con Na⁺ o H⁺ (47). En el contexto del mecanismo de salida, existe otro sistema de transporte que involucra la permeabilidad generalizada de la membrana a iones (que incluye al calcio) y otras moléculas pequeñas, que se ha denominado poro de transición de la permeabilidad (PTPm) del que hablaremos posteriormente con mayor detalle.

3.3.1 Mecanismo de entrada de calcio.

El UCam es responsable de la captación de este ion hacia la matriz mitocondrial, así como de diferentes iones: Sr²⁺; Mn²⁺; Ba²⁺; Cd²⁺; Fe²⁺; Pb²⁺; Mg²⁺ y lantánidos (48).

El magnesio y los lantánidos disminuyen la entrada de calcio, mientras que la espermina y diversos isoflavonoides vegetales pueden activarla hasta 20 veces (49,50). El UCam presenta un mecanismo cooperativo en el cual la unión de calcio al sitio de activación aumenta la velocidad de entrada, en mitocondrias aisladas se ha determinado un número de Hill cercano a 2.

La mitocondria *in vitro* puede acumular hasta $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de calcio (en presencia de fosfato) concentrándolo en la matriz como sales de fosfato insolubles. Sin embargo, la importancia *in vivo* de este transporte se ha cuestionado, ya que en condiciones fisiológicas la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ es cercano a $100\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ y la afinidad del UCam por el calcio es mayor a $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. La baja afinidad del UCam por el calcio sugería que la mitocondria no puede acumularlo durante la estimulación celular, dado que el aumento en el calcio citosólico inducido por un estímulo hormonal rara vez excede valores de $1\text{--}2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Por otro lado, muchos reportes se oponían a esta visión; por ejemplo, Thayer y Miller mostraron en neuronas en cultivo, que los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ que producían la activación de los receptores inotrópicos de glutamato, dependían de la acumulación del calcio mitocondrial (51). Otras evidencias indirectas se basaban en el uso de inhibidores mitocondriales. El grupo de McCormack determinó que el grado de activación adrenérgica en el corazón aislado correlacionaba con el contenido de calcio intramitocondrial, sugiriendo que la acumulación de calcio mitocondrial ocurre también durante condiciones fisiológicas (52). En cardiomiocitos, el monitoreo de la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ por medio del indicador fluorescente indo-1, reveló que durante la estimulación adrenérgica, la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ aumenta hasta 6 veces (53). Al año siguiente el grupo de Pozzan, utilizando la fotoproteína aequorina que es sensible a la $[\text{Ca}^{2+}]$, midió los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, después de la estimulación hormonal, y demostraron por primera vez, que esta estimulación provoca un rápido aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ (54). La discrepancia entre los datos *in vivo* e *in vitro* sobre la importancia fisiológica de la $[\text{Ca}^{2+}]_m$, podría deberse a la existencia de factores en el citosol que aumenten la afinidad del UCam por el calcio *in situ* o a que la mitocondria no tiene la capacidad de sentir cambios totales en el citosol, sino que responde a altas $[\text{Ca}^{2+}]$ en microambientes próximos a éstas. Al respecto se ha demostrado por medio de tomografía electrónica de alta resolución que el retículo endoplásmico forma numerosos sitios de contacto con las membranas de la mitocondria y que la apertura de los canales liberadores de calcio en el retículo genera un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ en la cercanía de la membrana mitocondrial. Este aumento es mayor que el aumento en otros sitios en el citosol (55).

El calcio intramitocondrial actúa como mediador en el metabolismo energético, por medio de la activación de diversas proteínas en la membrana interna mitocondrial o en la matriz. La evidencia experimental que apoya esta idea ha sido la demostración directa de que el aumento en el calcio mitocondrial aumenta los niveles de NADH, ATP y el consumo de oxígeno. Además, existen muchos reportes de activación por calcio de diferentes procesos metabólicos en la mitocondria, que incluyen a las deshidrogenasas de ciclo de los ácidos tricarbóxicos (α -ceto glutarato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa y piruvato deshidrogenasa (56), la F1F0-ATP sintetasa (57) y el translocador de adenín nucleótidos (58). La Figura 4 muestra un esquema que representa los sitios de estimulación del metabolismo mitocondrial por el calcio.

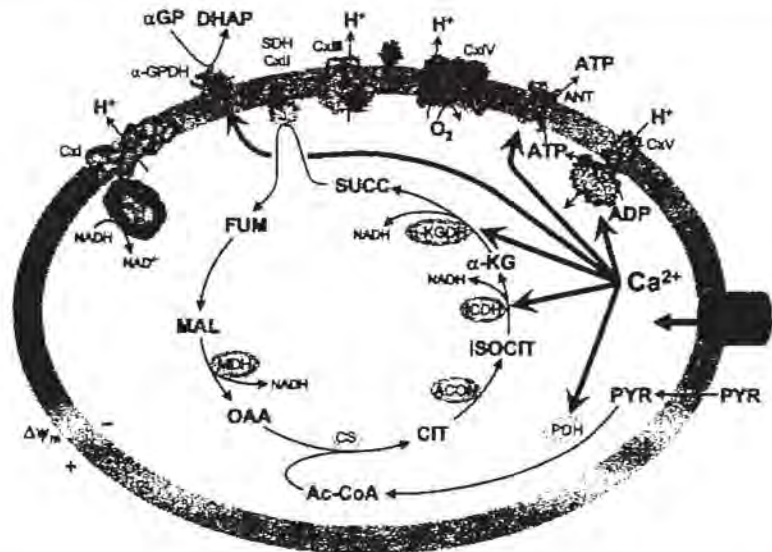


Figura 4. Esquema general de la activación del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y de la fosforilación oxidativa por calcio. El calcio es internalizado a la matriz mitocondrial por medio del UCam. Las líneas gruesas representan sus enzimas blancos. α -glicerofosfato deshidrogenasa (GPDH), α -cetoglutarato deshidrogenasa (α -KGDH), isocitrato deshidrogenasa (ICDH), piruvato deshidrogenasa (PDH), translocador de adenín nucleótidos (ANT) y ATP sintetasa en el complejo V (CxV).

3.3.2 Estructura molecular del UCam.

El aislamiento de UCam es esencial para entender el mecanismo de entrada y establecer si se trata de un acarreador o es un sistema que forma un canal. La identidad molecular del UCam no se ha determinado completamente, a pesar del gran esfuerzo que han desarrollado muchos laboratorios. Los trabajos pioneros en el campo, buscaban extraer proteínas mitocondriales que unieran calcio con gran afinidad; por ejemplo, a principios de los setentas Lehninger por medio de un choque osmótico obtuvo una fracción mitocondrial que contenía sitios de alta y baja afinidad por calcio, sin embargo la unión a calcio en esta fracción no se alteró por magnesio ni desacoplantes. En este trabajo se especula que el peso molecular del componente con sitios de alta afinidad por calcio debía ser mayor de 150 KDa, pues su elución sólo era retardada en un columna de Sephadex G-200, y no en columnas G-100 o G-50. (59). Un año más tarde Gómez-Puyou intentó purificar el componente que unía calcio con gran afinidad y encontró que esa fracción estaba compuesta por una proteína de 67 KDa y cuatro proteínas menores (60). Paralelamente, otros grupos intentaron asociar al UCam con componentes mitocondriales que contuvieran carbohidratos. Esta asociación resultó del hallazgo de que el rojo de rutenio (RR) (un colorante de mucopolisacáridos) inhibía potentemente el transporte de calcio en mitocondrias (60a). En consecuencia, el grupo de Sotocasa identificó una glicoproteína aparentemente de origen mitocondrial que podía unir calcio y mostraba inhibición por RR. Adicionalmente demostró que los anticuerpos generados contra esta proteína inhibían el transporte de calcio en mitocondrias aisladas (61). Más tarde

se determinó la inespecificidad de ese antisuero, ya que reaccionaba preferentemente con una preparación de fibroblastos, más que con una de mitocondrias (62). En 1982, Mirova y colaboradores aislaron una glicoproteína con una masa molecular de 40KDa y un pequeño péptido, que al ser reconstituido en bicapas lipídicas formaba canales sensibles a RR (63). La proteína de 40 KDa resultó ser un contaminante del suero, al que se identificó como la proteína plasmática orosomucoide (64). Recientemente nuestro grupo, utilizando la técnica de separación por isoelectroenfoque y por cromatografía de afinidad con el inhibidor marcado $^{103}\text{Ru}_{300}$, identificó una proteína de 56 KDa y una glicoproteína de 18 KDa que al ser incorporadas en liposomas, reconstituyen el transporte de calcio, conservando la sensibilidad a los complejos de rutenio, inhibidores clásicos del UCam (65,66,67). En 2004, el grupo de David Clapham caracterizó por patch-clamp un canal en mitoplastos, que transporta muy eficientemente calcio y cuyas KI's por RR y Ru_{300} son cercanas a las reportadas para el UCam (68). En conjunto, estos datos nos han llevado a especular sobre la estructura del UCam. En la figura 5 se presenta una posible estructura para este transportador.

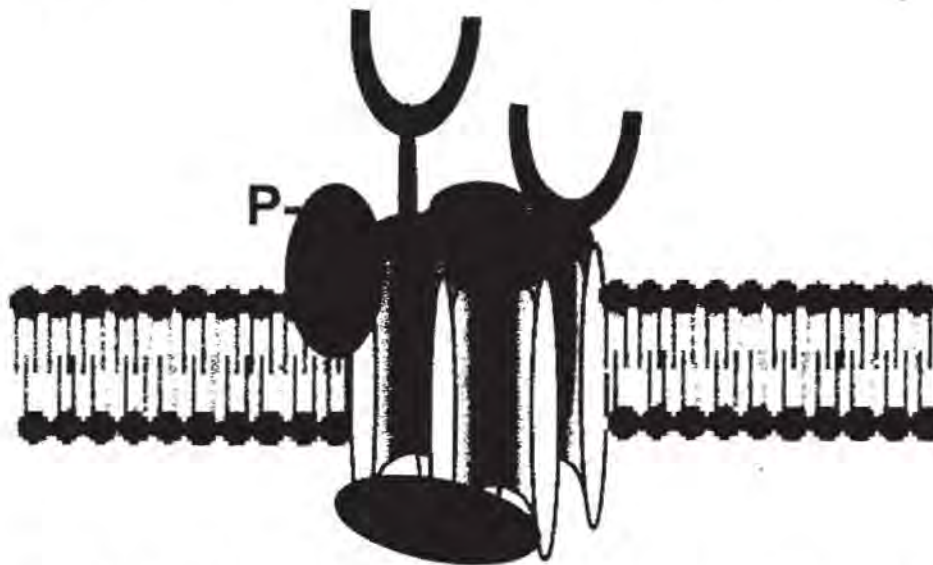


Figura 5. Esquema de la posible estructura del UCam. Los óvalos azules representan el sitio de alta afinidad para calcio, en homología con los sitios de unión a calcio de los canales de retículo. Nuestro grupo ha identificado dos proteínas, una de 18 y otra de 56 KDa que parecen ser parte de este transportador, según el esquema la oligomerización de estas subunidades podría formar el canal (Tubos azules). La subunidad menor podría contener residuos N-glicosídicos (en rojo) que interactúan con los complejos de rutenio, inhibidores de este canal. De acuerdo con la estructura de canales de calcio de la membrana plasmática, se ha sugerido que este canal pudiera ser sensible a fosforilación, por lo que se presenta una subunidad reguladora (óvalo verde), esta subunidad según diversos autores podría ser un receptor similar al de estrógenos (69), la fosfolipasa C-delta 1 (70) o una MAP cinasa (71). El óvalo rojo ($\Delta\psi$) representa la compuerta sensible a voltaje de acuerdo con los resultados del trabajo de Clapham (68).

3.3.3 Salida de calcio y transición de la permeabilidad mitocondrial.

En condiciones fisiológicas la salida de calcio en mitocondrias de corazón ocurre a través del intercambio por sodio. Sin embargo, se ha determinado que la despolarización de la membrana mitocondrial, puede hacer que el UCam trabaje en sentido contrario, liberando el calcio de la matriz. Este mecanismo se ha observado en células permeabilizadas y tratadas con desacoplantes, y se le ha llamado: "el calcio mitocondrial induce la liberación de calcio" aunque no está claro como podría ocurrir en un contexto fisiológico (72,73).

Existe otro sistema de salida de calcio que involucra la permeabilidad generalizada de la membrana a iones (incluyendo al calcio) y otras moléculas pequeñas, que se ha denominado "transición de la permeabilidad mitocondrial". Recientemente la transición de la permeabilidad mitocondrial (TPm) se ha reconocido como una de las vías centrales de diversos procesos fisio-patológicos. El PTPm, es un megacanal con gran capacidad de conductancia (cerca de 120 ps), que tiene múltiples estados de sub-conductancia y un diámetro de poro alrededor de 2 nm (74). Este poro se concentra en los sitios de contacto entre la membrana interna y la externa. La apertura del PTPm se favorece bajo diversas condiciones; pero principalmente por la acumulación de calcio en la matriz mitocondrial, acompañada de la disminución en la relación ATP/ADP, por un aumento de fosfato inorgánico y en general como resultado de un estado de estrés oxidativo (75).

La apertura del PTPm altera significativamente las propiedades de permeabilidad de la membrana interna mitocondrial, ocasionando que esta se depolarice. Al colapsarse el potencial transmembranal ($\Delta\Psi$), la ATP sintetasa opera en reversa, consumiendo el ATP en un intento fallido para restablecer el gradiente de protones. Bajo estas condiciones, la mitocondria se transforma de productor de ATP en consumidor, acelerando la debacle energética y promoviendo la muerte celular (76).

Adicionalmente, la apertura del PTPm provoca el hinchamiento mitocondrial, que causa la ruptura de la membrana externa y libera moléculas pro-apoptóticas que se encuentran en el espacio intermembranal, i.e. citocromo c, Smac/DiABLO y Endo G, que disparan la muerte celular en un mecanismo dependiente de caspasas (5).

La composición molecular del PTPm, permanece todavía bajo debate, pero el translocador de adenín nucleótidos (TAN), la ciclofilina-D de la matriz y el canal aniónico dependiente de voltaje (CADV) también llamado porina, al parecer son los principales componentes estructurales de este complejo; hay otras proteínas como el receptor de benzodiazepina, la hexocinasa y la creatina cinasa mitocondrial, que han mostrado un papel regulatorio en la apertura de poro (Figura 6).

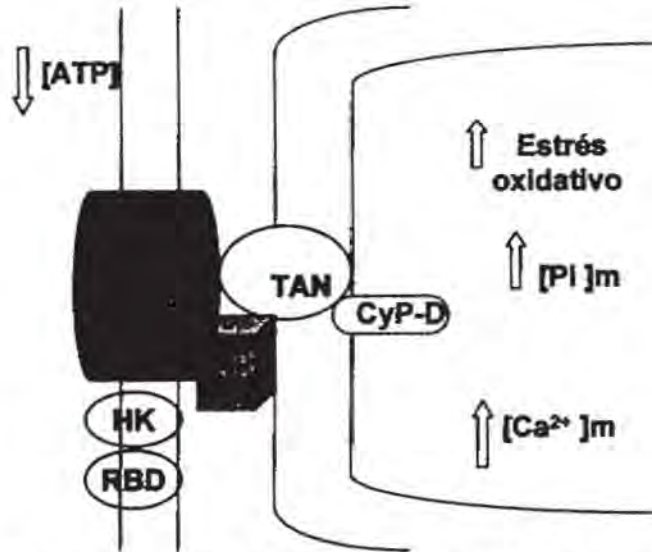


Figura 6. Representación esquemática del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial. Se muestran los principales componentes y reguladores de la apertura del poro. Canal aniónico dependiente de voltaje (CADV), creatina cinasa (CK), translocador de adenín nucleótidos (TAN), ciclofilina D (CyP-D), Hexocinasa (HK) y receptor de benzodiazepina (RBD).

4.- Estrategias de cardioprotección.

En el estudio del miocardio isquémico-reperfundido, tan variados son los mecanismos descritos en el daño, como las estrategias de cardioprotección. En esta sección se describen de forma general, algunas de las más exitosas en la protección del miocardio contra el daño por reperusión.

4.1 Precondicionamiento isquémico.

La adaptación del corazón a la hipoxia crónica como estrategia de cardioprotección resultó de una serie de estudios epidemiológicos a finales de los cincuenta que mostraban una disminución significativa en la incidencia de infartos miocárdicos en personas que vivían a gran altura (77). Estas observaciones fueron confirmadas en estudios experimentales, usando un modelo de hipoxia por gran altura. Poupá, utilizando una cámara hipobárica, mostró que dicha condición limitaba el tamaño del infarto miocárdico (78). Después de un gran periodo de escepticismo, Murry, en el laboratorio de Jennings encontró que 4 ciclos breves de oclusión coronaria antes de una oclusión de 40 minutos, reducían el infarto en un 75% (79). A partir de estos hallazgos, este fenómeno fue llamado precondicionamiento isquémico (PCI), y se convirtió en una de las estrategias más efectivas para proteger al corazón del daño por reperusión. Los mecanismos responsables del PCI, se encuentran aún bajo discusión; sin embargo, estudios recientes sugieren que los canales mitocondriales de potasio sensibles a ATP ($mitK_{ATP}$), pudieran ser posibles efectores de la protección en el PCI.

Hace veintidós años, Noma identificó los primeros canales de potasio sensibles a ATP en parches de membrana plasmática de cardiomiocitos ventriculares. Posteriormente fueron encontrados en otros tejidos, incluyendo el cerebro, el músculo liso y esquelético, el endotelio y el páncreas, órgano en donde se les ha relacionado con la secreción de la insulina. Originalmente se propuso que estos canales acoplaban el metabolismo miocárdico con la actividad eléctrica, sugiriéndose que su apertura podría servir como un mecanismo endógeno de cardioprotección, al acortar la duración del potencial de acción y limitar la entrada de calcio a las células cardiacas (80). Hasta 1994 se suponía que éste era el mecanismo de acción del preconditionamiento isquémico (PCI) y que el efecto protector de los agonistas de los canales de K_{ATP} contra el daño por reperfusión, se debía a su acción sobre dichos canales. Sin embargo, a partir del trabajo de Yao y Gross, se acumularon evidencias de que el efecto protector no siempre correlacionaba con la reducción del potencial de acción, situación que implicaba la existencia de sitios adicionales, posiblemente intracelulares, para explicar el efecto protector de estos agonistas (81).

Los canales mitocondriales de potasio sensibles a ATP ($mitK_{ATP}$), se describieron por primera vez por Inoue y colaboradores en 1991, en mitoplastos gigantes preparados a partir de mitocondrias de hígado (82). Un año más tarde, Paucke en el laboratorio de Garlid, aisló y purificó parcialmente un canal $mitK_{ATP}$ de mitocondrias de corazón de res y demostró que estos canales tenían características similares a los de la membrana plasmática. Sin embargo, demostró que su función está relacionada principalmente con el control del volumen de la matriz mitocondrial y no con la regulación de la actividad eléctrica, como se había descrito para los canales de K_{ATP} de la membrana plasmática (83). Estudiando el efecto de los inhibidores y activadores de estos canales sobre algunas funciones mitocondriales, se dio la pauta para establecer una estrecha relación entre los canales $mitK_{ATP}$ y la cardioprotección, lográndose explicar la paradójica observación de que algunos activadores de canales de K_{ATP} protegían durante la reperfusión post-isquémica, sin alterar la actividad de los canales de K_{ATP} en la membrana plasmática. En la figura 7 se muestra una representación esquemática del mecanismo a través del cual la apertura de los canales de K_{ATP} y los $mitK_{ATP}$, puede producir protección durante el PCI.

El grupo de Garlid en 1997 presentó el primer trabajo en el que se mostraba evidencia directa de la relación entre los canales $mitK_{ATP}$ y la cardioprotección. Este grupo de investigadores reportó que la farmacología de los canales de K_{ATP} de membrana plasmática y la de los canales $mitK_{ATP}$ era sorprendentemente diferente, al analizar el efecto protector contra el daño por reperfusión de la sulfonamida diazóxido. Este compuesto demostró tener una potencia 2000 veces más alta sobre los canales mitocondriales ($K_{0.5}=0.4\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), que sobre los del sarcolema ($855\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). El espectacular efecto protector del diazóxido, fue bloqueado por la glibenclamida y otros antagonistas de los canales de K_{ATP} . Estos resultados sugerían que el diazóxido y otros efectores que abren canales de K_{ATP} interactúan con los

canales de la mitocondria para producir el efecto cardioprotector (85). En concordancia con los resultados de Garfí y colaboradores, estudios en el laboratorio de Marbán han demostrado que el diazóóxido abre en forma selectiva los canales mitK_{ATP} y el 5-Hidroxi-decanoato (5-HD) un bloqueador para los canales mitK_{ATP} , es capaz de suprimir el efecto protector del PCI (86).

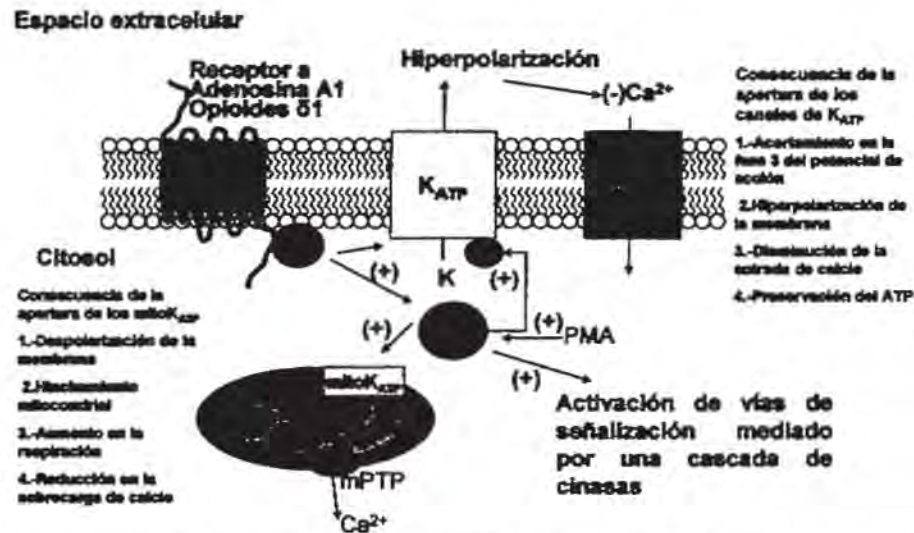


Figura 7. Representación esquemática de los mecanismos por los cuales los canales K_{ATP} y los canales mitK_{ATP} pueden producir cardioprotección. Las proteínas G reguladas por medio de un receptor para adenosina y opioides permiten la activación de la proteína cinasa C (PKC) y otras cinasas intracelulares como la tirosina cinasa y la cinasa de activación mitogénica. Eventualmente, estas cinasas pueden fosforilar proteínas efectoras como la HSP27 o el canal K_{ATP} . Se ha propuesto que la apertura de los canales K_{ATP} produce cardioprotección acortando la fase 3 de la repolarización del potencial de acción cardíaco e hiperpolarizando la membrana; estos mecanismos permiten la reducción (-) de la sobrecarga de calcio durante la reperfusión. Por otro lado, el mecanismo por el cual la apertura de los canales mitK_{ATP} puede producir cardioprotección, contempla la entrada de potasio y la depolarización mitocondrial, estos efectos reducen la sobrecarga de calcio mitocondrial, que causa hinchamiento de la matriz y la apertura transitoria del PTPm en un estado de baja conductancia. La apertura de ambas formas de los canales K_{ATP} aumenta en presencia de activadores de la PKC como los ésteres de forbol (PMA). Modificado de Gross y Fryer (84).

Adicionalmente se ha sugerido que los canales K_{ATP} de la sarcolema no están involucrados en el mecanismo del PCI, ya que algunos nuevos bloqueadores selectivos de los canales K_{ATP} de membrana plasmática, como el HMR1883, no inhiben el PCI como lo hace el 5-HD (87).

Desde 1998, se han planteado diversas hipótesis sobre el posible mecanismo de protección de los canales mitK_{ATP} . Dichas hipótesis no son excluyentes entre sí, ya que es probable que todas contribuyan a la preservación de la función mitocondrial y contráctil en el corazón.

Existe evidencia experimental que apoya la posibilidad de que los canales mitK_{ATP} disminuyan la sobrecarga de calcio mitocondrial, la producción ERO y la apertura del PTPm.

4.2 Modulación de la señalización dependiente de cinasas.

Se ha descrito que durante el PCI, se liberan algunos factores que incluyen a la adenosina (88), los opiodes (89) y la bradiginina (90), que al unirse con sus receptores pueden activar vías de señalización dependientes de proteínas cinasas que inhiben ciertos mecanismos de muerte celular. Por ejemplo, se ha propuesto que la activación de la fosfoinosítido-3-cinasa (PI3K) genera inosítidos que pueden activar a la cinasa-dependiente de inosítidos (PDK) cuyos sustratos permiten a su vez la activación de otras cinasa corriente abajo i.e. la proteína cinasa B (también llamada Akt) o la cinasa- p70S6 (p70S6K) que están involucradas en la protección por PCI (91). Los diversos pasos de estas vías de señalización se han convertido en blancos terapéuticos y estrategias de cardioprotección. Recientemente Murphy ha revisado con detalle las vías que inhiben la muerte celular y producen cardioprotección (92).

4.3 Reducción de estrés oxidativo.

Una de las principales estrategias para proteger al corazón contra el daño por reperfusión es la disminución en producción de las ERO. Por ejemplo, la vitamina E que es un eficiente atrapador de radicales libres y produce protección *in situ* en las membranas celulares, reduce el daño por isquemia-reperfusión al suplementarse en la dieta de los animales ($200 \text{ UI.Kg}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$) (93,94). Otros estudios han demostrado que la combinación de vitamina E y el ácido hidrolipoico (que estimula el reciclamiento de la vitamina E en las membranas *in vitro*), aumenta la recuperación de miocardio durante la reperfusión (95).

La SOD y la catalasa son enzimas intracelulares que catalizan la eliminación de radicales O_2 y de H_2O_2 , respectivamente. Su administración antes de la reperfusión disminuye la producción de ERO, sin embargo existe controversia sobre la eficacia de este tratamiento, pues algunos trabajos reportan que los tratamiento con SOD o en combinación con catalasa no funcionan, e incluso son contraproducente (96,97).

Como ya se mencionó, el inhibidor competitivo de la xantina oxidasa alopurinol, ha mostrado un efecto protector durante la reperfusión. Algunos trabajos han demostrado, por medio de espectroscopía de resonancia electrónica que después de su administración, la cantidad de ERO disminuye (98).

4.4 Tratamiento con fármacos que actúan sobre el calcio intracelular.

Los bloqueadores de canales de calcio son un grupo muy heterogéneo de drogas con un amplio espectro de efectos sobre el miocardio, sobre la función y conducción del nodo sinoatrial y atrioventricular y sobre la circulación coronaria. Desde el desarrollo y caracterización de los agonistas de los canales de calcio en la década de los sesentas, estos

agentes se han utilizado en el tratamiento de diversas enfermedades cardiovasculares. Principalmente estas drogas se han usado en el tratamiento de arritmias cardíacas (particularmente arritmias supraventriculares) y/o isquemia.

Uno de los fármacos más utilizados en modelos animales es la nifedipina, que tiene un efecto cardioprotector a altas concentraciones cuando se aplica antes de la isquemia, reduciendo significativamente el tamaño de las zonas infartadas (99). Otro agente empleado en la protección del miocardio post-reperfusión es el verapamil, que reduce el daño tisular, preservando la función contráctil así como la ultraestructura y la función mitocondrial (100).

Un problema con la mayoría de los bloqueadores de canales de calcio, es que tienen efectos inotrópicos negativos que producen modificaciones hemodinámicas. Por lo que se siguen buscando nuevos compuestos sin estos efectos (101).

En modelos experimentales de isquemia-reperfusión se ha demostrado que el ketorolaco, cuyo uso principal es de antiinflamatorio y analgésico, tiene actividad como antagonista del calcio y contribuye a mantener la integridad celular cardíaca, además que evita el efecto arritmogénico de la perfusión (102). Estudios *in vitro* han mostrado que el ketorolaco tiene acción ionofórica en las mitocondrias (103).

El aumento repentino del calcio intracelular durante la perfusión no sólo proviene del calcio extracelular, sino también de almacenes de calcio intracelular como el RS. En este sentido, su modulación se ha convertido en una estrategia para disminuir el daño por sobrecarga de calcio durante la perfusión. En 1988, el grupo de Ople, al investigar el papel de la liberación oscilatoria de calcio del RS sobre la generación de arritmias, encontró que la rianodina, un inhibidor selectivo de los RyR, aumentaba importantemente el trabajo cardíaco post-reperfusión y disminuía las arritmias (104). Estos datos fueron confirmados por diferentes grupos, y se han usado otros antagonistas de los RyR para la protección del miocardio. Entre estos destaca la hidantoína dantroleno, compuesto que a concentraciones relativamente bajas ($1\mu\text{mol.L}^{-1}$) ha mostrado reducir el área de tejido infartado en 28%, además de que no produce ningún efecto hemodinámico en el corazón aislado (105).

4.5 Inhibición del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial.

En los cardiomiocitos aislados se ha determinado de forma indirecta la apertura del PTPm por medio de la medición del $\Delta\Psi_m$, utilizando indicadores fluorescentes. En uno de estos estudios se encontró que durante la reoxigenación se abre el poro y que esta apertura es sensible a la ciclosporina A (CSA), un potente inhibidor del PTPm *in vitro*. En esas condiciones, también se encontró que la extensión de muerte celular aumenta en proporción directa con el contenido de calcio mitocondrial (106). Para medir la apertura del poro *in situ* en corazón aislado se han desarrollado otras estrategias experimentales. Por ejemplo, el grupo de Halestrap perfundió corazones con [^3H] 2-deoxiglucosa ([^3H]DOG) que es transportada al interior de la célula y fosforilada a [^3H]DOG-P. Este compuesto no puede

metabolizarse y queda atrapado en la célula y sólo puede entrar a la mitocondria cuando el poro se encuentra abierto. Tras de un periodo de isquemia o de reperfusión midieron la cantidad de [³H]DOG-P acumulada dentro de la mitocondria, determinando así la apertura del poro. Encontraron que durante la isquemia, el contenido de [³H]DOG-P en las mitocondrias era relativamente bajo; sin embargo, al quinto minuto de reperfusión después de una isquemia de 30 minutos, la cantidad de [³H]DOG-P asociada a la mitocondria aumentó cuatro veces (107).

Otra técnica para la detección directa de la apertura del PTPm se basa en la redistribución intracelular de NAD⁺. En condiciones fisiológicas, cerca del 80 % de NAD⁺ celular está compartimentalizado en las mitocondrias; al liberarse el NAD⁺, desaparece rápidamente ya que en el citosol es hidrolizado por NAD⁺-hidrolasas, especialmente cuando el contenido de ATP es reducido (108). La liberación de NAD⁺ en un modelo de reperfusión post-isquémica, se ha interpretado como resultado de la apertura del PTPm (109), ya que tanto la CSA como la Me Val-4-CSA (un análogo de la CSA, que no inhibe a la calcineurina) evitan la liberación de NAD⁺.

La estrategia más común para demostrar la participación del PTPm durante la reperfusión ha sido el uso de CSA. Los inhibidores del PTPm, CSA y la Sangliferina A (SFA) se han utilizado ampliamente para evitar el daño mitocondrial durante la reperfusión. En modelos *in vitro* e *in vivo* se ha encontrado que después de un evento isquémico, la CSA evita el daño tisular, el abatimiento de ATP y disminuye las arritmias post-reperfusión (110,111). La SFA, un inhibidor más específico, también ejerce efecto protector contra el daño por reperfusión, recuperando la presión ventricular, reduciendo el daño tisular y además disminuyendo la zona necrótica en el corazón (112).

Recientemente, Argaud y cols. reportaron que un derivado no inmunosupresor de la CSA, el NIM811, disminuye el tejido infartado en corazones reperfundidos; adicionalmente, la tinción de TUNEL para detectar apoptosis también disminuyó después del tratamiento con el inhibidor (113).

Otra estrategia para regular la apertura del PTPm, consiste en utilizar como blanco al TAN. Esta proteína forma parte de la estructura del PTPm, e incluso se ha reportado que puede por sí misma formar un canal intermembranal para calcio (114). Ya que se ha descrito que el TAN, contiene al menos 3 cargas positivas en el sitio de unión a sus sustratos e inhibidores, se han utilizado compuestos con carga positiva, como las poliaminas o el Mg²⁺, para apantallar estas cargas clave e inhibir la apertura del PTPm (115). Siguiendo este razonamiento, se ha utilizado a la octilguanidina (OG) para inhibir la apertura del PTPm inducida por carboxiatractilósido (116). Tomando como antecedentes estos resultados, se determinó el efecto de la OG sobre el daño por isquemia-reperfusión miocárdica en un modelo *in vivo*. La administración de este compuesto antes de la isquemia disminuyó la

aparición de arritmias post-reperusión y mantuvo la integridad celular y mitocondrial, determinada como la capacidad de las mitocondrias para sintetizar ATP (117).

Si bien utilizar compuestos que inhiban la apertura del PTPm ha tomado relevancia y es en la actualidad una de las estrategias más utilizadas para proteger al miocardio durante la reperusión; se sabe también que ni la SFA ni la CSA pueden inhibir la apertura del PTPm cuando las mitocondrias son expuestas a un estímulo suficientemente fuerte (107,118). Con base en lo anterior se han buscado agentes farmacológicos que puedan evitar la apertura del poro en lugar de cerrarlo. La sobrecarga de calcio en la mitocondria es un requisito absoluto y específico para promover la apertura de este mega canal (119). Por ello es razonable predecir que al utilizar una estrategia que disminuya la $[Ca^{2+}]_m$ -y así evitar la apertura del PTPm- pueda evitar el daño por reperusión.

III.-ANTECEDENTES

El papel que tiene la sobrecarga de calcio sobre la apertura del PTPm está aún en discusión, pero en un modelo propuesto por Brustovestky y Klingenberg se sugiere que el calcio se une a las cargas negativas de las moléculas del fosfolípido cardiolipina, que están íntimamente asociada al TAN. La interacción del calcio con la cardiolipina promueve la exposición de cargas positivas localizadas en los monómeros del TAN, formándose así un túnel inespecífico (120). Dado que la pérdida de la permeabilidad selectiva por la acumulación de calcio provoca que disminuyan tanto el gradiente eléctrico transmembranal como la síntesis del ATP, se ha propuesto que la sobrecarga de calcio es uno de los factores principales que condicionan la irreversibilidad del daño miocárdico post-reperusión (25,27).

Al respecto, se ha propuesto la inhibición del UCam como estrategia para reducir el daño por reperusión. La participación de este transportador de calcio en este daño, se ha estudiado por medio de su inhibidor más conocido: el RR. En dichos trabajos se ha mostrado que su perfusión en corazones aislados disminuye el daño mitocondrial y recupera el trabajo cardíaco durante la reperusión (121,122,123). Sin embargo, se sabe que el RR interactúa con muchas otras proteínas además del UCam, por lo que es posible que su mecanismo de protección se relacione con el efecto sobre esas otras proteínas. Por ejemplo, el RR es un potente bloqueador del RyR, así que la inhibición de este canal puede disminuir la salida de calcio del RS y en consecuencia, reducir la $[Ca^{2+}]_c$ y la $[Ca^{2+}]_m$ (124). Por ello la perfusión de RR no demuestra de forma absoluta la participación del UCam en el daño por reperusión.

En 1992, el grupo de Sanadi purificó un compuesto conocido como Ru₃₆₀, a partir de muestras comerciales de RR. Este compuesto inhibe el transporte de calcio en mitocondrias aisladas a concentraciones mucho más bajas que el RR (125). Años después, el grupo multidisciplinario encabezado por Matlib demostró en células miocárdicas, que las principales proteínas blanco del RR, no eran afectadas por el Ru₃₆₀ y a partir de ese trabajo este compuesto se dio a conocer como el inhibidor más potente y específico para el UCam (126). Con base en estos antecedentes, es posible que al bloquear específicamente el UCam con Ru₃₆₀ podamos determinar la contribución de esta proteína en el daño por reperusión miocárdica y al evitar la sobrecarga mitocondrial, proteger al miocardio reperfundido.

IV.-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Si la elevación de calcio en la matriz mitocondrial es uno de los factores principales que disparan la apertura del poro de transición de la permeabilidad en mitocondrias aisladas, entonces la perfusión de Ru₃₆₀ en corazones aislados y en rata completa inhibirá específicamente la entrada del calcio a las mitocondrias y evitará la disfunción global de la producción de energía observada durante la reperfusión.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el mecanismo a través del cual el Ru₃₆₀ ejerce protección durante la reperfusión post- isquémica.

OBJETIVOS PARTICULARES

(En el modelo de corazón aislado)

1. Determinar la dosis de Ru₃₆₀ que previene contra el daño por reperfusión en corazón aislado de rata, analizando el trabajo cardíaco, el consumo de oxígeno y la eficiencia contráctil.
2. Aislar mitocondrias de corazones reperfundidos con y sin perfusión previa del inhibidor y determinar la integridad mitocondrial, midiendo la respiración y el potencial transmembranal.
3. Determinar el transporte del calcio y la apertura del poro de transición de la permeabilidad en mitocondrias de corazones reperfundidos, con y sin perfusión previa del inhibidor.
4. Determinar la unión de ¹⁰³Ru₃₆₀ a diferentes fracciones celulares.
5. Determinar la [Ca²⁺]_m post-reperfusión, en mitocondrias aisladas de corazones, con y sin perfusión previa del Ru₃₆₀.
6. Determinar el efecto del Ru₃₆₀ en los sistemas de transporte del calcio en RS.

(En el modelo *in vivo* de reperfusión)

1. Determinar las dosis mínimas a las cuales el Ru₃₆₀ y otros inhibidores del UCam (RR, RRFen) protegen del daño post-reperfusión.
2. Determinar el efecto protector del Ru₃₆₀, midiendo parámetros fisiológicos tales como la frecuencia cardíaca, la tensión arterial y la incidencia de arritmias.
3. Determinar el efecto protector sobre el daño tisular en corazones reperfundidos, midiendo la actividad de creatina cinasa (CK) y lactato deshidrogenasa (LDH) en sueros.

HIPOTÉISIS Y OBJETIVOS

4. Determinar el efecto protector del inhibidor sobre la integridad mitocondrial, midiendo la respiración, el potencial transmembranal y el transporte de calcio en mitocondrias aisladas de corazones de animales reperfundidos.
5. Determinar los niveles de Ru_{380} circulante y el unido al miocardio en ratas tratadas con el inhibidor por medio de espectroscopia de emisión óptica-inductivamente acoplada a plasma (ICP-OES).

V.- METODOLOGÍA

Este trabajo se llevó a cabo de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de América. En todos los experimentos se utilizaron ratas Wistar machos con un peso entre 250-350 g.

1. Síntesis de Ru₃₆₀ y ¹⁰³Ru₃₆₀.

El (μ-O)[(HCO₂)(NH₃)Ru]₂Cl₃ (Ru₃₆₀) se sintetizó de acuerdo con el método descrito por Ying y cols. (125). Se formaron diferentes compuestos aminados de rutenio, como resultado de la reacción de RuCl₃ (Aldrich Chem Co, Milwaukee WI) con NH₄OH. Los compuestos formados se separaron por cromatografía de intercambio catiónico, utilizando un gradiente de 0.2 a 0.6 mol.L⁻¹ de formiato de amonio. Las fracciones eluidas en aproximadamente 0.4 mol.L⁻¹ se colectaron y liofilizaron. En estas fracciones de color ligeramente amarillo, se detectó un pico único de absorbencia a una longitud de onda de 360 nm (Figura 8). El inhibidor con marca radiactiva se preparó ajustando la técnica a un micro-método utilizando 1 mCi de ¹⁰³RuCl₄ (Perkin Elmer, Boston MA) (65). La concentración de Ru₃₆₀ se determinó por medio de su coeficiente de extinción molar ($\epsilon_{360} = 2.6 \times 10^4 \text{ mol.l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

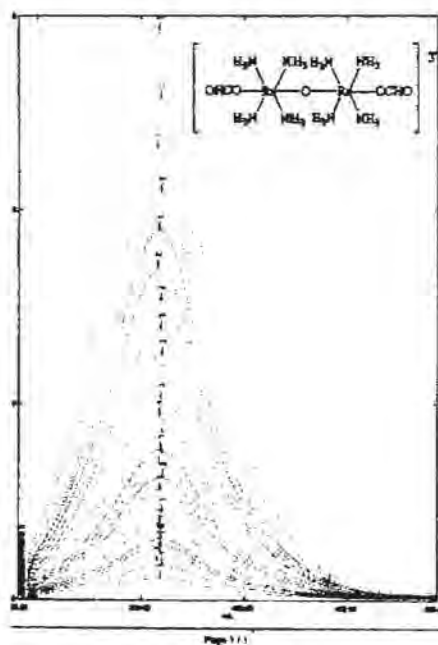


Figura 8.- Espectro de absorción del Ru₃₆₀ a diferentes concentraciones. El compuesto presenta un pico único a 360 nm. En el inserto se presenta la estructura del (μ-O)[(HCO₂)(NH₃)Ru]₂Cl₃ (Modificado de Ying y cols. (125)).

PROTOCOLOS UTILIZADOS EN CORAZÓN AISLADO**2. Perfusión del corazón aislado.**

Diez minutos antes de anestesiarse a las ratas, se les administró 200 U de heparina para evitar la coagulación. Pasado este tiempo las ratas se anestesiaron con pentobarbital (50 mg.Kg⁻¹ i.p.). Se les practicó una toracotomía central, removiendo el esternón y las costillas para dejar el corazón expuesto. Se localizó la aorta descendente y se separó el corazón del animal; de inmediato se colocó el corazón en una solución helada para inmovilizarlo. Enseguida el corazón se canuló en el sistema de Langendorff, y se perfundió con solución Krebs-Henseleit (K-H) a 37°C filtrada a través de un poro de 0.45 µm, con la siguiente composición (mmol.L⁻¹): sodio 147, potasio 6, magnesio 1.2, calcio 2.5 y glucosa 4.3 y octanoato 0.1 como sustratos metabólicos. El medio de perfusión se burbujeó constantemente con gas carbógeno (95% oxígeno-5% dióxido de carbono). La perfusión se inició a un flujo constante de 12 mL.min⁻¹. La presión intraventricular se determinó introduciendo un baloncito de látex en el ventrículo izquierdo, que se conectó a un transductor de presión hidrostática. La resistencia vascular se determinó con un transductor similar, conectado al paso de la solución unos centímetros antes de llegar al corazón.

Para la medición de los electrocardiogramas (ECG), se utilizaron 2 electrodos de plata, uno colocado en el ápice y otro en la aurícula derecha del corazón. La arteria pulmonar fue canulada y conectada a una cámara cerrada para medir la concentración de oxígeno en el eluyente coronario (Gilson, Lewis Center, OH), por medio de un electrodo tipo Clark (YSI, Yellow Springs, OH). La velocidad de consumo de oxígeno se calculó como la diferencia de concentración entre la solución de perfusión antes de pasar por el tejido cardíaco, y la concentración en el eluyente coronario. Todas las variables fueron grabadas en un sistema de adquisición de datos diseñado por el departamento de Instrumentación y desarrollo tecnológico del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

2.1 Protocolos.

Los corazones fueron equilibrados durante 15 minutos con solución K-H. Posteriormente, se siguieron tres diferentes protocolos: 1. El grupo control se perfundió constantemente durante 90 minutos. 2. El grupo isquemia-reperfusión (I/R) se mantuvo bajo flujo constante durante 30 minutos; después los corazones se sometieron a isquemia global por suspensión de flujo por otros 30 minutos, seguidos de una perfusión de 30 minutos. 3. El tercer grupo se trató con 250 nmol.L⁻¹ de Ru₃₆₀ durante 30 minutos y se siguió el mismo protocolo del grupo I/R (I/R+Ru₃₆₀).

3. Análisis de la Integridad mitocondrial.

3.1 Aislamiento de las mitocondrias.

Al final de los protocolos, los ventrículos del corazón se cortaron en pequeños pedazos y se dejaron digerir por 10 minutos con la proteasa nagarse, (ICN, Aurora, OH.) (10 mg.ventrículo⁻¹) en 10 mL de medio helado de aislamiento (en mmol.L⁻¹): 250 sacarosa, 10 Tris, 1 EDTA; pH 7.3). Después de la digestión las muestras se centrifugaron a 11,000xg durante 10 minutos. La pastilla de tejido se lavó en el mismo medio sin la proteasa y se disgregó manualmente con un homogenizador de vidrio. Este homogenizado se centrifugó a baja velocidad (3,500xg) por 10 minutos para eliminar los restos de tejido y algunos organelos subcelulares; se recuperó el sobrenadante y se obtuvieron las mitocondrias tras centrifugar a 11,000xg durante 10 minutos. El precipitado se resuspendió e incubó durante 10 minutos en 250 mmol.L⁻¹ de sacarosa, 10 mmol.L⁻¹ Tris; pH 7.3. Finalmente, esta fracción enriquecida con mitocondrias se centrifugó a 11,000xg durante 10 minutos y se resuspendió en el mismo medio a una concentración aproximada de 20-40 mg.mL⁻¹.

3.2 Ensayo de la respiración mitocondrial.

El consumo de oxígeno mitocondrial se midió mediante oximetría polarográfica con un electrodo tipo Clark. Los experimentos se llevaron a cabo a 25°C en 1.5 mL de un medio de respiración con la siguiente composición (mmol.L⁻¹): 125 KCl, 10 HEPES y 3 KH₂PO₄; pH 7.3. La respiración se inició agregando la de proteína mitocondrial. La respiración en estado 4 se evaluó con 10 mmol.L⁻¹ de succinato más 1 µg.mL⁻¹ de rotenona. La respiración en estado 3 se estableció por la adición de 200 µmol.L⁻¹ de ADP. El control respiratorio (CR) se calculó como la relación entre la velocidad en estado 3 y la velocidad en estado 4 (Figura 9).

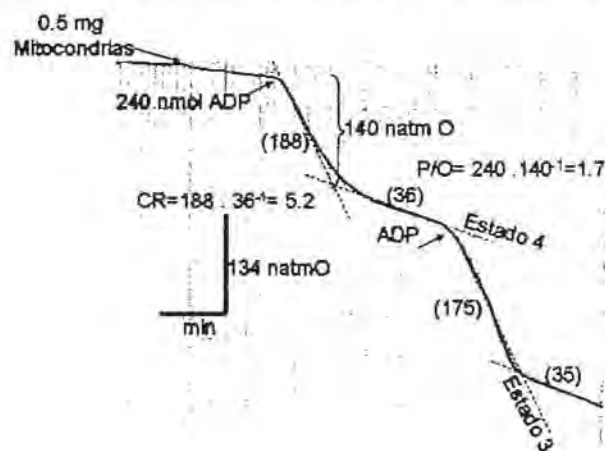


Figura 9. Trazo característico de la respiración mitocondrial. Entre paréntesis se indica la velocidad de consumo de oxígeno; se muestra el cálculo para obtener el CR y la relación ADP/O. El experimento representativo se realizó en un medio estándar de respiración a 25°C, pH 7.3.

3.3 Medición del potencial transmembranal mitocondrial ($\Delta\psi$).

El $\Delta\psi$ se determinó por medio del colorante catiónico safranina, según el método descrito por Wieckowski y Wojtczak en 1998 (127). A un medio de respiración con $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de safranina, se le agregaron 2 miligramos de proteína mitocondrial. En un curso temporal se midió la fluorescencia a 495 nm de excitación y 586 nm de emisión.

3.4 Actividad del UCam.

El transporte de calcio mitocondrial se determinó de forma cuantitativa (técnica de filtración de $^{45}\text{Ca}^{2+}$) y con el indicador metalocrómico Arsenazo III.

En la determinación cuantitativa, se incubaron 2 mg de proteína mitocondrial en 3 mL de medio estándar con la siguiente composición (en mmol.L^{-1}): 125 KCl, 10 HEPES, 10 succinato, 3 Pi, 0.5 EGTA, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de rotenona y $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ libre (actividad específica $1000 \text{ cpm.nmol}^{-1}$) usando el programa Chelator (Th. Schoenmakers, Nijmegen, Netherlands), pH 7.3.

Después, a diferentes tiempos se filtraron alícuotas ($300 \mu\text{L}$) a través de un filtro millipore con un tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ y se lavó con KCl 0.1 mmol.L^{-1} . La radiactividad contenida en las mitocondrias se midió en un contador de centelleo (Beckman, Ramsey, MN).

La entrada y salida de calcio también se midió por medio del indicador metalocrómico Arsenazo III. En un medio de ensayo que contenía (en mmol.L^{-1}): 125 KCl, 10 HEPES, 10 succinato, 3 Pi, 0.5 EGTA, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de rotenona, $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ Arsenazo III y $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de calcio libre, pH 7.3. Los movimientos de calcio se midieron en un espectrofotómetro de doble haz. Las longitudes de onda utilizadas fueron (675-685 nm).

4. Determinación de la actividad de la piruvato deshidrogenasa activa (PDHa).

Para medir esta actividad enzimática, se tomó 0.5 g de tejido homogenizado en N_2 líquido y se transfirió a 5 mL de una solución fría de arresto, de la siguiente composición (en mmol.L^{-1}): 50 HEPES, 3 EGTA, 25 NaF, 1 dicloroacetato, 1 DTT y Tritón X-100 al 0.1 % (v/v), pH 7.1. Con esta mezcla se solubilizaron las enzimas y se evitó la interconversión de PDH activa en inactiva (128). Este homogenizado se centrifugó a $4000 \times g$ por 10 minutos y se le agregó $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Leupeptina y $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de PMSF para inhibir la actividad de proteasas de cisteína y serina.

Alrededor de $400 \mu\text{L}$ de homogenizado se agregaron a 1.6 mL del medio de reacción de la siguiente composición mmol.L^{-1} : HEPES 40, MgCl_2 0.8, TPP 0.18, NAD^+ 2, CoA 0.08, DTT 0.8 y rotenona 0.002, (dado que el sustrato de la reacción es el piruvato, este se administró por medio de un sistema regenerador que consiste en lactato 10 mmol.L^{-1} , NADH 1 mmol.L^{-1} y lactato deshidrogenasa). La cuantificación de la forma activa de la enzima (especie desfosforilada), se llevó a cabo midiendo el aumento de la absorbencia (340nm) que acompaña la aparición de NADH acoplado a la descarboxilación de piruvato por la PDH:

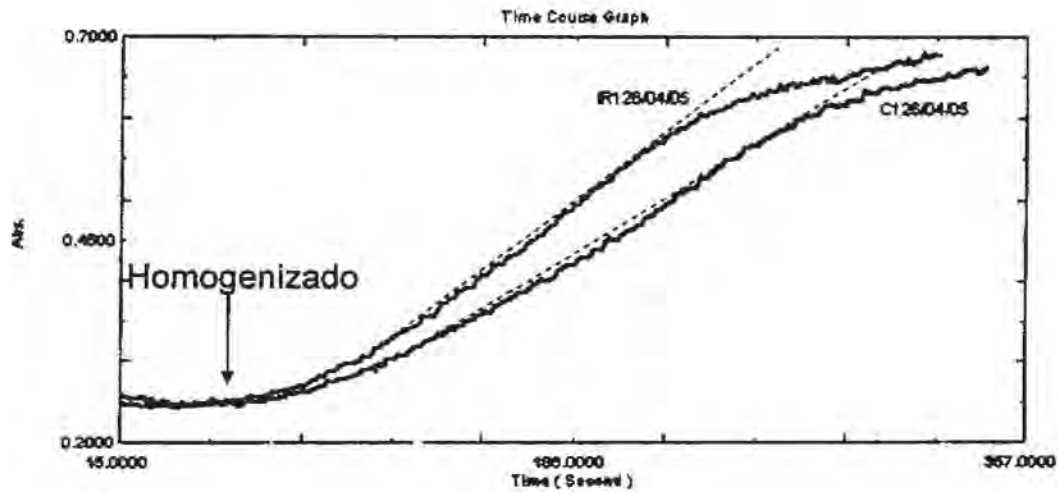
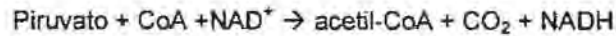


Figura 10. Trazo característico de la medida de PDHa en homogenizados de corazón. En la figura se observa la actividad de corazones controles (C123/04/05) y reperfundidos (IR126/04/05). Se determinó el incremento en la absorbencia a 340nm.

5. Contenido de calcio libre y total en mitocondria.

El contenido de calcio se midió en mitocondrias aisladas de los ventrículos sometidos a los diferentes protocolos, utilizando un método para minimizar la redistribución de calcio (129). El calcio libre se determinó como describieron Moreno-Sánchez y Hansford en 1988 (130), usando el indicador fluorescente FLUO-3AM, considerando una constante de disociación de 400 nmol.L^{-1} . El calcio total se midió por medio de espectrofotometría de absorción atómica, usando CaCO_3 como estándar, de acuerdo con lo descrito por Pepe en 1999 (131).

6. Unión de $^{103}\text{Ru}_{360}$ en preparaciones de corazón aislado.

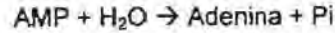
Los corazones aislados se equilibraron 15 minutos con el medio K-H; posteriormente se agregó 250 nmol.L^{-1} de $^{103}\text{Ru}_{360}$ y se perfundió durante 30 minutos. Para eliminar la unión inespecífica se perfundió 30 minutos más con la solución K-H sin el inhibidor radiactivo.

Los corazones se homogenizaron y las fracciones mitocondrial y microsomal se separaron por centrifugación diferencial. En estas fracciones se determinó la emisión de radiactividad.

7. Pureza en las fracciones microsomal y mitocondrial.

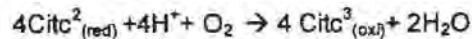
Para determinar la pureza de las fracciones se determinó la actividad de citocromo *c* oxidasa como enzima marcadora para mitocondria, D-glucosa 6 fosfato fosfohidrolasa para el retículo sarcoplásmico y 5-ribonucleótido fosfohidrolasa para la sarcolema.

La actividad de 5'-ribonucleótido fosfohidrolasa (E.C. 3.1.3.5) se determinó de acuerdo con el método de Glastris y Pfeiffer (132), midiendo la liberación de fosfato del AMP, de acuerdo con la siguiente reacción:



En un medio de reacción (1 mL) de la siguiente composición (en mmol.L⁻¹): 200 Tris- HCl, 20 AMP, 20 MgCl₂, pH 8.5, a 37°C se agregaron 250 µg de proteína de la fracción mitocondrial, microsomal o citosólica. Al inicio (tiempo cero) y después de 20 minutos de la reacción, se tomaron alícuotas de 0.3 mL y se mezcló en un tubo con 0.7 mL de una solución para cuantificar fosfatos que contenía 0.1 mL de ácido ascórbico 10% (w/v), 0.6 mL de molibdato de amonio 0.42% en 1N de H₂SO₄. Los tubos para la cuantificación de fosfato se incubaron por 20 minutos a 45°C y se midió la absorbencia a 820 nm. La curva utilizada para la determinación de fosfatos consideraba concentraciones entre 20-200 µmol.L⁻¹.

La actividad de citocromo oxidasa (E.C. 1.9.3.1) se determinó de acuerdo con el método descrito por Ferguson-Miller y cols. (133). La determinación se llevó a cabo midiendo la reducción de oxígeno (consumo de oxígeno), como consecuencia de la oxidación de citocromo c, de acuerdo con la siguiente reacción:



La actividad de esta enzima se midió en un oxímetro con un electrodo tipo Clark, en un medio de reacción (2 mL) de la siguiente composición (en mmol.L⁻¹): 25 Tris/acetato, 7 ascorbato (de una solución "madre" fresca), 0.3% de Tween 20(v/v), 0.7 TMPD (de una solución "madre" fresca), 0.25 µmol.L⁻¹ CCCP, 0.5 µmol.L⁻¹ de antimicina, pH 7.4. La adición de 0.25-1 mg de proteína de la fracción mitocondrial, microsomal o citosólica produce una ligera línea base que debe sustraerse a la velocidad de consumo de oxígeno después de la adicción de 5 µmol.L⁻¹ de citocromo c. Esta actividad fue sensible a cianuro de potasio (Figura 11).

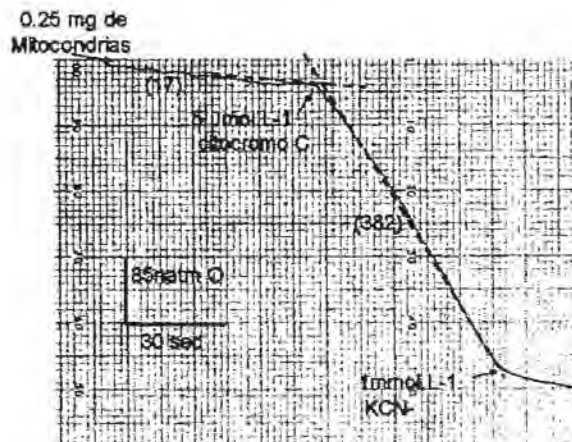
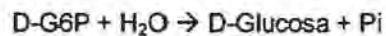


Figura 11. Trazo característico de la medición de citocromo oxidasa. Como se observa la actividad fue sensible al KCN. El experimento se realizó a 25°C y pH 7.4.

La actividad de D-glucosa-6- fosfato deshidrogenasa se evaluó de acuerdo al método descrito por Colilla y cols. (134). La determinación de la actividad de esta enzima se llevó a cabo midiendo la liberación de fosfato de la glucosa-6-fosfato (G6P), de acuerdo a la siguiente reacción:



La actividad de la enzima se determinó en un medio de reacción (0.45 mL) de la siguiente composición (en mmol.L⁻¹): 55 G6P, 8 histidina, 2 EDTA, pH 6.5, para iniciar la reacción se agregaron 500 µg de proteína de la fracción mitocondrial, microsomal o citosólica. Después de 30 minutos de la reacción a 37°C, la proteína se precipitó con 2.5 mL de TCA frío al 8% (v/v). Las muestras se dejaron en hielo durante 20 minutos y se centrifugaron a 1000xg por 10 minutos. Se tomó una alícuota del sobrenadante (1 mL) y se mezcló con 0.25 mL de una solución para cuantificar fosfatos que contenía molibdato de amonio 2.5% disuelto en 2.5 mmol.L⁻¹ de H₂SO₄ y 0.1mL de una solución reductora (0.5 g de 1-amino-2 naftol-4 ácido sulfónico y 6 g de Na₂SO₃ anhidro disueltos en 200 mL de NaHSO₃ al 15 %). Finalmente se calentaron los tubos a 100°C por 10 minutos y una vez que se enfriaron, se midió la absorbencia a 820 nm. La curva utilizada para la determinación de fosfatos consideraba concentraciones entre 1-50 µmol.L⁻¹.

8. Transporte de calcio en vesículas de retículo sarcoplásmico.

8.1 Preparación de las vesículas de retículo sarcoplásmico.

Las vesículas de retículo sarcoplásmico (VRS) se prepararon a partir de ventriculos cardiacos congelados y pulverizados en nitrógeno líquido. En 30 mL de una solución 20 mmol.L⁻¹ de Tris-malato (6.8 pH), 0.9% de NaHCO₃, se disolvieron 10 gramos de tejido pulverizado; posteriormente la mezcla se homogenizó en un Polytron (Brinkmann Instrument Co. Switzerland) durante 30 segundos (tres ciclos) a una velocidad aproximada de 1500 rpm.

El homogenizado se centrifugó a 650xg durante 5 minutos; después se aumentó la velocidad a 4,000xg por 15 minutos más. El sobrenadante se filtró a través de dos capas de gasa y se centrifugó nuevamente durante 20 minutos a 8,000xg; el sobrenadante resultante se centrifugó a 40,000xg durante 45 minutos.

La pastilla se resuspendió suavemente en una solución (en mmol.L⁻¹): 20 Tris-malato, 600 KCl, pH 6.8 y se centrifugó por otros 45 minutos a 40,000xg. La pastilla enriquecida con membranas de RS se resuspendió en una solución (en mmol.L⁻¹): 100 KCl, 20 Tris-malato, 0.001 leupeptina, 0.001 pepstatina, 0.2 PMSF y 0.0001 aprotinina, pH 6.8 y se guardó a -70°C hasta su uso.

8.2 Captación de calcio en las VRS.

La entrada de calcio dependiente de ATP se determinó utilizando la técnica de filtración, incubando 1 mg de VRS durante una hora en ausencia y presencia de 300 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de rianodina, 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ RR ó 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ Ru_{360} en un medio que contenía (en mmol.L^{-1}): 100 KCl, 20 Tris-malato, pH 6.8 y 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de calcio. La entrada de calcio se inició, tras la adición de 10 volúmenes de un medio que contenía (en mmol.L^{-1}): 100 KCl, 20 Tris-malato, 5 Mg-ATP, 10 oxalato de sodio, 5 azida de sodio, 0.1 EGTA, 0.1 EDTA y 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de ^{45}Ca libre (Act esp. 3,000 cpm.nmol^{-1}) a 25° C. La captación de calcio en la VRS se midió por el método de filtración antes descrito.

8.3 Salida de calcio de las VSR.

La liberación de calcio de VRS, se determinó de acuerdo con el método de Meissner y cols. (135), favoreciendo primero la carga pasiva de calcio dentro de las VRS: 20 mg de proteína se incubaron durante una hora en un medio que contenía (mmol.L^{-1}): 5 $^{45}\text{CaCl}_2$ (2,000 cpm.nmol^{-1}), 100 KCl, 10 Tris-malato, pH 6.8. La salida de calcio se indujo diluyendo 150 veces con un medio iso-osmótico sin marca radiactiva. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y se filtraron rápidamente a través de un filtro con tamaño de poro de 0.45 μm y se lavaron con 3 mL de una solución que contenía 100 mmol.L^{-1} de KCl. La radiactividad retenida en las vesículas se determinó en un contador de centelleo.

8.4 Competencia entre la unión de rianodina y los complejos de rutenio en VRS.

La unión específica de [^3H]-rianodina se determinó usando 50 μg de proteína de VRS y 6 nmol.L^{-1} de [^3H]-rianodina (57 Ci.mmol^{-1} NEN, Boston, MA). Las VRS se incubaron por 2 horas a 25°C en 100 μL de un medio estándar de incubación, que contenía (en mmol.L^{-1}): 600 KCl, 20 HEPES-K, 1 EGTA a pH 6.8, más suficiente CaCl_2 para alcanzar 100 nmol.L^{-1} , o 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de calcio libre, concentraciones que se utilizaron para cerrar ó abrir respectivamente los RyR. La unión inespecífica de rianodina se determinó con 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de rianodina.

PROTOCOLOS UTILIZADOS EN EL MODELO DE RATA COMPLETA (Modelo *in vivo*).

9. Inducción de la reperfusión *in vivo*.

Las ratas se anestesiaron con pentobarbital (50 mg.Kg^{-1} de peso corporal i.p.) y se les realizó una traqueotomía para proporcionar apoyo ventilatorio. Para el registro de ECG en derivación DII, (polarógrafo GRASS modelo 79 D) se conectaron a los animales 3 electrodos de superficie. La tensión arterial se registró mediante un transductor de presión conectado a la arteria femoral a través de una cánula heparinizada. Para producir la isquemia se realizó toracotomía izquierda; el corazón se expuso 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 ECG y de la tensión arterial durante los últimos 20 segundos de cada minuto en la isquemia y en la reperfusión. Después de 10 minutos de isquemia/reperfusión se obtuvieron muestras sanguíneas del ventrículo izquierdo. Se obtuvo el plasma para determinar la liberación de enzimas marcadoras de daño tisular: CK y LDH cuya actividad se determinó por fotocolorimetría (136).

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

9.1 Protocolos de reperfusión *in vivo*.

Las ratas se dividieron en tres grupos: 1. Controles (simuladas), 2. No tratadas y reperfundidas (I/R) y 3. Tratadas con el inhibidor y reperfundidas (I/R+ Ru₃₆₀). El grupo control fue sometido a toracotomía, pero no al protocolo de isquemia/ reperfusión, mientras que el grupo reperfundido se sometió al protocolo de isquemia/ reperfusión. Al grupo tratado se le administraron 28 µg.kg⁻¹ de Ru₃₆₀ a través de la vena femoral, 30 minutos antes de la isquemia. La dosis elegida fue la mínima a la que se observó un máximo efecto protector.

Para las determinaciones de integridad mitocondrial se siguieron los mismos protocolos que para mitocondrias obtenidas de corazones aislados.

La actividad de la aconitasa mitocondrial [EC. 4.2.1.3] se determinó espectrofotométricamente, monitoreando la desaparición de cis-aconitato a 240 nm ($\epsilon = 3.6 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) de acuerdo con el método descrito previamente por Hoerter y cols. (137), en un medio estándar de reacción que contenía (mmol.L⁻¹): 30 citrato de sodio, 50 Tris-HCl, 0.6 MnCl₂; pH 7.4. Se utilizó la velocidad lineal para determinar la actividad enzimática.

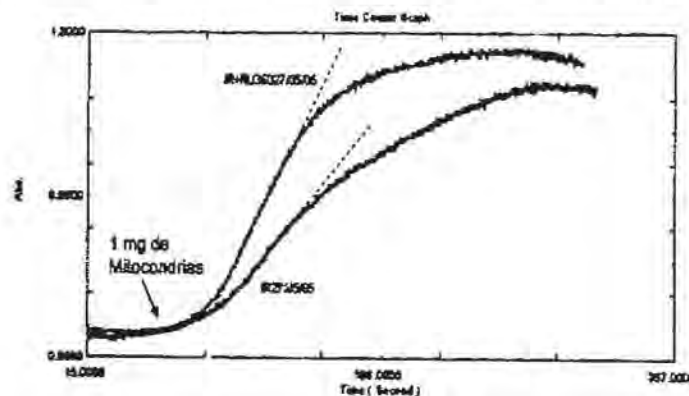


Figura 12. Trazo característico de la actividad de aconitasa mitocondrial. En la figura se observa la actividad de mitocondrias obtenidas de corazones I/R (IR27/05/05) y de corazones I/R+Ru₃₆₀ (IR+Ru36027/05/05). El experimento representativo se realizó en un medio estándar a 25°C, pH 7.4.

10. Cuantificación de Ru₃₆₀ circulante y unido al tejido cardíaco.

A las ratas anestesiadas y bajo respiración asistida, se les administró a través de la vena femoral la dosis protectora de Ru₃₆₀. A diferentes tiempos se tomaron alícuotas de sangre de la cavidad ventricular izquierda y los corazones fueron removidos de la caja torácica. Las alícuotas de sangre se almacenaron en tubos con vacío que contenían 3.8% de citrato de sodio, para evitar la coagulación. Los corazones fueron montados y perfundidos por 10 minutos en un sistema de Langerdorff para quitarles la sangre; después los corazones fueron liofilizados y digeridos usando HNO₃ suprapuro, HCl y H₂O₂ al 30% en la siguiente relación: 6:2:1. La misma mezcla se utilizó para digerir la sangre. Por medio de espectroscopia de emisión óptica-inductivamente acoplada a plasma (ICP-OES) se determinó el contenido de rutenio (Simultaneous Optima 4300 DV, Perkin Elmer CT, US). Se prepararon estándares de rutenio (4-15 µg.L⁻¹) a partir de una solución primaria (1 mg.L⁻¹ PE Pure Perkin Elmer). Las muestras fueron medidas a longitud de onda de 240.272nm. En esta longitud no se detectó interferencia en el espectro. Para cada grupo de muestras, en cada ocasión se prepararon curvas de calibración y blancos. El contenido de Ru₃₆₀ se calculó con base en su peso molecular (550.8 g.mol⁻¹).

11. Estadísticas.

Los resultados se expresan como media ± error estándar. La significancia estadística (P≤0.05) se determinó por el análisis de variables discretas (ANOVA), usando el programa PRISM.

Vi.- RESULTADOS
1. CORAZÓN AISLADO

En esta parte del proyecto se evaluó el efecto protector del Ru₃₆₀ en el daño por reperfusión post-isquémica en un modelo de corazón aislado, midiendo la recuperación cardiaca durante la reperfusión. Asimismo determinamos el efecto protector a nivel mitocondrial analizando la integridad mitocondrial y el transporte de calcio. Adicionalmente se determinó la cantidad del ¹⁰³Ru₃₆₀ asociada a diversas fracciones celulares en el órgano aislado, así como el transporte del calcio en RS en presencia de Ru₃₆₀, con el fin de establecer si este inhibidor podía interactuar con los sistemas de transporte de calcio en retículo.

El Ru₃₆₀ preserva la función contráctil y el trabajo cardiaco durante la reperfusión.

Diversos grupos han demostrado que los complejos de rutenio permean pobremente a través de las membranas celulares; incluso se ha sugerido que sólo penetran cuando hay daños en la membrana plasmática (138,139). Sin embargo, Matlib y cols., demostraron que el ¹⁰³Ru₃₆₀ ingresa lentamente a las células miocárdicas intactas, se acumula en el citosol y puede inhibir el transporte de calcio mitocondrial (126). Con el fin de determinar su efecto protector en el daño por reperfusión, perfundimos durante 30 minutos este inhibidor en corazones aislados y posteriormente los sometimos a un protocolo de I/R. El Ru₃₆₀ mostró un efecto protector dependiente de la dosis (Figura 13). La recuperación máxima del trabajo cardiaco durante la reperfusión, fue de aproximadamente 80% en corazones tratados con 0.25, 0.5 y 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de Ru₃₆₀. La administración de dosis mayores revirtió el efecto protector del inhibidor, posiblemente al alterar la función contráctil del corazón, como se ha reportado para el RR (140).

Para conocer más acerca del efecto de diversas concentraciones de este inhibidor, probamos el efecto de concentraciones crecientes de Ru₃₆₀ sobre la actividad contráctil de corazones controles. La tabla 1 muestra que las bajas concentraciones de Ru₃₆₀ (0.1-5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) mantienen los valores controles de presión intraventricular y no alteran la conductividad del órgano, mientras que altas dosis (15-25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) disminuyen el desarrollo de la fuerza contráctil, elevando la tensión de reposo en los corazones controles.

Con base en estos resultados, decidimos usar la mínima concentración que ejerció un efecto protector a los 30 minutos de reperfusión (Figura 13) y que además no tuvo efecto sobre el desarrollo de fuerza contráctil (250 nmol.L⁻¹).

Al analizar la temporalidad del daño, encontramos que durante los primeros minutos de la reperfusión, los corazones I/R mostraron una disminución progresiva del trabajo cardiaco (Figura 14A). Después de 30 minutos de reperfusión sólo mantuvieron un 30% de su trabajo inicial. En contraposición, los corazones tratados con Ru₃₆₀, paulatinamente aumentaron su contractilidad durante la reperfusión, hasta alcanzar el 85% de los valores controles.

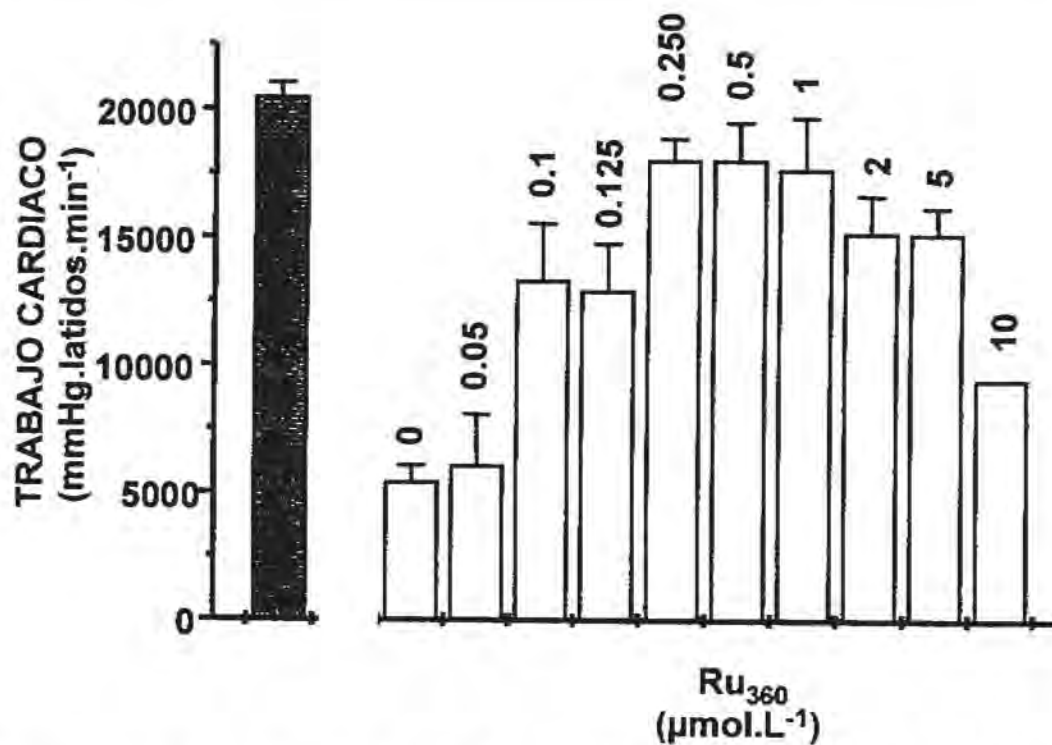


Figura 13. Efecto protector contra el daño por reperfusión de diferentes concentraciones de Ru₃₆₀. Los valores de trabajo cardiaco que se muestran corresponden al minuto 30 de la reperfusión. Para cada concentración se perfundió el inhibidor durante 30 minutos, en al menos tres diferentes preparaciones de corazón aislado, excepto 10 μmol.L⁻¹ n=2. La barra sombreada representa el trabajo cardiaco de corazones controles después de 60 minutos de perfusión continua.

Desarrollo de fuerza contráctil (mm Hg)

Concentración de Ru ₃₆₀ (μmol.L ⁻¹)	10 minutos	20 minutos	30 minutos
0	93±5	92±7	93±6
0.1	93±15	93±10	97±18
0.25	98±5	96±7	97±6
0.5	97±13	94±12	93±14
2	94±6	87±16	83±11
5	90±14	79±14*	76±9*
8	68±15*	74±11*	68±12*

Tabla 1. Efecto del Ru₃₆₀ sobre el desarrollo de fuerza contráctil en los corazones controles. El desarrollo de fuerza contráctil fue determinado a diferentes tiempos. Los valores mostrados representan la media ± ES de al menos 3 experimentos diferentes. *P < 0.05 diferencia estadística vs controles para cada tiempo

Se relacionaron las propiedades contráctiles y el consumo de oxígeno del corazón aislado, para evaluar la recuperación de los corazones tratados con el Ru₃₆₀ (Figura 14B). El índice de eficiencia del metabolismo oxidativo en términos de la función contráctil, muestra el acoplamiento entre la respiración mitocondrial y la contracción del miocardio (122).

Antes de la isquemia, los corazones tratados con Ru₃₆₀ mostraron un ligero aumento (no significativo estadísticamente) en la eficiencia contráctil, en comparación con los corazones controles. Después de 20 minutos de reperfusión, los corazones I/R+Ru₃₆₀ mostraron una recuperación total en este parámetro; por el contrario, los corazones I/R mostraron un desacoplamiento entre la función contráctil y el metabolismo oxidativo mitocondrial, resultado comparable con lo reportado por otros grupos (122,141).

El Ru₃₆₀ mantiene la integridad mitocondrial durante la reperfusión.

El desacoplamiento energético observado en los corazones I/R, sugiere daño a nivel mitocondrial, por lo que se aislaron y caracterizaron las mitocondrias obtenidas de los ventrículos de estos corazones y de los tratados con el inhibidor. Las actividades respiratorias de las mitocondrias aisladas se presentan en la tabla 2. En el panel A se muestran las velocidades de respiración a concentraciones bajas de calcio (sólo el calcio contaminante del amortiguador). Las mitocondrias obtenidas de corazones I/R, mostraron una disminución en la velocidad de respiración del 40% en presencia de ADP, en comparación con los valores obtenidos en las mitocondrias controles. La velocidad de respiración de las mitocondrias obtenidas de corazones reperfundidos tratados previamente con Ru₃₆₀, no mostró diferencia con los valores observados en mitocondrias controles. La velocidad de respiración en estado 4 y el CR mostraron la misma tendencia, indicando que el tratamiento con Ru₃₆₀ mantiene la integridad mitocondrial después de la reperfusión.

Con anterioridad se ha demostrado que las mitocondrias obtenidas de un tejido reperfundido son más sensibles que las mitocondrias controles al desacoplamiento entre la fosforilación oxidativa y la respiración (142). En la misma tabla (panel B), se observa que al aumentar la concentración de calcio, las mitocondrias obtenidas de corazones controles y de corazones I/R+Ru₃₆₀, mantuvieron un CR de 5.0 ± 0.6 y 5.4 ± 0.42 respectivamente. En contraste, en las mitocondrias de corazones I/R, se comprometió su habilidad para sintetizar ATP, pues mostraron un CR de 1.8 ± 0.8 .

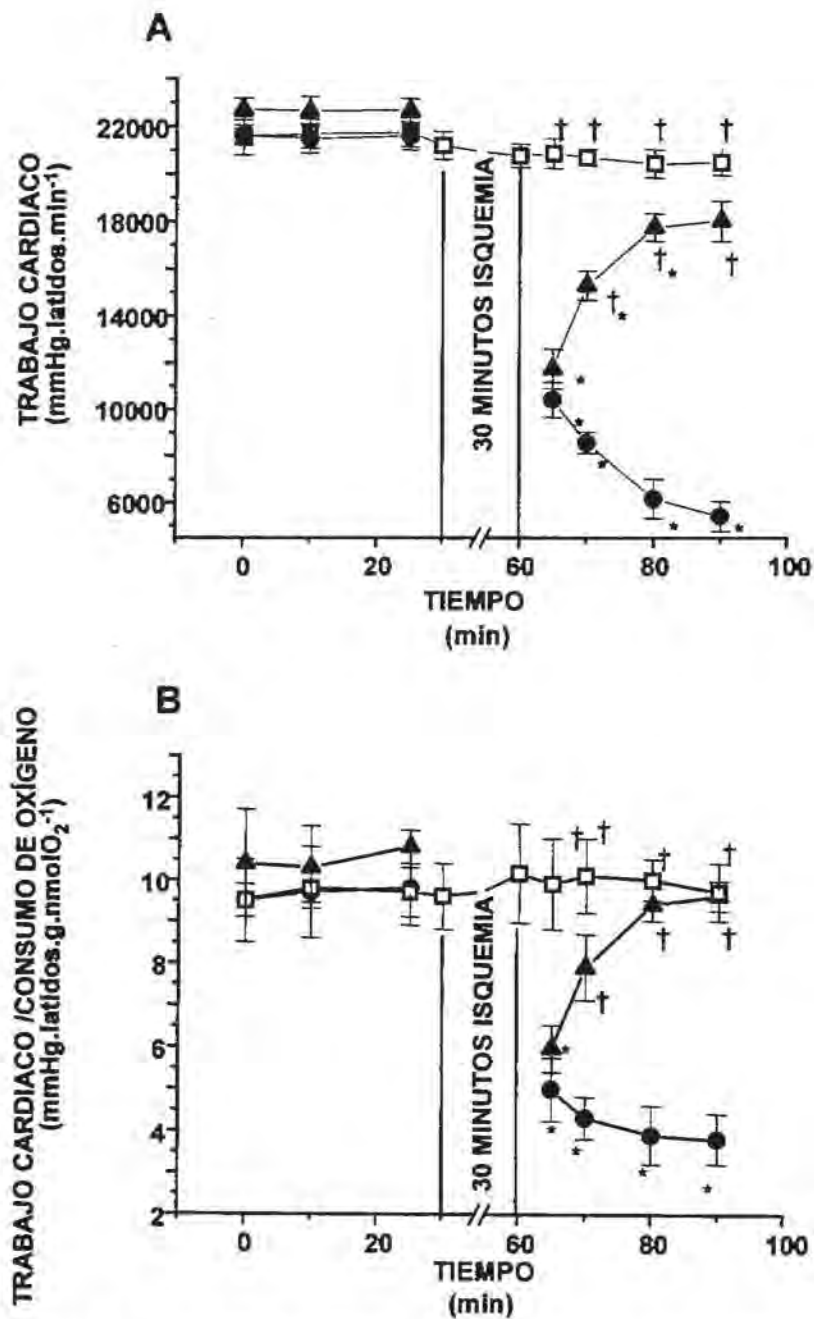


Figura 14. Efecto protector del Ru₃₆₀ sobre las funciones cardíacas de corazones reperfundidos. A) Curso temporal del efecto del Ru₃₆₀ sobre el trabajo cardíaco. (□) representa los valores de corazones controles durante los 90 minutos que duró el experimento; (●) representa valores de corazones reperfundidos por 30 minutos después de 30 minutos de isquemia (I/R) y (▲) representa los valores de corazones perfundidos con 250nmol.L⁻¹ de Ru₃₆₀ durante 30 minutos y que después se sometieron al protocolo de isquemia-reperfusión. B) Eficiencia contráctil en términos del metabolismo oxidativo. Los símbolos representan las mismas condiciones que arriba. Los valores representan la media de al menos 20 experimentos diferentes para cada condición ± ES. *P ≤ 0.05 vs Control. †P ≤ 0.05 vs I/R.

Velocidades de respiración
(nátomos O.min⁻¹.mg⁻¹ proteína)

A	Velocidades de respiración		
	Estado 3	Estado 4	CR
Control	373±21†	65±9†	5.9±0.85†
I/R	224±12*	54±5*	4.1±0.46*
I/R+ Ru ₃₆₀	362±16†	60±9†	6.0±0.89†

B	Velocidades de respiración		
	Estado 3	Estado 4	CR
Control	427±32†	84±8	5.0±0.6†
I/R	151±14*	81±9	1.8±0.8*
I/R+ Ru ₃₆₀	387±18*†	71±4*	5.4±0.42†

Tabla 2. Actividad respiratoria de mitocondrias aisladas a partir de corazones controles, reperfundidos (I/R) y sometidos a I/R previamente tratados con Ru₃₆₀. La actividad respiratoria se determinó en un medio con bajas concentraciones de calcio (A) y en un medio suplementado con 50 µmol.L⁻¹ de calcio (B). Los valores representan la media ± ES de al menos 5 diferentes experimentos. *P< 0.05 diferencia significativa vs control y †P< 0.05 vs I/R.

El Ru₃₆₀ evita la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial, en corazones reperfundidos.

Se ha propuesto que la apertura del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial es uno de los mecanismos para explicar el daño irreversible en el corazón reperfundido (4,5,6,110). Por ello, determinamos la apertura de este poro no selectivo midiendo el gradiente eléctrico transmembranal en las mitocondrias de los tres protocolos experimentales (Figura 15, panel superior). En las mitocondrias controles y en las obtenidas de tejido I/R+Ru₃₆₀, el potencial transmembranal se mantuvo después de la adición de 100 µmol.L⁻¹ de calcio: la depolarización transitoria indica el movimiento de calcio hacia la matriz mitocondrial (Trazo A y C). En contraste, en las mitocondrias obtenidas de corazones I/R esta concentración de calcio produjo una caída irreversible en el potencial transmembranal (Trazo B). El ΔΨ_m de las mitocondrias obtenidas de corazones controles y las obtenidas de corazones protegidos con Ru₃₆₀, fue sensible al desacoplante. La apertura del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial se caracteriza también por la liberación de calcio y de otros metabolitos de la matriz mitocondrial. En el panel inferior de la figura 15, se

muestra que el calcio se acumula en las mitocondrias controles (trazo A). En contraste, las mitocondrias aisladas de tejido I/R fueron incapaces de retener el calcio, como consecuencia de la apertura del poro (trazo B). La liberación de calcio en mitocondrias de corazones I/R se inhibió totalmente al agregar CSA, que es un potente inhibidor de la apertura del poro de transición (datos no mostrados). Las mitocondrias obtenidas de corazones tratados con Ru₃₆₀, no liberaron calcio, indicando que el poro permanece cerrado. Sin embargo, se observó una disminución de la velocidad de entrada de calcio en estas mitocondrias, sugiriendo una inhibición parcial en la actividad del uniportador de calcio.

La perfusión de Ru₃₆₀ inhibe la entrada de calcio mitocondrial.

Para determinar la interacción del Ru₃₆₀ y el UCam, medimos el transporte de calcio en mitocondrias obtenidas de corazones aislados, perfundiendo concentraciones crecientes de Ru₃₆₀. En la figura 16 se muestran los valores de velocidad inicial del transporte del calcio en mitocondrias obtenidas a partir de ventrículos de corazones tratados con concentraciones crecientes del inhibidor del transporte de calcio mitocondrial. Se observó una inhibición en el transporte de calcio dependiente de la concentración del Ru₃₆₀. La perfusión con 250 nmol.L⁻¹ de Ru₃₆₀, disminuye en un 30% la velocidad inicial de transporte de calcio. Concentraciones superiores a 15 µmol.L⁻¹, inhiben prácticamente por completo la actividad del UCam. Estos datos sugieren que la concentración mínima de perfusión que protege contra el daño por reperfusión, bloquea parcialmente la actividad de este transportador.

El Ru₃₆₀ disminuye la sobrecarga de calcio mitocondrial en corazones reperfundidos.

Los datos presentados a lo largo de este estudio sugieren que el Ru₃₆₀ evita el daño por reperfusión, evitando la sobrecarga de calcio mitocondrial. Para confirmar esta hipótesis medimos la concentración de calcio mitocondrial durante la reperfusión, previo tratamiento con el Ru₃₆₀.

La primer estrategia que utilizamos para estimar la concentración de calcio mitocondrial fue la medición de la actividad de piruvato deshidrogenasa activa (PDHa) en homogenizados de corazón después de los protocolos de I/R. La PDHa es activada por una fosfatasa sensible a calcio mitocondrial; esta aproximación tiene la ventaja de que las muestras se congelan inmediatamente y se evita la interconversión de la enzima, además este ensayo no es sensible a la redistribución de calcio (Figura 17).

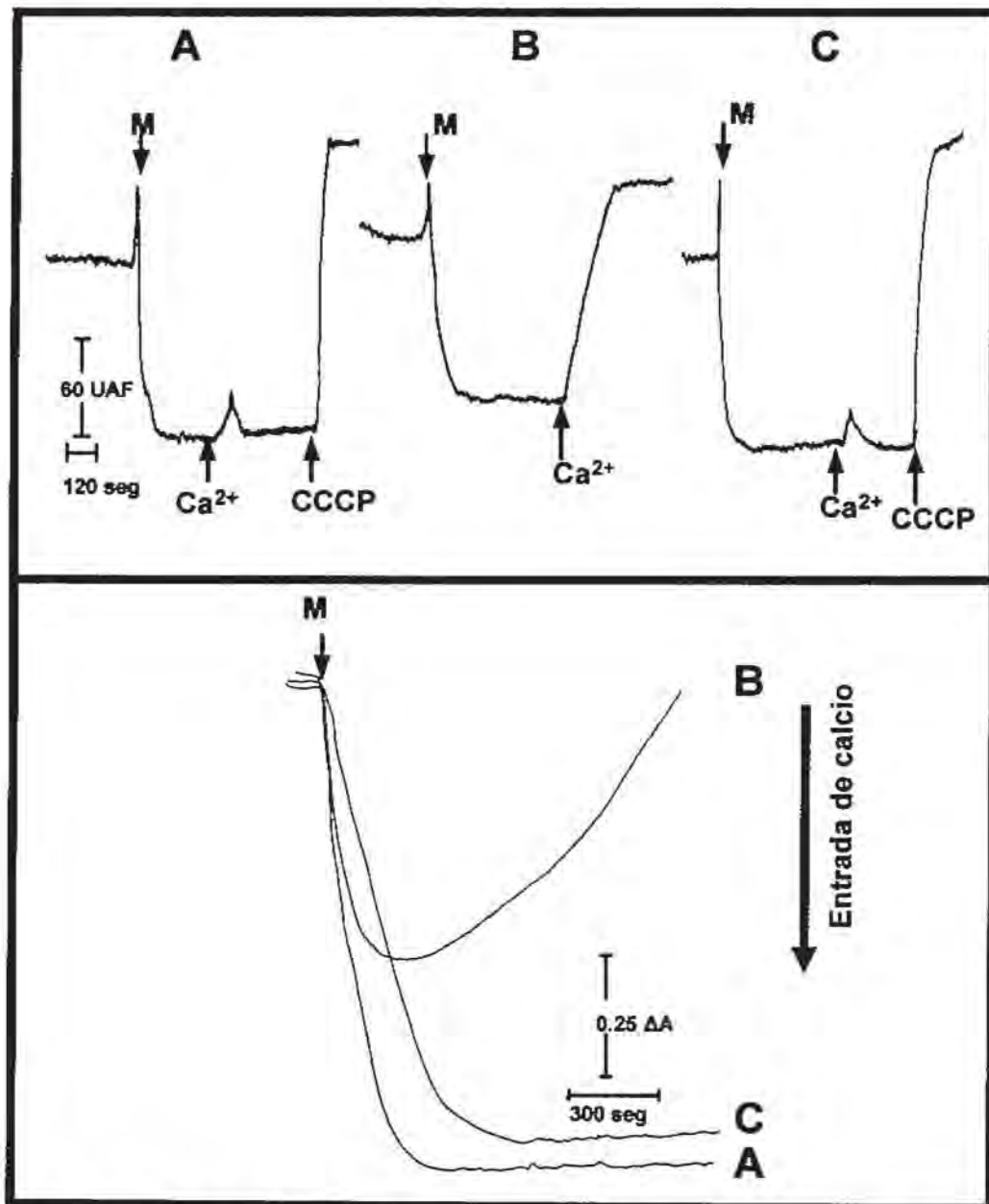


Figura 15. Efecto de la perfusión de Ru₃₆₀ sobre la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial en corazones I/R. El panel superior muestra el potencial transmembranal de mitocondrias obtenidas de corazones controles (Trazo A), corazones I/R (Trazo B) y I/R+Ru₃₆₀ (Trazo C). Donde se indica se agregaron 2 mg de proteína mitocondrial (M), 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de calcio o 0.2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de CCCP. El panel inferior muestra el transporte del calcio en mitocondrias obtenidas de corazones controles (Trazo A), corazones I/R (Trazo B) y I/R+Ru₃₆₀ (Trazo C). Los resultados que se muestran son representativos de al menos tres diferentes experimentos.

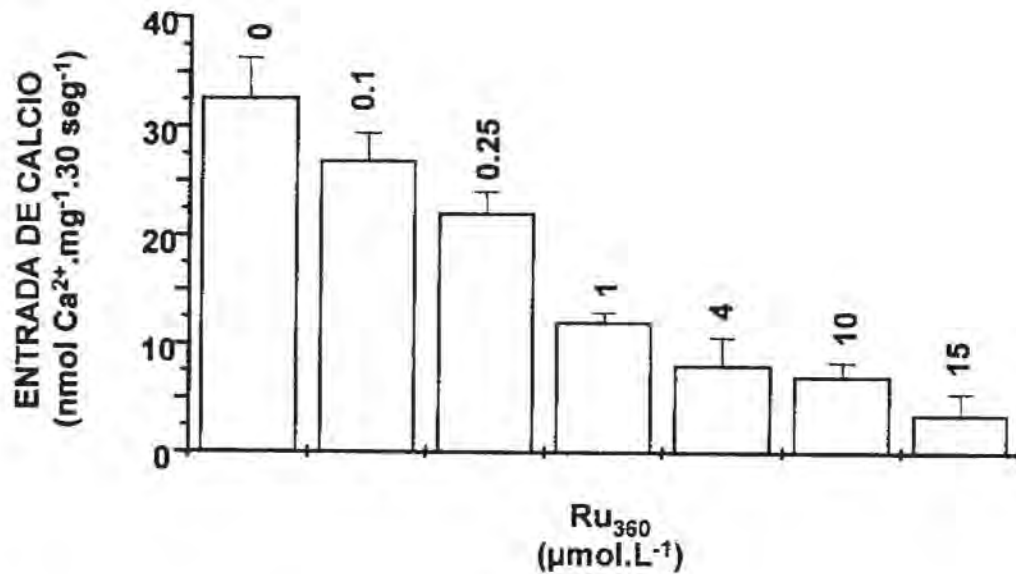


Figura 16. La perfusión del Ru₃₆₀ inhibe la entrada de calcio mitocondrial en corazones aislados. La velocidad inicial de entrada de calcio se determinó por medio de ⁴⁵CaCl₂ en mitocondrias obtenidas de corazones controles perfundidos con diferentes concentraciones de Ru₃₆₀. Los corazones fueron perfundidos durante 30 minutos con el medio KH adicionado con Ru₃₆₀ y después se lavaron 30 minutos con KH sin el inhibidor. Los datos representan la media ± ES de al menos 3 diferentes experimentos.

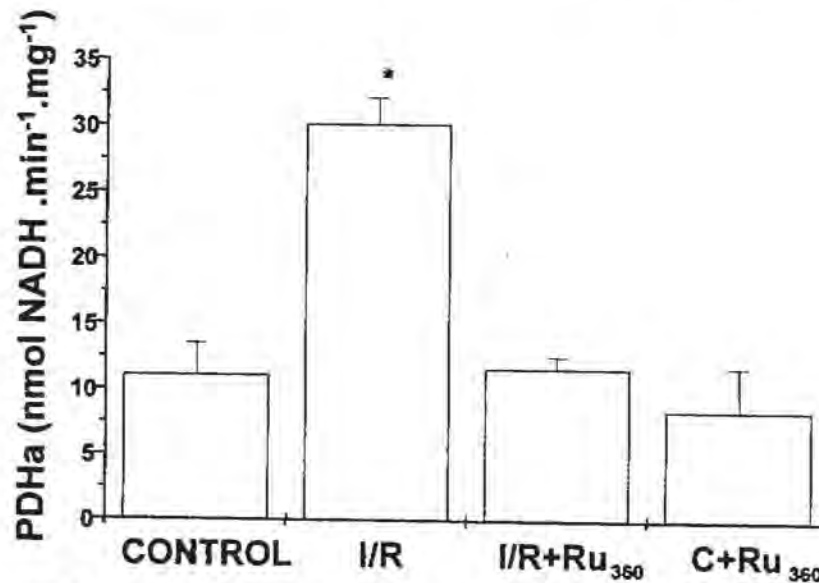


Figura 17. Efecto del Ru₃₆₀ sobre la activación del complejo de la piruvato deshidrogenasa por calcio mitocondrial. La actividad de PDHa fue determinada en homogenizados de corazones aislados, midiendo la producción de NADH. Los valores representan la media ± ES de al menos 4 diferentes experimentos. *P < 0.05 vs controles.

La actividad de PDHa aumentó tres veces en los corazones I/R, comparada con la actividad de los corazones controles. Los corazones tratados con Ru_{360} mostraron una disminución en la actividad de PDHa del 25% respecto a los niveles basales de la enzima en un corazón control. Los corazones tratados con el inhibidor y sometidos al protocolo de I/R no mostraron diferencias significativas en la actividad de PDHa comparada con la de corazones controles. También se determinó de forma directa la concentración de calcio libre mitocondrial por medio de fluorometría. Esta técnica considera la posible redistribución de calcio durante el aislamiento mitocondrial. Ya que los principales sistemas de transporte de calcio en las mitocondrias de corazón son el uniportador de calcio mitocondrial y el intercambiador $2Na^+/Ca^{2+}$, la técnica se fundamenta en la inhibición de los componentes anteriormente mencionados, adicionando a los medios de aislamiento RR y diltiazem. Posteriormente las mitocondrias se cargaron con el fluoróforo FLUO-3AM y se determinó el calcio libre mitocondrial antes y después de la reperfusión en corazones tratados con y sin el inhibidor (Figura 18).

La concentración de calcio libre mitocondrial en corazones controles antes de la isquemia fue de $229 \pm 9 \text{ nmol.L}^{-1}$, y aumentó hasta alcanzar $354 \pm 14 \text{ nmol.L}^{-1}$ después del protocolo de I/R. En contraste, las mitocondrias de los corazones tratados con Ru_{360} mantuvieron bajas concentraciones de calcio, i.e. $220 \pm 8 \text{ nmol.L}^{-1}$. En las mitocondrias de corazones tratados con Ru_{360} , se observó una disminución significativa en la concentración de calcio, un resultado esperado suponiendo una inhibición parcial del uniportador.

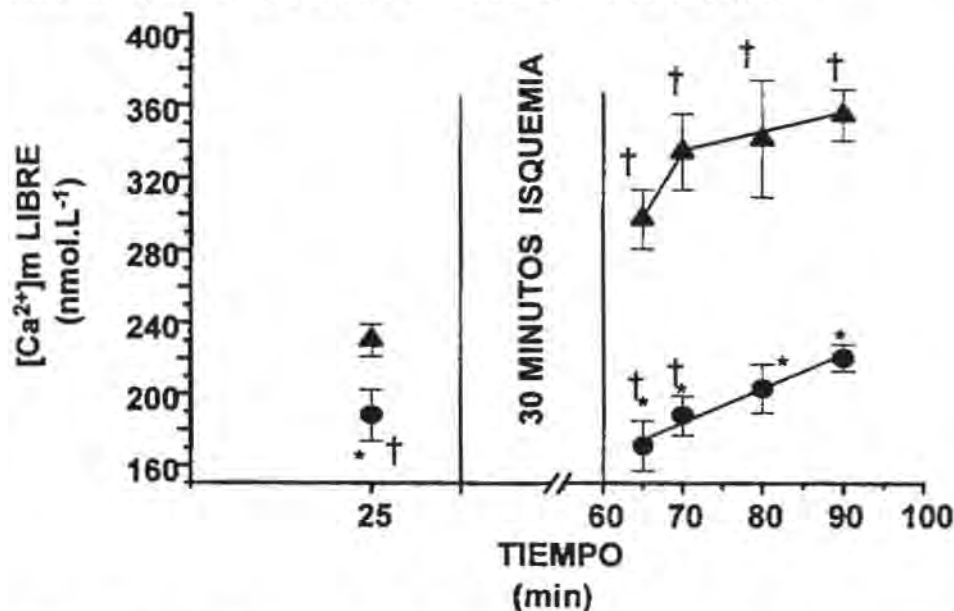


Figura 18. El Ru_{360} evita la sobrecarga de calcio durante la reperfusión. El calcio mitocondrial se determinó en mitocondrias aisladas de corazones I/R (●) y de corazones tratados con Ru_{360} (▲). Los datos presentados son la media \pm ES de al menos 3 diferentes experimentos. * $P \leq 0.05$ diferencia significativa vs corazones no tratados. † $P \leq 0.05$ vs valores basales (antes de la isquemia).

El aumento en el calcio libre mitocondrial se comparó con el contenido de calcio total. Las mitocondrias de corazones controles contenían 0.68 ± 0.15 nmoles de calcio.mg de proteína⁻¹, después de 30 minutos de reperfusión el contenido de calcio aumentó significativamente (2.16 ± 0.75 nmoles.mg⁻¹; $P \leq 0.05$ $n = 4$). El calcio total en las mitocondrias obtenidas de corazones protegidos con el inhibidor no cambió antes ni después de la reperfusión (0.78 ± 0.24 nmol.mg⁻¹; $n = 4$).

El ¹⁰³Ru₃₆₀ se asocia a diferentes fracciones celulares en el corazón aislado.

Determinamos la asociación de ¹⁰³Ru₃₆₀ a diferentes fracciones celulares relacionadas con el movimiento de calcio en la célula. Sorprendentemente, la fracción microsomal, enriquecida principalmente con RS y sarcolema, unió el doble del inhibidor que la fracción enriquecida con mitocondrias (2.3 ± 0.6 pmol ¹⁰³Ru₃₆₀.mg de proteína⁻¹ contra 1.2 ± 0.15 pmol ¹⁰³Ru₃₆₀.mg de proteína⁻¹; $n = 4$). La pureza de las dos fracciones se determinó midiendo la actividad de enzimas marcadoras (Tabla 3): D-glucosa 6 fosfato fosfohidrolasa EC[3.1.3.9] y 5'-ribonucleótido fosfohidrolasa EC[3.1.3.5] para la fracción microsomal y citocromo oxidasa EC[1.9.3.1] para la mitocondrial.

Encontramos 8% de la actividad total de D-glucosa 6 fosfato fosfohidrolasa en la fracción mitocondrial y alrededor del 7% de actividad de citocromo oxidasa en la fracción microsomal. Además, la actividad de 5'-ribonucleótido fosfohidrolasa (enzima marcadora de sarcolema) en la fracción microsomal, fue de 329.3 ± 42 $\mu\text{mol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$. En la fracción mitocondrial sólo se encontró 6% de la actividad detectada en microsomas. La actividad de 5'-ribonucleótido fosfohidrolasa en la fracción microsomal indica la presencia de sarcolema en esta preparación.

El Ru₃₆₀ no inhibe el transporte del calcio en RS.

La aparente contradicción de nuestros datos de unión, con previos reportes en los que el Ru₃₆₀ no tiene efecto sobre movimientos de calcio en el retículo, ni en el sarcolema, nos llevó a estudiar la naturaleza de la asociación del inhibidor con la fracción microsomal. La unión del ¹⁰³Ru₃₆₀ en microsomas, podría representar afinidad por componentes del RS, como el RyR, ya que se ha reportado que el RR es uno de los más potentes inhibidores de la liberación de calcio en RS (124).

Como primera aproximación evaluamos el efecto del Ru₃₆₀ sobre el sistema de entrada (SERCA) y el de salida (RyR) en VRS. El transporte de calcio en VRS se evaluó en presencia de rianodina, RR y Ru₃₆₀ (Figura 19). La entrada de calcio dependiente de ATP en VRS (panel A) aumentó a altas concentraciones de rianodina, debido a la inhibición del RyR. El RR aumentó en un 14% la captación de calcio; sin embargo, $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Ru₃₆₀ no

ejerció ningún efecto, al compararlo con la captación de VRS controles. En la misma figura (panel B), se determinó el curso temporal de la liberación de calcio a través del RyR en presencia de rianodina, RR y Ru₃₆₀. La rianodina y el RR inhibieron parcialmente la liberación de calcio, sin embargo el Ru₃₆₀ no provocó ningún efecto.

Enzima marcadora	Fracción mitocondrial	Fracción microsomal	Fracción citosólica
Citocromo oxidasa EC[1.9.3.1] (nátomosO.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	1482±376	108.5±46	34±16
D-glucosa 6 fosfato fosfohidrolasa EC[3.1.3.9] (µmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	2±0.88	25±7	5±3.5
5'-ribonucleótido fosfohidrolasa EC[3.1.3.5] (nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	20.4±7.3	329±134	ND.

Tabla 3. Actividades de las enzimas marcadoras de mitocondrias, RS y sarcolema en las diferentes fracciones. Las actividades representan la media de al menos 3 experimentos ± E.S. ND significa que no se determinó.

Mediante ensayos de unión de alta afinidad de [³H]rianodina (que se considera como indicador de estado de apertura del RyR), obtuvimos evidencia adicional para apoyar la idea que el Ru₃₆₀ no afecta la actividad del RyR. La unión de rianodina al RyR (canal cerrado) fue mínima en presencia de 100 nmol.L⁻¹ de calcio libre y aumentó hasta un 92% al aumentar la concentración de calcio libre a 100 µmol.L⁻¹ (canal abierto). En esta condición (canal abierto), probamos el efecto del RR y Ru₃₆₀ sobre la unión de la [³H]-rianodina. La adición de 10 µmol.L⁻¹ de RR disminuyó en un 86% la unión de rianodina, de acuerdo con reportes previos del grupo de Meissner (143). Concentraciones de hasta 10 µmol.L⁻¹ de Ru₃₆₀, sólo disminuyeron la unión en un 7% (Figura 191, Panel C).

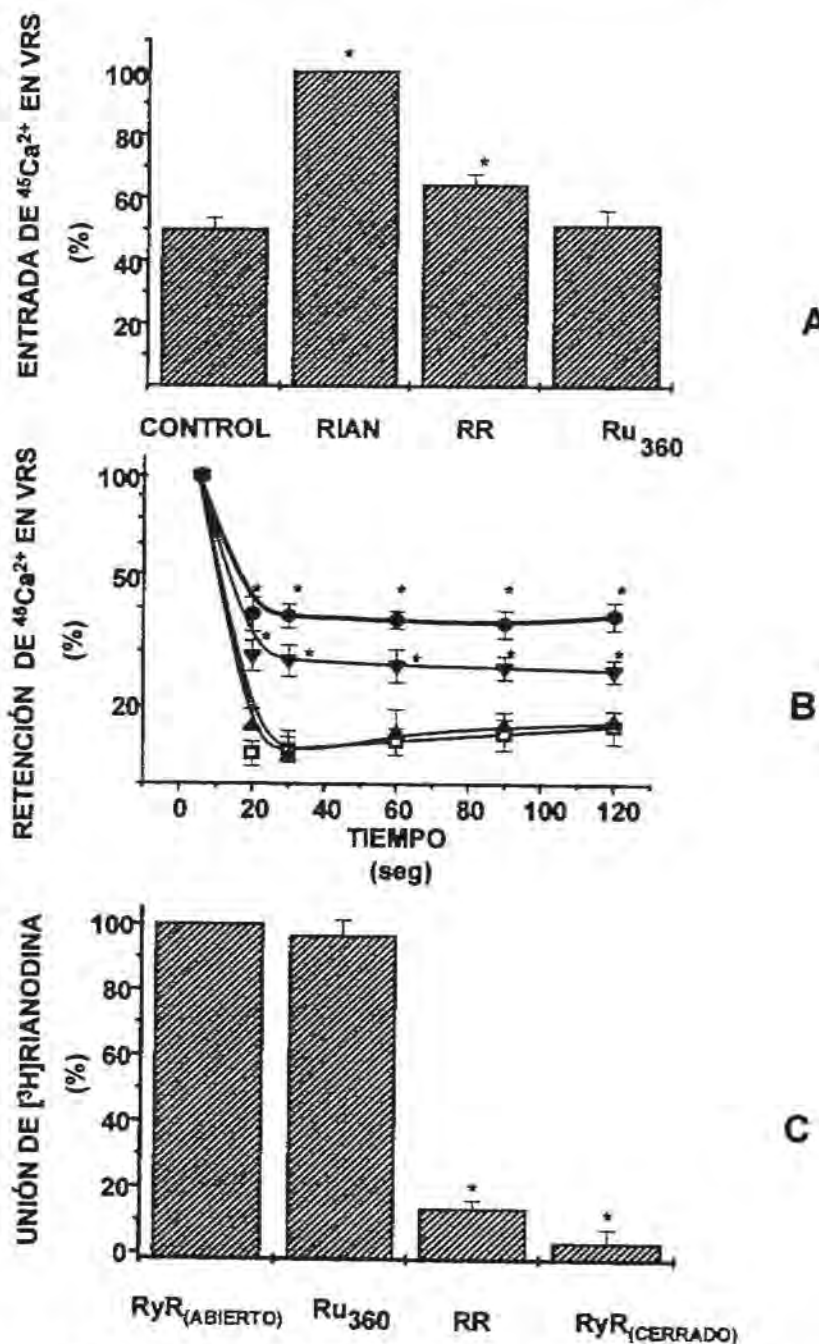


Figura 19. Efecto del Ru₃₆₀ sobre los movimientos de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en VRS. El panel A muestra el efecto del Ru₃₆₀, RR y de la rianodina sobre la entrada de calcio en VRS. (El 100 de entrada de calcio corresponde a $29 \pm 3.5 \text{ nmol } ^{45}\text{Ca}^{2+} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot 5 \text{ min}^{-1}$). El panel B muestra el porcentaje de retención de calcio en VRS precargadas con $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e incubadas en presencia de $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de rianodina (●); $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de RR (▼); $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de Ru₃₆₀ (▲) y sin inhibidores (□). El 100% de la retención se obtuvo para cada condición en un medio con $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de calcio. Los valores máximos de retención fueron normalizados para cada grupo. El panel C muestra la unión de [^3H]rianodina y el efecto de los inhibidores. El 100% representa al canal abierto ($395 \text{ fmol } [^3\text{H}] \text{ rianodina} \cdot \text{mg}^{-1}$ de VRS). Los valores representan el promedio de 4 experimentos \pm ES. * $P \leq 0.05$ vs control o RyR abierto.

El protocolo de oclusión en las ratas I/R produjo un 92% de frecuencia en la aparición de la FV. En contraste, el tratamiento con diversas dosis de Ru_{360} , gradualmente disminuyó su incidencia. La administración de $14-28 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de Ru_{360} hizo que la FV no se observara en estas ratas (Figura 21 panel A). El RR provocó una disminución en la incidencia de la FV sólo en altas concentraciones (3mg.Kg^{-1}); sin embargo el RRFen, no produjo un efecto dosis dependiente sobre la disminución de FV (Panel A).

Por otro lado, el Ru_{360} indujo un efecto dosis-respuesta disminuyendo la FC durante la reperfusión; la dosis de $28 \mu\text{g.Kg}^{-1}$, disminuyó la FC hasta que esta alcanzó el ritmo sinusal, al tercer minuto de la reperfusión. El RR disminuyó de manera significativa la FC en ratas tratadas con 0.4 y 3mg.Kg^{-1} , pero a ninguna de estas dosis se logró disminuirla hasta el ritmo sinusal. El análogo con sustituyentes de fenantrolina, a ninguna concentración redujo significativamente la FC. Con base en estos resultados, se utilizó la dosis de $28 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ en los siguientes experimentos de protección (I/R+ Ru_{360}).

En la figura 22, se muestra un curso temporal de la FC y la tensión arterial en las ratas controles, I/R y I/R+ Ru_{360} . En las ratas I/R los valores de tensión arterial disminuyeron cerca de un 75% durante la reperfusión, mientras que en las ratas I/R+ Ru_{360} la tensión arterial se mantuvo constante (panel B). En las ratas I/R, el aumento en la FC correlacionó con una disminución en la tensión arterial, indicando que la reperfusión induce disfunciones hemodinámicas.

Durante la reperfusión, los trastornos de repolarización ventricular fueron evidentes, y desde los primeros segundos de reperfusión se observó la aparición de taquiarritmias. En la figura 23 se muestra el análisis de las arritmias ventriculares post-reperfusión en las ratas I/R y las I/R+ Ru_{360} (panel A). Este análisis considera las TV y las FV que fueron caracterizadas según los criterios de la convención de Lambeth (145a). Como se observa, los corazones de ratas I/R presentaron TV y FV durante prácticamente todo el periodo de análisis; en comparación, las ratas tratadas con el inhibidor no presentaron este tipo de anomalías eléctricas a partir del cuarto minuto de reperfusión. Completando el análisis de arritmias, en el panel B se presenta la frecuencia de latidos sinusales por minuto de los corazones de ratas I/R y de ratas tratadas con el inhibidor. Encontramos que las ratas I/R+ Ru_{360} se recuperan desde el primer minuto de reperfusión y sus corazones mantienen latidos sinusales el 80% del tiempo de análisis, porcentaje que aumenta hasta el 95% en el minuto cinco de la reperfusión.

El experimento mostrado en la Figura 24 se llevó a cabo con objeto de explorar el daño tisular producido por la reperfusión, midiendo la liberación de las enzimas CK y LDH en el suero de las ratas. Encontramos que la actividad de CK en las ratas I/R aumentó 5.5 veces, comparada con la actividad de los sueros de las ratas controles (sometidas a toracotomía, pero no al protocolo de I/R). La actividad de CK en el suero de ratas I/R+ Ru_{360} sólo aumentó 2.3 veces. Los niveles de LDH fueron similares a los observados para la CK. Los resultados

presentados indican que el Ru₃₆₀, también protege contra el daño por reperfusión en un modelo de rata entera.

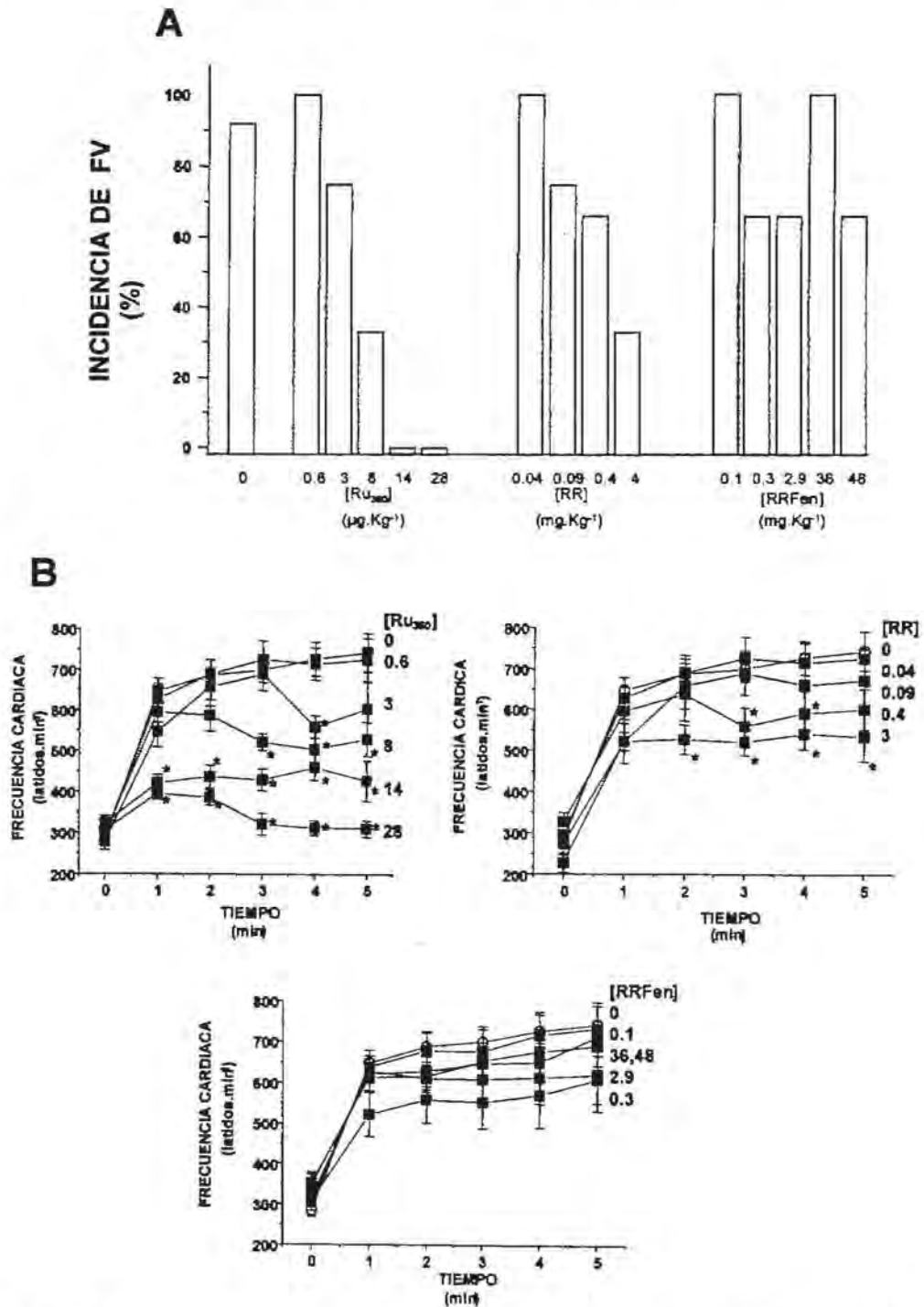


Figura 21. Efecto protector del Ru₃₆₀, RR y RRF sobre la incidencia de FV y la FC. El panel A muestra el efecto dosis dependiente del Ru₃₆₀ sobre la incidencia de FV. La barra blanca representa a las ratas I/R. En el panel B, se muestra el efecto dosis-respuesta sobre la disminución del FC durante los primeros cinco minutos de la reperfusión.

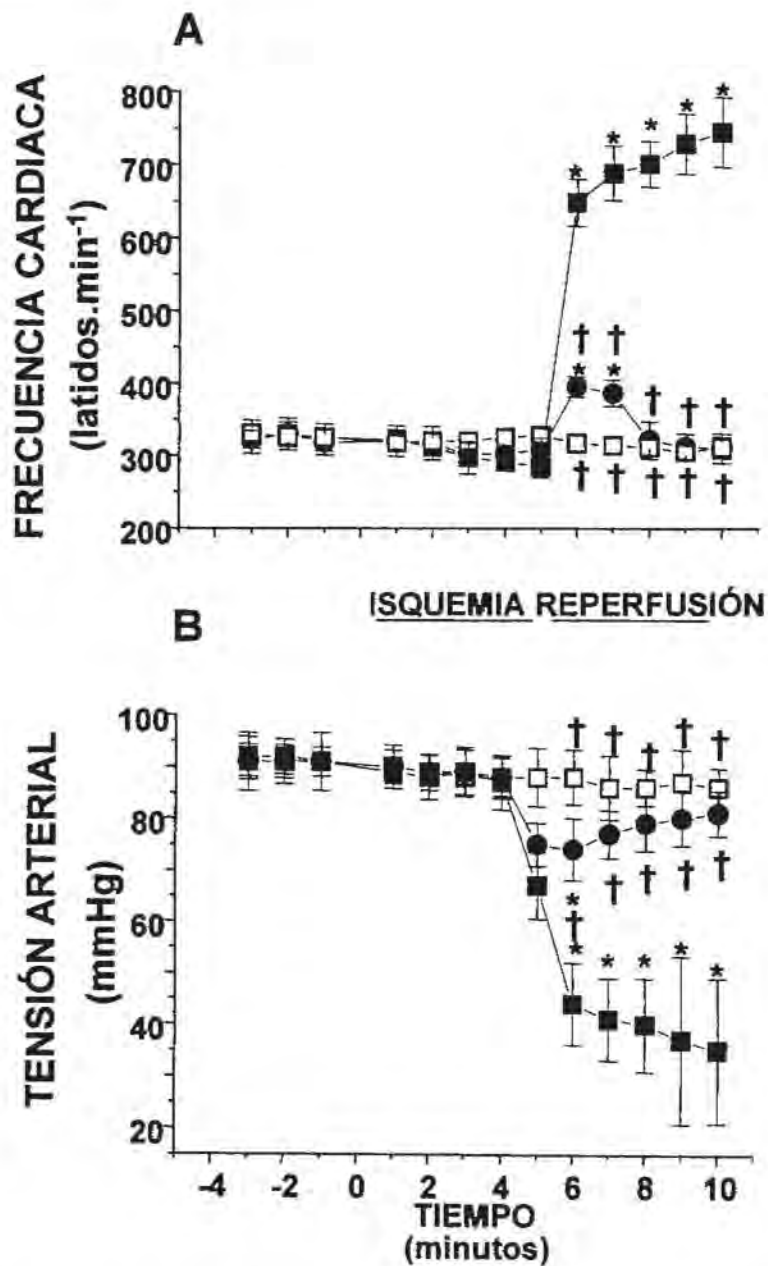


Figura 22. Efecto del RU_{360} , sobre la frecuencia cardiaca y la tensión arterial en ratas durante la isquemia y la reperfusión. Los símbolos abiertos representan los valores de ratas controles (simuladas). (■) representa a las ratas no tratadas (I/R) y (●) a las ratas tratadas con el inhibidor (I/R+ RU_{360}). * $P \leq 0.05$ diferencia significativa vs ratas controles. † $P \leq 0.05$ diferencia significativa vs ratas I/R.

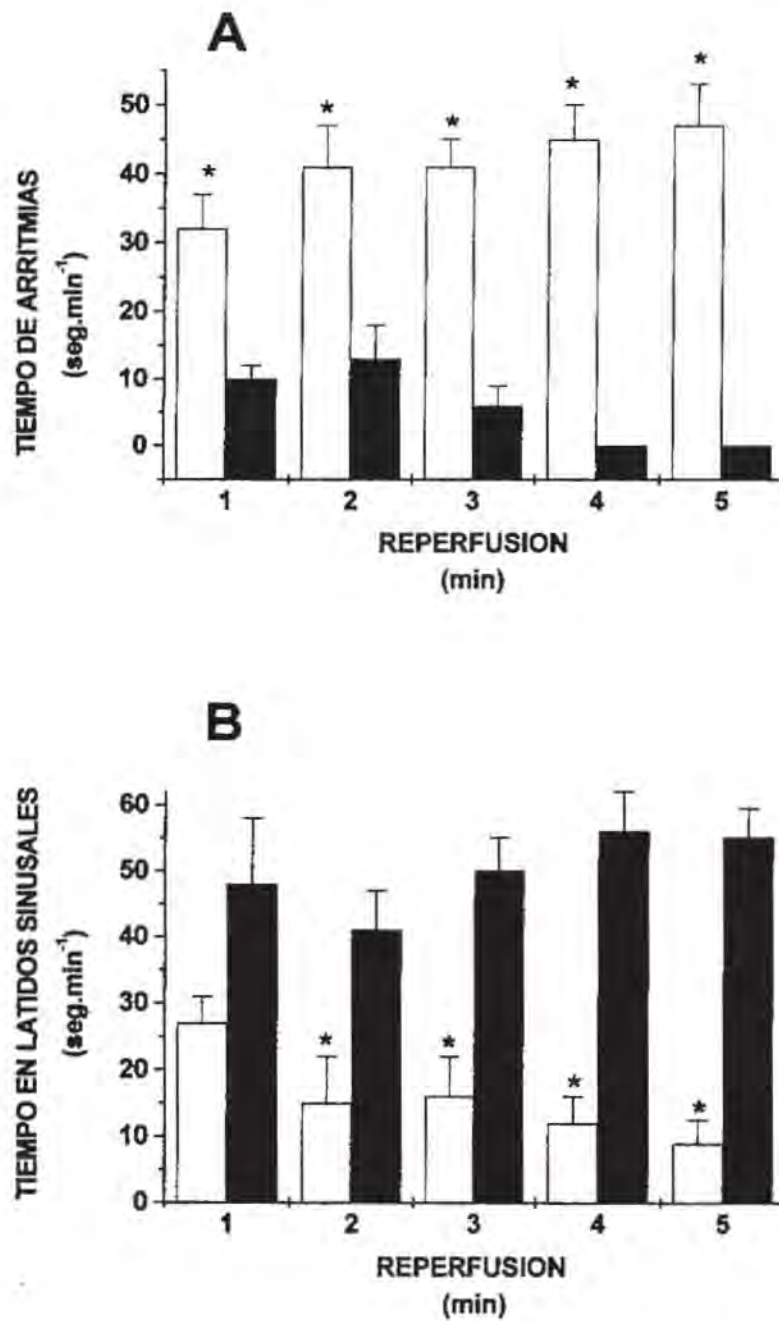


Figura 23. Análisis de la aparición de arritmias y latidos sinusales en ratas I/R (barras blancas) e I/R+Ru₃₆₀ (barras oscuras) durante la reperusión. Los valores representan la media ± ES. *P < 0.05 vs I/R.

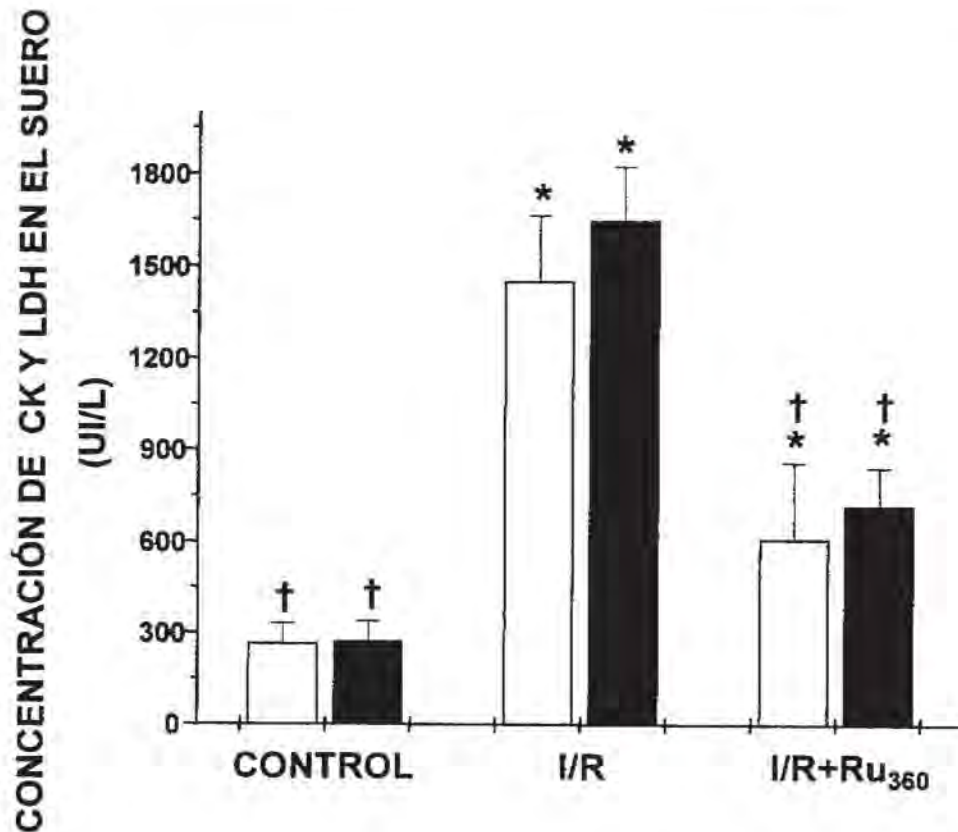


Figura 24. El Ru₃₆₀ disminuye el daño tisular generado por la reperfusión. Se muestra la actividad de CK (en negro) y la LDH (en blanco) determinada en sueros de ratas. †P<0.05 vs ratas I/R. *P<0.05 vs ratas controles (simuladas).

El Ru₃₆₀ mantiene la integridad mitocondrial después de oclusión de la arteria coronaria izquierda.

Con el objetivo de verificar si en este modelo más fisiológico, el inhibidor también tiene como blanco el transporte de calcio mitocondrial, exploramos la función mitocondrial. En la tabla 4 se presentan las actividades respiratorias de mitocondrias aisladas a partir del ventrículo izquierdo de ratas sometidas a reperfusión. En las mitocondrias de corazones I/R, la velocidad de consumo de oxígeno en presencia de ADP (estado 3), disminuyó 45 % respecto a la de mitocondrias controles. Las mitocondrias obtenidas de un ventrículo protegido contra el daño por reperfusión con Ru₃₆₀, no mostraron diferencia en las velocidades respiratorias comparadas con las mitocondrias controles.

La relación ADP/O en mitocondrias de corazones I/R disminuyó significativamente, así como el acoplamiento entre la fosforilación oxidativa y la respiración. El CR en la mitocondrias de un corazón I/R+Ru₃₆₀, no mostró diferencia significativa comparada con las mitocondrias controles.

RESULTADOS

La disminución en el índice ADP/O observado en las mitocondrias de los corazones I/R puede explicarse en términos de la incapacidad para mantener el $\Delta\psi$, y por ello lo medimos en las mitocondrias de cada grupo. Como se esperaba las mitocondrias I/R mostraron un potencial de membrana menor que el de mitocondrias controles o el de obtenidas de los corazones I/R+Ru₃₆₀. La adición de calcio en las mitocondrias I/R y las I/R+Ru₃₆₀ induce una despolarización transitoria indicando que el calcio es transportado a la matriz, en contraposición en las mitocondrias I/R la adición de calcio promueve una caída irreversible en el potencial de membrana (Figura 25, panel A).

Por otro lado, está bien caracterizado en el modelo de isquemia-reperfusión que el estrés oxidativo incide sobre la integridad mitocondrial, pues la producción de ERO puede afectar importantes actividades enzimáticas. Por ello medimos la actividad de la aconitasa mitocondrial, que es un buen marcador de este daño. La actividad de aconitasa es inversamente proporcional a la cantidad de $^{\circ}\text{O}_2$ producido durante el estrés oxidativo. En las mitocondrias de corazones I/R, la actividad de aconitasa disminuyó 35%; mientras que la actividad de aconitasa se protegió del estrés oxidativo en la mitocondrias de los corazones tratados con Ru₃₆₀ (panel B).

	Control	I/R	I/R+Ru ₃₆₀
Estado 3 (nátomos O min ⁻¹ .mg ⁻¹)	372±34†	205±18*	358±45†
Estado 4 (nátomos O min ⁻¹ .mg ⁻¹)	61±13	48±8	63±16
ADP/O	1.32±0.4†	0.73±0.3*	1.4±0.5†
RC	6.0±0.8†	3.5±0.6*	5.6±0.7†

Tabla 4. Actividades respiratorias de las mitocondrias aisladas a partir de los corazones de ratas simuladas (controles), no tratadas (I/R) y sometidas a I/R previamente tratadas con Ru₃₆₀. Los valores representan la media ± SE de al menos 6 diferentes experimentos. *P ≤ 0.05 diferencia significativa vs control (simuladas). †P ≤ 0.05 vs I/R.

El Ru₃₆₀ inhibe la entrada de calcio mitocondrial en corazones de ratas sometidas al protocolo de I/R.

Para determinar si el Ru₃₆₀, puede modular el sistema de transporte de calcio mitocondrial en este modelo; comparamos la actividad de transporte de calcio en las mitocondrias de los corazones controles, I/R e I/R+Ru₃₆₀ (Figura 26).

La velocidad inicial (antes de 40 segundos) de transporte de calcio en las mitocondrias obtenidas de corazones controles y de corazones reperfundidos (I/R) fueron iguales. Esto refleja la alta afinidad y eficiencia del UCam para transportar calcio. En las mitocondrias obtenidas de un corazón tratado con Ru₃₆₀, se observó una disminución cercana al 25% en la velocidad inicial de transporte de calcio, sugiriendo nuevamente una reducción parcial de la actividad del uniportador (Panel A). Esta diferencia fue significativa durante los primeros segundos de transporte, como se puede observar en el análisis estadístico de la velocidad inicial de transporte (Panel B).

A medida que se acumula el calcio, la cinética que siguen los tres tipos mitocondriales cambia (Panel C); las mitocondrias de los corazones reperfundidos (I/R) pierden la capacidad para acumular calcio dentro de la matriz mitocondrial.

Las mitocondrias obtenidas de un corazón I/R+Ru₃₆₀, a pesar de describir una cinética de entrada de calcio más lenta, fueron capaces de retener el calcio en la mitocondria. En el panel D de esta misma figura se muestra el efecto de la adición *in vitro* de la CSA sobre el transporte del calcio de las mitocondrias de los corazones I/R. En esta condición, la liberación de calcio se evitó por la adición del inhibidor más clásico de PTPm, alcanzando cerca del 60% del transporte de las mitocondrias controles.

El Ru₃₆₀ se acumula en el tejido cardiaco.

La cantidad de Ru₃₆₀ en la sangre y en el tejido cardiaco se cuantificó, después de 4 y de 30 minutos de su administración. En la sangre, el contenido de Ru₃₆₀ después de 4 minutos fue de $0.41 \pm 0.03 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (n=4). Esta concentración disminuyó después de 26 minutos a 0.32 ± 0.01 (n=5), indicando su unión con diversos sitios. En el tejido cardiaco a los 4 minutos de su administración, la cantidad de Ru₃₆₀ no fue detectable; sin embargo, después de 30 minutos, el contenido de Ru₃₆₀ aumentó a $1 \pm 0.35 \mu\text{g} \cdot \text{g}$ de tejido seco⁻¹. Después de liofilizar y llevar a peso constante el tejido cardiaco se determinó que para completar un gramo de tejido seco se necesitaban cerca de 4 corazones (con un peso húmedo de $1.1 \pm 0.2\text{g}$ cada uno). A partir de esta relación, se calculó que el contenido de Ru₃₆₀ es de cerca de $0.25 \mu\text{g}$ por corazón. De acuerdo con los reportes de contenido y distribución de proteínas en las células miocárdicas (837mg de proteína.g de tejido seco⁻¹) (146), calculamos una concentración de $2.1 \pm 0.45 \text{pmol Ru}_{360} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína de tejido miocárdico.

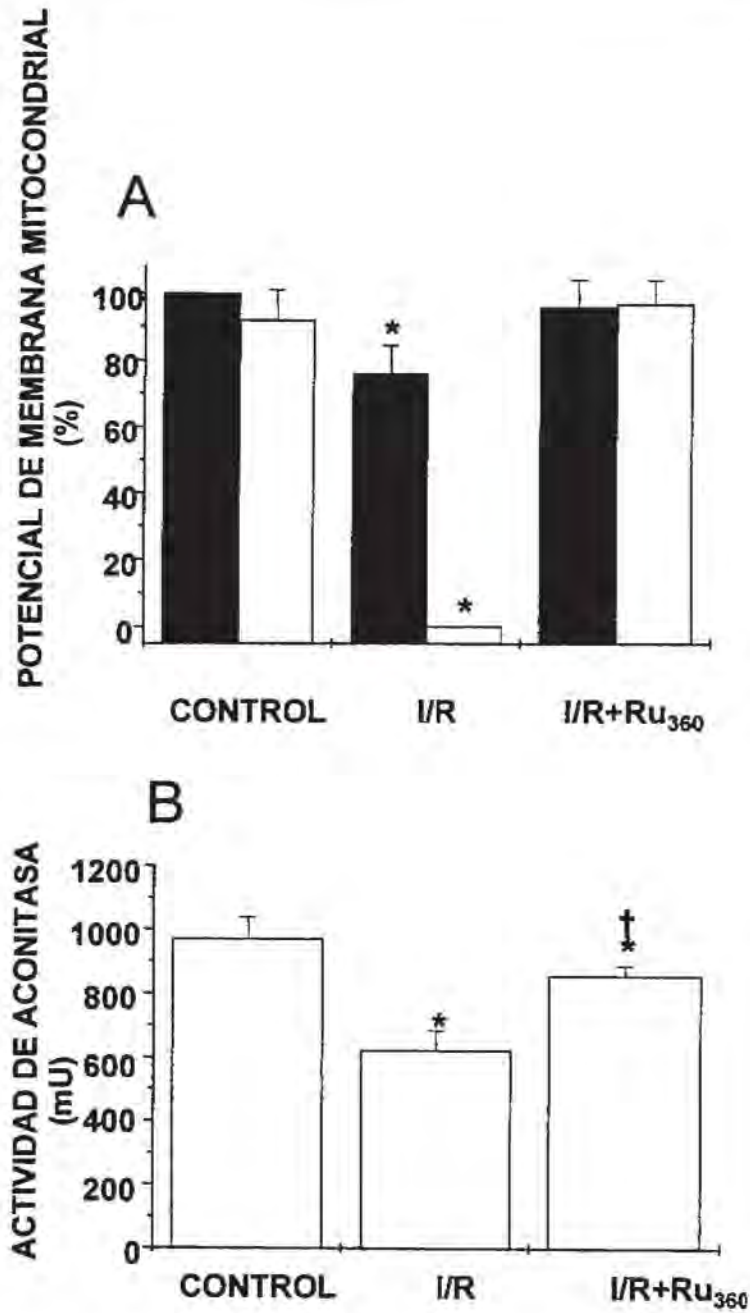


Figura 25. En el panel A se muestra el potencial transmembranal de mitocondrias aisladas a partir de corazones de ratas controles, I/R y sometidas a I/R previamente tratadas con Ru₃₆₀. El 100% representa las unidades arbitrarias de fluorescencia para las mitocondrias controles. El panel B muestra la actividad de aconitasa para los mismos tipos de mitocondrias. Los valores representan la media \pm SE de al menos 4 diferentes experimentos. *P \leq 0.05 diferencia significativa vs control. †P \leq 0.05 vs I/R.

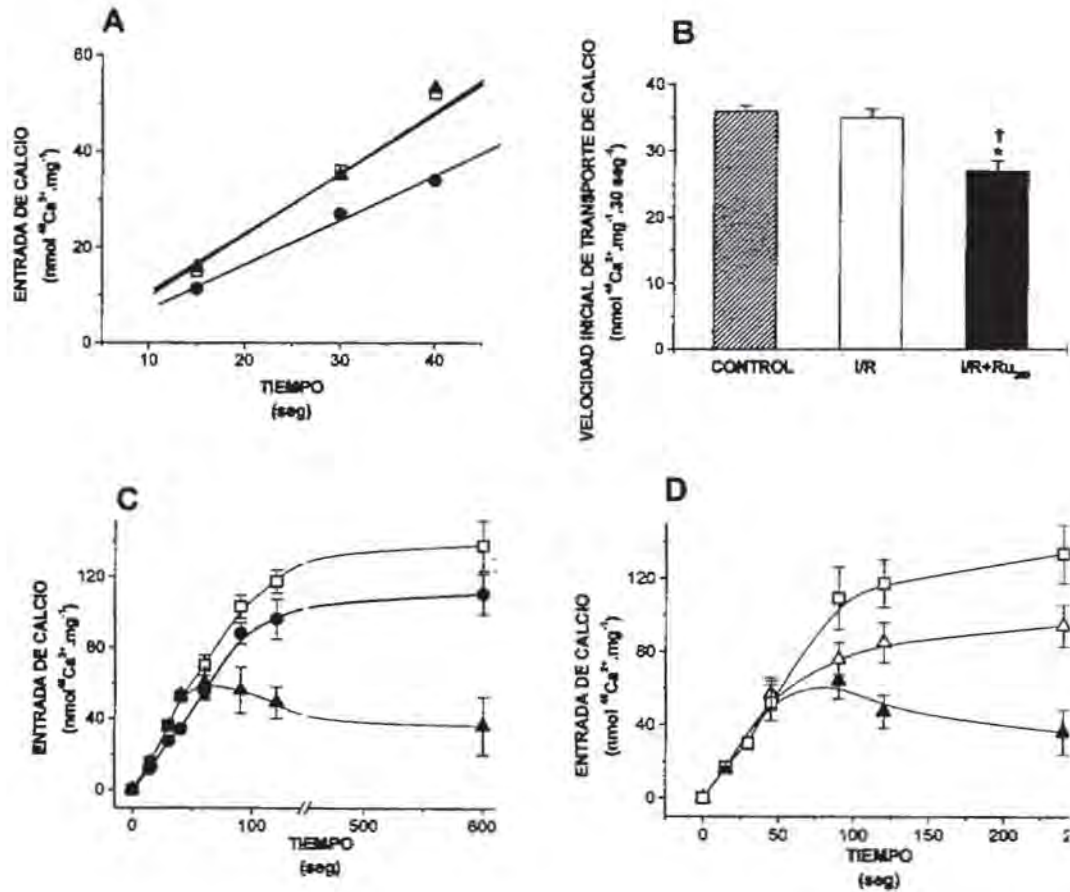


Figura 26. Efecto del Ru₃₆₀ sobre el transporte de calcio en mitocondrias aisladas a partir de corazones de ratas controles, I/R e I/R+Ru₃₆₀. En el panel A se muestra la velocidad inicial de transporte. Los símbolos abiertos (□) representan los valores de ratas controles, (▲) representa a las mitocondrias de ratas I/R, (●) las mitocondrias de corazón de ratas I/R+Ru₃₆₀. En el panel B se muestra el estadístico que compara las velocidades iniciales de transporte. El panel C muestra el curso temporal (15-600 seg) de la entrada de calcio, los símbolos representan lo mismo que en el panel A. El panel D muestra el efecto de la adición (*in vitro*) de 1 μmol.L⁻¹ de CSA sobre el transporte de calcio de las mitocondrias I/R. (▲) Representa los valores de transporte de las mitocondrias de ratas I/R y los símbolos abiertos en presencia de CSA (Δ). Los valores representan la media ± SE de al menos 5 diferentes experimentos. *P < 0.05 diferencia significativa vs control †P < 0.05 vs I/R.

VII.- DISCUSIÓN

Principalmente en modelos animales se ha demostrado que la reperfusión miocárdica puede generar un daño irreversible al corazón, que se manifiesta por una marcada contractura, disminución en la presión intraventricular, un aumento de la resistencia vascular, en la incidencia de FV y en un importante desacoplamiento entre el trabajo cardíaco y el consumo de oxígeno (117,122,147). Sin embargo, existe un gran controversia en cuanto al daño que ocurre en el miocardio humano en situaciones clínicas en las que se generan periodos transitorios de I/R como la angina inestable, el vasoespasma coronario y la angioplastia, ya que en muchas ocasiones no se ha encontrado una asociación directa entre estos acontecimientos y la muerte de tejido miocárdico (149). Adicionalmente, algunos estudios clínicos multinacionales han demostrado que las terapias para evitar el daño por reperfusión no representan un beneficio significativo en todos los casos (149,150). Por otro lado, diversos grupos sostienen que en cuanto se aumenta la duración y severidad de la isquemia, aumenta la cantidad de células miocárdicas que sufren este daño, y que esta condición predispone al miocardio a un espectro de patologías asociadas a la reperfusión (151,152). Con la intención de evitar este daño, se han utilizado diversos tratamientos clínicos experimentales. Algunos estudios han demostrado que los fármacos que en modelos animales limitan el daño por reperfusión, como la adenosina, los inhibidores del intercambiador Na^+/H^+ , los activadores de canales de potasio sensibles a ATP y los antagonistas del calcio son benéficos para el miocardio humano infartado, cuando se administran durante la reperfusión (153,154,155).

La pérdida del balance en la homeostasis de calcio durante la reperfusión, está asociada principalmente a su liberación de receptáculos endógenos como el RS (156). Se ha especulado que la transmisión de señales de calcio entre el retículo endoplásmico y la mitocondria, opera a través de interacciones estables de ambos organelos, y que la mitocondria acumula el calcio que proviene del RyR o del receptor de IP3 (157). La evidencia que sostiene esta hipótesis es el análisis de imágenes confocales, en donde se ha observado la existencia de "hot spots" ó dominios de alta concentración de calcio en la cercanía de la mitocondria (158), esta cercanía estructural es importante, ya que la irreversibilidad del daño se asocia a la sobrecarga de calcio mitocondrial. En este sentido, el RR que es el inhibidor más clásico de la entrada de calcio a la mitocondria, se ha usado para reducir el daño por I/R en el corazón. Sin embargo, se sabe que el tratamiento con este compuesto produce diferentes efectos sobre la función cardíaca que dependen del tiempo y de la dosis, probablemente debido a su interacción con múltiples sitios en las células miocárdicas, principalmente con el RyR. Al respecto se ha demostrado que altas dosis de RR producen en el corazón contractura persistente (140).

En este trabajo se muestra que en el órgano aislado, la perfusión de Ru_{360} de 0.1nmol.L^{-1} – $5\mu\text{mol.L}^{-1}$ no genera efectos sobre el desarrollo de fuerza contráctil, lo que indica que este inhibidor no controla los flujos de calcio citosólicos. Los datos aquí presentados confirman reportes recientes que indican que el Ru_{360} interactúa específicamente con la mitocondria (126), ya que este inhibidor fue incapaz de inhibir la entrada o salida de calcio en VRS. Sin embargo, encontramos que el compuesto se une de manera importante a la fracción microsomal, que contiene también membranas de sarcolema. Al respecto, Matlib y cols, al medir la entrada de $^{103}\text{Ru}_{360}$ a cardiomiocitos aislados, encontraron una acumulación bifásica dependiente del tiempo (126). La fase rápida se asoció a la unión con la superficie celular, mientras que la fase lenta se interpretó como el resultado de la acumulación intracelular. La bien documentada afinidad de algunos complejos de rutenio por los proteoglicanos, podría explicar la asociación del $^{103}\text{Ru}_{360}$ a la fracción microsomal. Apoyando este resultado, observaciones de nuestro laboratorio indican que tanto el RR como el Ru_{360} interactúan con residuos glicosídicos en el UCam (67).

La idea de que la acumulación de calcio en la mitocondria es un condicionante de la disfunción mitocondrial está ampliamente documentada, especialmente cuando se acompaña de otra fuente de estrés como el oxidativo. En este trabajo se observa que durante la reperfusión, la sobrecarga de calcio sensibiliza a las mitocondrias de los corazones I/R para la apertura de PTPm, en contraste con las mitocondrias de los corazones tratados con Ru_{360} . Aunque durante la reperfusión se establecen las condiciones para la apertura del PTPm, se ha cuestionado su relevancia como mediador del daño, debido a que la CSA (el más clásico inhibidor de la apertura del PTPm) contrariamente a lo esperado, es incapaz de prevenir la entrada de $[^3\text{H}]\text{DOG-P}$ a la mitocondria durante la reperfusión. Este compuesto no metabolizable se ha utilizado como marcador de la apertura del PTPm (107). Otros reportes indican que la CSA sólo tiene efecto protector sobre el daño por reperfusión cuando se utiliza a altas concentraciones, y que su efecto es limitado (111). En este contexto, un hallazgo importante es que la CSA no es específica para el PTPm, pues inhibe también a la calcineurina, que tiene un papel importante en la modulación de las señales de muerte celular (159). Por ello, se siguen buscando moléculas específicas para inhibir la apertura del PTPm. Al respecto, se ha demostrado que los análogos de la CSA como la n-Me-Val-4-ciclosporina (109,113) o el inmunosupresor SFA, inhiben la apertura del PTPm *in vitro* sin inhibir a la calcineurina (112); sin embargo, existen reportes que muestran que ningún inhibidor de la apertura del poro puede evitar la TPM cuando la mitocondria es expuesta a un estímulo suficientemente fuerte (27,118). En la reperfusión, la sobrecarga de calcio mitocondrial, el agotamiento de nucleótidos de adenosina, el aumento en la concentración de Pi y el estrés oxidativo puede generar un escenario que favorece la apertura del PTPm.

Se ha sugerido que uno de los mecanismos de cardioprotección en el PCI, se relaciona con la inhibición indirecta de la apertura del PTPm, disminuyendo la sobrecarga de calcio

mitocondrial (160). Nuestros resultados apoyan dicha propuesta, por la demostración directa de que el UCam se encuentra parcialmente inhibido por la perfusión de Ru₃₆₀, ya que la [Ca²⁺]_m libre en los corazones I/R+Ru₃₆₀ después de 30 minutos de reperfusión fue comparable a la [Ca²⁺]_m de corazones controles. Es interesante hacer notar que las mitocondrias de corazones pretratados con Ru₃₆₀ antes de la isquemia, mostraron una [Ca²⁺]_m menor que las controles, estos datos confirman que a pesar de no haber altas [Ca²⁺]_c, el Ru₃₆₀ se une a su blanco molecular: el UCam.

Una observación interesante en este trabajo, es que el Ru₃₆₀ protege contra el daño por reperfusión, bloqueando "parcialmente" la sobrecarga de calcio en la mitocondria. Podemos explicar este fenómeno con base en los datos de otros grupos que han identificado dos poblaciones de mitocondrias que son bioquímica y funcionalmente diferentes en el tejido miocárdico: Las mitocondrias subsarcolemales (mSL), que se localizan próximas a la membrana plasmática y las mitocondrias interfibrilares (mIF) que se encuentran entre las miofibrillas. Se ha reportado que estas dos poblaciones se afectan diferencialmente en la cardiomiopatía isquémica (161). El mayor daño suele ocurrir en las mSL como consecuencia de su localización en el cardiomiocito, además de su inherente susceptibilidad al calcio. En estas mitocondrias el daño postisquémico es más rápido y severo que en las mIF, la liberación de citocromo c y la pérdida de actividad de la citocromo oxidasa también es mayor (162). Pero sobre todo, las mSL tienen una capacidad menor para retener el calcio en la matriz, comparadas con las mIF (163). Estos datos nos permiten especular que el UCam de esta población mitocondrial pudiera ser el blanco donde se concentra el inhibidor debido a su accesibilidad. En este contexto, proteger a la población más susceptible bastaría para mantener la integridad de las células miocárdicas durante la reperfusión.

En resumen, la primera parte de este estudio muestra que la acumulación masiva de calcio en la mitocondria condiciona la irreversibilidad del daño en los corazones reperfundidos y se traduce en despolarización de la membrana, hinchamiento mitocondrial, disminución de la síntesis de ATP y apertura del PTPm. El mecanismo a través del cual el Ru₃₆₀ protege contra este daño, es la reducción de la concentración de calcio mitocondrial, inhibiendo parcialmente el UCam.

En la segunda parte de este estudio evaluamos el efecto protector y el potencial farmacológico del inhibidor Ru₃₆₀ en un modelo de rata entera, que nos ofrece condiciones más fisiológicas que las del modelo de órgano aislado y en el que las implicaciones de protección pueden ser más cercanas a las del daño por reperfusión en la clínica. En este modelo, analizando la recuperación funcional del corazón y midiendo marcadores de daño tisular encontramos que el tratamiento con Ru₃₆₀ también reduce el daño post-isquémico. En esta parte del trabajo comparamos el efecto del Ru₃₆₀ con otros inhibidores del UCam: el RR y el RRFen. El primero, de acuerdo con los trabajos de otros grupos, muestra un efecto protector a concentraciones altas, disminuyendo la incidencia de arritmias. El RRFen se

eligió para esta comparación por sus propiedades hidrofóbicas. Sin embargo, no mostró un efecto dosis-respuesta sobre la protección del corazón posiblemente debido a su inespecificidad y baja potencia, ya que su K_i para el UCam es al menos 450 veces mayor que la del Ru_{360} (164). En la literatura, se han utilizado otras drogas como el diazóxido y RR como moduladores del contenido de calcio en la mitocondria. El diazóxido abre canales de K^+ dependientes de ATP en la mitocondria, y ejerce una impresionante recuperación durante la reperfusión cuando se usa a bajas concentraciones ($30-100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) (165,166). Sin embargo, este compuesto protege parcialmente a concentraciones superiores a $625 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en modelos de animal entero (167)*. El RR también ejerce protección en corazones aislados de $0.025-3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (131,168), pero en modelos de rata entera las dosis protectoras son superiores a $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (169)*. A estas concentraciones, ambos compuestos han mostrado efectos colaterales, no sólo en el corazón sino también en otros órganos (170,171,172). Comparativamente en este trabajo se demuestra que en un modelo *in vivo*, el Ru_{360} a una concentración cerca de $1.4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ protege al corazón durante la reperfusión*.

Las ERO juegan también un papel muy importante en el daño por reperfusión y aunque, el mecanismo exacto por el cual la sobrecarga de calcio induce la producción de ERO no está claro, hallazgos recientes sugieren que esta acompaña la generación de ERO (173,174). Nuestros resultados confirman esta idea, dado que las mitocondrias I/R muestran una disminución en la actividad de aconitasa mitocondrial que se ha utilizado como indicador mitocondrial del estrés oxidativo. En este trabajo encontramos que el tratamiento con Ru_{360} evita la inactivación de la aconitasa, indicando que la acumulación de calcio aumenta la producción de ERO; dicho efecto se ha reportado por otros grupos usando RR (175,176). La actividad atrapadora de radicales libres del Ru_{360} se exploró determinando la cantidad de especies reactivas de la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBARS por su siglas en inglés) en un sistema de generación mitocondrial de estrés oxidativo (datos no mostrados). Observamos que altas concentraciones de Ru_{360} no disminuyen la lipoperoxidación de membranas, por lo que concluimos que el Ru_{360} no tiene propiedades antioxidantes. Sin embargo, una posible explicación es que el calcio induce depolarización de la membrana mitocondrial, aumentando la producción de ERO; otra posibilidad es que el calcio se una a las moléculas de cardiolipina contribuyendo a la inhibición de la respiración mitocondrial a través de la disminución en la actividad de la citocromo oxidasa, y esto a su vez aumente la producción de ERO.

En conclusión, esta parte del trabajo demuestra que el Ru_{360} aumenta la recuperación funcional de los corazones sometidos a I/R, manteniendo la integridad mitocondrial cuando este compuesto es administrado en una rata entera. El mecanismo por el cual este compuesto evita el daño involucra la inhibición parcial del transporte de calcio mitocondrial. La alta afinidad y especificidad del Ru_{360} por el UCam hace de este compuesto una droga promisoría para ser utilizada en la terapia durante la reperfusión. Además, es indispensable

*Para expresar la concentración de la droga, se consideró el volumen de sangre (para mamíferos $\approx 8\%$ de peso corporal. Lee HB, 58 Blaufox MD. J Nucl Med.1985;26:72-6.).

la purificación y caracterización de este transportador de calcio mitocondrial, pues disminuir la expresión de esta proteína sería otra aproximación para evitar el daño por reperfusión.

Recientemente, en una revisión sobre el metabolismo energético del corazón, se enfatizó la relevancia del UCam, como regulador de la $[Ca^{2+}]_m$, y por tanto del metabolismo energético mitocondrial (177). En ese trabajo se sugiere que un knockout de este transportador sería muy útil para dilucidar el papel del calcio mitocondrial en la homeostasis metabólica. Sin embargo, la aproximación actual más realista es el uso de inhibidores específicos para esta proteína. Al respecto, nuestro estudio demuestra que el Ru₃₆₀ puede regular la actividad del UCam y por lo tanto puede ser utilizado como herramienta para estudiar el papel que tiene la $[Ca^{2+}]_m$ en la homeostasis energética en el corazón *in vivo*.

VIII.- CONCLUSIONES

En este trabajo demostramos que el Ru₃₆₀, inhibidor del UCam, puede recuperar la función cardíaca en un modelo patológico de daño por estrés oxidativo y sobrecarga de calcio. La recuperación total de las propiedades rítmicas, el acoplamiento entre el metabolismo oxidativo y el trabajo cardíaco y la disminución en el daño tisular demuestran el efecto protector de dicho complejo.

La afinidad de este inhibidor por el UCam *in vitro*, nos hace concluir que el mecanismo de protección, tanto en el modelo de corazón aislado como en el de rata entera es a través de su asociación con este transportador. La base de esta afirmación es que después de la reperfusión, la mitocondria fue capaz de mantener su integridad membranal y su capacidad fosforilante por efecto del Ru₃₆₀, además determinamos que la inhibición parcial del uniportador, disminuyó los niveles de calcio en la matriz, con lo que se evitó la apertura del poro de transición mitocondrial, al evitar la sobrecarga de calcio.

En este trabajo, también demostramos que en sistemas complejos como el corazón aislado y la rata entera, el Ru₃₆₀ es capaz de modular la actividad del uniportador de calcio *in situ*.

Nuestros resultados, descartan la participación de los transportadores de calcio de retículo sarcoplásmico en el mecanismo de protección del Ru₃₆₀.

VII.-PERSPECTIVAS

A lo largo de este trabajo se han mostrado los beneficios que genera la inhibición del UCam, al evitar la sobrecarga de calcio mitocondrial durante la reperfusión. También sería interesante conocer las consecuencias de la inhibición de este transportador mitocondrial sobre la fisiología y metabolismo del corazón normóxico.

Ya que diversos modelos de control del metabolismo energético, proponen que en el corazón el calcio citosólico regula, tanto su utilización como la producción (Figura 27), interesaría conocer las consecuencias metabólicas que generaría la inhibición del transporte del calcio mitocondrial, utilizando el Ru₃₆₀.

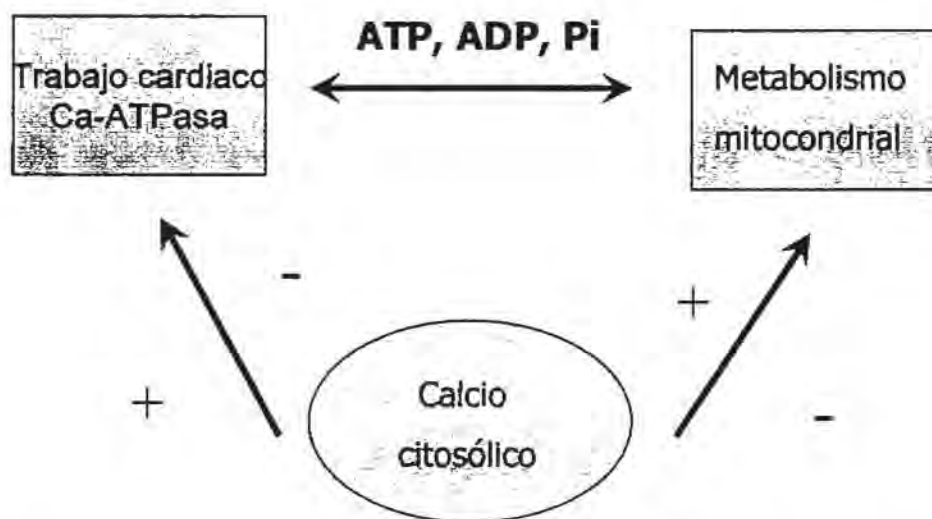


Figura 27. Relación entre el trabajo cardíaco y el metabolismo mitocondrial. En este modelo se plantea que el calcio citosólico puede modular de forma paralela el trabajo cardíaco, a través del consumo de ATP por medio de ATPasas como la SERCA o la ATPasa de la miosina y a su vez activar diferentes procesos metabólicos en la mitocondria, que incluyen a las deshidrogenasas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la F1F0-ATP sintetasa y el translocador de adenín nucleótidos. Como se observa en la figura, la relación entre el trabajo y el metabolismo es sostenida por la concentración de metabolitos energéticos, proporcionados casi exclusivamente por la mitocondria.

Al respecto, realizamos algunos experimentos preliminares. Encontramos que la perfusión de concentraciones crecientes de Ru₃₆₀ en corazones normóxicos, disminuyó gradualmente el consumo de oxígeno (respiración mitocondrial) y consecuentemente el trabajo cardíaco (Figura 28). A bajas concentraciones, la relación entre el metabolismo y el trabajo cardíaco fue lineal, lo que indica que la inhibición parcial de este transportador altera proporcionalmente ambos parámetros. Sin embargo, a concentraciones altas ($<5 \mu\text{mol.L}^{-1}$), se perdió la linealidad; este efecto puede deberse a la asociación inespecífica del inhibidor con otras proteínas.

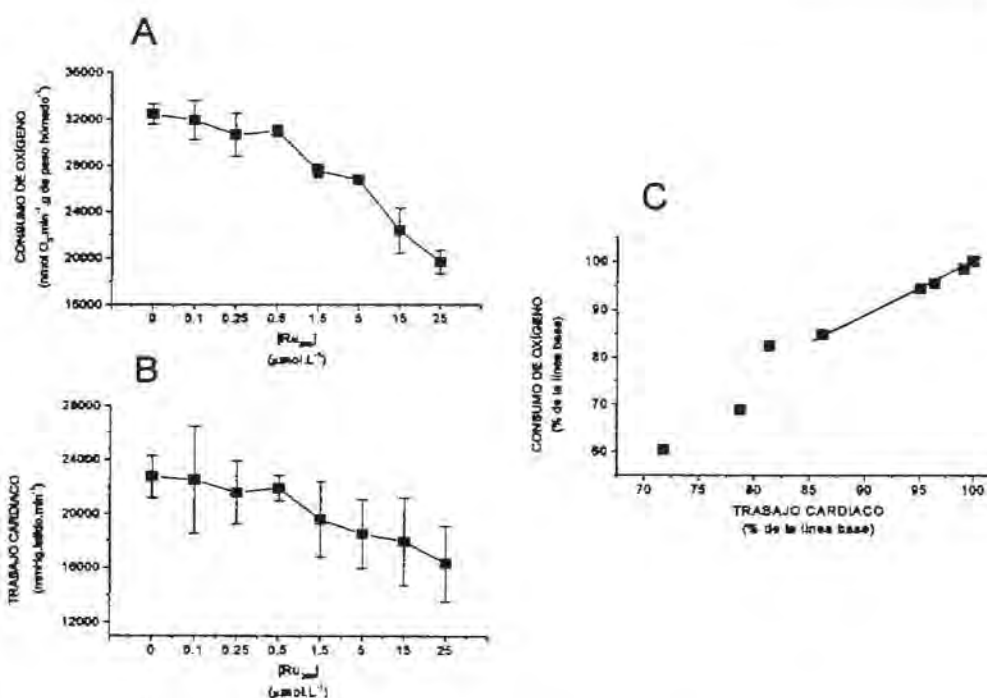


Figura 28. Efecto del RU₃₆₀ sobre la relación entre el metabolismo energético y el trabajo cardíaco. El panel A muestra el efecto de concentraciones crecientes del RU₃₆₀ sobre el consumo de oxígeno (respiración mitocondrial). El panel B muestra el efecto sobre el trabajo cardíaco. El panel C muestra la relación porcentual normalizada entre estas dos variables. Las diferentes concentraciones de RU₃₆₀ se perfundieron en corazones normóxicos por 30 minutos antes de determinar las variables. Los valores representan la media \pm ES de al menos 3 diferentes experimentos.

Algunos grupos han reportado que la activación del metabolismo mitocondrial en el corazón es relevante durante la sobrecarga de trabajo, como la que genera la estimulación hormonal (52); por ello en esta condición evaluamos el acoplamiento entre el metabolismo y el trabajo cardíaco. El análisis comprendió corazones controles tratados con concentraciones crecientes de norepinefrina (10 nmol.L^{-1} - $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) y tratados con RU₃₆₀ ($0.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) y sometidos a la estimulación adrenérgica.

El análisis de la relación gasto de ATP (trabajo cardíaco)/producción de ATP (metabolismo oxidativo) mostró para los corazones controles linealidad y acoplamiento; pero en los tratados con RU₃₆₀, esta relación se desplazó hacia el metabolismo oxidativo, mostrando que la inhibición del UCam limita el trabajo cardíaco. Es importante hacer notar que a pesar de que el consumo de oxígeno aumentó, el trabajo no fue proporcional; este comportamiento sugiere una disminución en la generación de ATP (Figura 29C). En estas condiciones, sería interesante determinar algunos metabolitos energéticos, como el ATP, la fosfocreatina y el Pi, a fin de poder relacionar su concentración con el trabajo cardíaco. El paradójico aumento en el consumo de oxígeno podría explicarse como el desacoplamiento de la respiración mitocondrial. Respecto a esta posibilidad hemos observado que durante la estimulación con norepinefrina, el lactato aumenta casi al doble

en los corazones tratados con Ru₃₆₀, sugiriendo una disminución importante en el pH intracelular, dicha condición podría producir desacoplamiento entre la síntesis de ATP y la respiración mitocondrial. Esta posibilidad podría evaluarse experimentalmente, por medio de sondas fluorescentes para pH o por medio de resonancia magnética nuclear (³¹PNMR) que podría determinar en conjunto los metabolitos energéticos. Podrían estudiarse los mecanismos por los que la inhibición del UCam producen un aumento en el metabolismo anaeróbico (glucólisis) en condiciones de estimulación adrenérgica. Una hipótesis es que la activación de la fosfofructoquinasa tipo II a través de cinasas como las dependientes de AMP o AMPc pudiera estar involucrada.

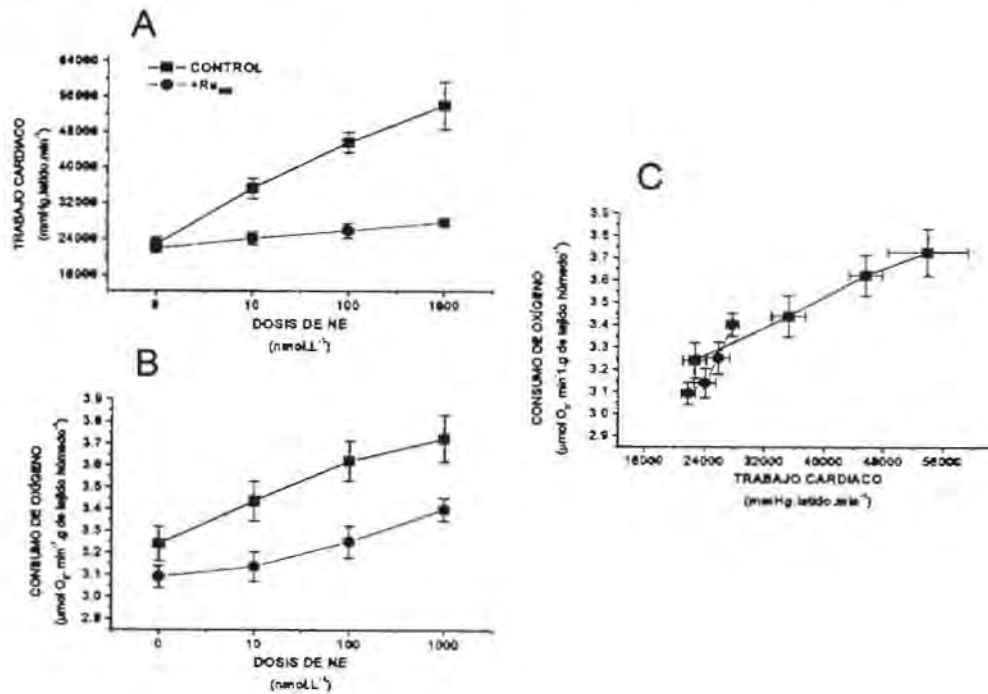


Figura 29. Efecto del Ru₃₆₀ sobre la relación entre el metabolismo energético y el trabajo cardíaco en condiciones de sobrecarga de trabajo. El panel A muestra el efecto de concentraciones crecientes de norepinefrina sobre el consumo de oxígeno (respiración mitocondrial) de corazones controles (■) y tratados con Ru₃₆₀ (*). El panel B muestra el efecto sobre el trabajo cardíaco. El panel C muestra la relación entre los parámetros anteriores. La concentración utilizada de Ru₃₆₀ fue 0.5 μmol.L⁻¹. Los valores representan la media ± ES de al menos 3 diferentes experimentos.

Como se puede observar, el potencial de utilización del Ru₃₆₀, no incluye solamente la protección del miocardio durante la reperfusión; también puede ser una herramienta para estudiar la activación del metabolismo mitocondrial y su impacto sobre el funcionamiento del corazón.

VII.- REFERENCIAS

- 1) Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud 2000. Secretaria de Salud. México. 2003.
- 2) Opie LH. Reperfusion injury and its pharmacologic modification. *Circulation*. 1989. 80:1049-62.
- 3) Maxwell SR, Lip GY. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int J Cardiol*. 1997. 58:95-117.
- 4) Duchen MR. Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes*. 2004. 53:96-102.
- 5) Gottlieb RA. Mitochondrial signaling in apoptosis: mitochondrial daggers to the breaking heart. *Basic Res Cardiol*. 2003. 98:242-9.
- 6) Weiss JN, Korge P, Honda HM, Ping P. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ Res*. 2003. 93:282-301.
- 7) Berne RM. Regulation of coronary blood flow. *Physiol Rev*. 1964. 44:1-29.
- 8) Ferrari R, Pedersini P, Bongrazio M, Gaia G, Bemocchi P, Di Lisa F, Visioli O. Mitochondrial energy production and cation control in myocardial ischaemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol*. 1993. 88:495-512.
- 9) Carvajal K, Moreno-Sanchez R. Heart metabolic disturbances in cardiovascular diseases *Arch Med Res*. 2003. 34:89-99.
- 10) Jacobus WE, Pores IH, Lucas SK, Weisfeldt ML, Flaherty JT. Intracellular acidosis and contractility in the normal and ischemic heart as examined by ³¹P NMR. *J Mol Cell Cardiol*. 1982. 14:13-20.
- 11) Opie L. Effects of regional ischemia on metabolism of glucose and fatty acids. Relative rates of aerobic and anaerobic energy production during myocardial infarction and comparison with effects of anoxia. *Circ Res*. 1976. 38:152-74.
- 12) Hotta Y, Nakagawa J, Ishikawa N, Wakida Y, Ando H, Takeya K, Ohashi N, Matsui K. Protective effect of SM-20550, a selective Na⁺-H⁺ exchange inhibitor, on ischemia-reperfusion-injured hearts. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2001. 37:143-54.
- 13) Tanaka H, Nishimaru K, Aikawa T, Hirayama W, Tanaka Y, and Shigenobu K. Effect of SEA0400, a novel inhibitor of sodium-calcium exchanger, on myocardial ionic currents. *Br J Pharmacol*. 2002. 135: 1096-1100.
- 14) Saotome M, Katoh H, Satoh H, Nagasaka S, Yoshihara S, Terada H, Hayashi H. Mitochondrial membrane potential modulates regulation of mitochondrial Ca²⁺ in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005. 288:H1820-8.
- 15) Manning AS, Hearse DJ. Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention. *J Mol Cell Cardiol*. 1984. 16:497-518.
- 16) Lesnfsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia-reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2001. 33:1065-89.
- 17) Sadek HA, Nulton-Persson AC, Szweda PA, Szweda LI. Cardiac ischemia/reperfusion, aging, and redox-dependent alterations in mitochondrial function. *Arch Biochem Biophys*. 2003. 420:201-8.
- 18) Otani H, Tanaka H, Inoue T, Umemoto M, Omoto K, Tanaka K, Sato T, Osako T, Masuda A, Nonoyama A. *In vitro* study on contribution of oxidative metabolism of isolated rabbit heart mitochondria to myocardial reperfusion injury. *Circ Res*. 1984. 55:168-75.

REFERENCIAS

- 19) Ambrosio G, Zweier JL, Duilio C, Kuppusamy P, Santoro G, Elia PP, Tritto I, Ciriolo P, Condorelli M, Chiariello M. 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.* 1993. 268:18532-41.
- 20) McCord JM. Oxygen-derived free radicals in posts ischemic tissue injury. *N Engl J Med.* 1985. 312:159-63.
- 21) Jennings RB, Steenbergen C Jr. Nucleotide metabolism and cellular damage in myocardial ischemia. *Annu Rev Physiol.* 1985. 47:727-49.
- 22) Beetsch JW, Park TS, Dugan LL, Shah AR, Gidday JM. Xanthine oxidase-derived superoxide causes reoxygenation injury of ischemic cerebral endothelial cells. *Brain Res.* 1998. 786:89-95.
- 23) Kaminski KA, Bonda TA, Korecki J, Musial WJ. Oxidative stress and neutrophil activation—the two keystones of ischemia/reperfusion injury. *Int J Cardiol.* 2002. 86:41-59.
- 24) Ko W, Hawes AS, Lazenby WD, Calvano SE, Shin YT, Zelano JA, Antonacci AC, Isom OW, Krieger KH. Myocardial reperfusion injury. Platelet-activating factor stimulates polymorphonuclear leukocyte hydrogen peroxide production during myocardial reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1991. 102:297-308.
- 25) Silverman HS, Stern MD. Ionic basis of ischaemic cardiac injury: insights from cellular studies. *Cardiovasc Res.* 1994. 28:581-97.
- 26) Allshire A, Piper HM, Cuthbertson KS, Cobbold PH. Cytosolic free Ca^{2+} in single rat heart cells during anoxia and reoxygenation. *Biochem J.* 1987. 244:381-5.
- 27) Miyata H, Lakatta EG, Stern MD, Silverman HS. Relation of mitochondrial and cytosolic free calcium to cardiac myocyte recovery after exposure to anoxia. *Circ Res.* 1992. 71:605-13.
- 28) Barry WH. Mechanisms of myocardial cell injury during ischemia and reperfusion. *J Card Surg.* 1987. 2:375-83.
- 29) Yoshida K, Yamasaki Y, Kawashima S. Calpain activity alters in rat myocardial subfractions after ischemia or reperfusion. *Biochim Biophys Acta.* 1993. 1182:215-20.
- 30) Matsumura Y, Saeki E, Inoue M, Hori M, Kamada T, Kusuoka H. Inhomogeneous disappearance of myofilament-related cytoskeletal proteins in stunned myocardium of guinea pig. *Circ Res.* 1996. 79:447-54.
- 31) Singh RB, Chohan PK, Dhalla NS, Netticadan T. The sarcoplasmic reticulum proteins are targets for calpain action in the ischemic-reperfused heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2004. 37:101-10.
- 32) Nakamura H, Nemenoff RA, Gronich JH, Bonventre JV. Subcellular characteristics of phospholipase A2 activity in the rat kidney. Enhanced cytosolic, mitochondrial, and microsomal phospholipase A2 enzymatic activity after renal ischemia and reperfusion. *J Clin Invest.* 1991. 87:1810-8.
- 33) Goto S, Nakamura H, Morooka H, Terao Y, Shibata O, Sumikawa K. Role of reactive oxygen in phospholipase A2 activation by ischemia/reperfusion of the rat kidney. *J Anesth.* 1999. 13:90-3.
- 34) Moreno-Sanchez R. Regulation of oxidative phosphorylation in mitochondria by external free Ca^{2+} concentrations. *J Biol Chem.* 1985. 260:4028-34.
- 35) Silverman HS. Mitochondrial free calcium regulation in hypoxia and reoxygenation: relation to cellular injury. *Basic Res Cardiol.* 1993. 88:483-94.
- 36) Darley-Usmar VM, Stone D, Smith D, Martin JF. Mitochondria, oxygen and reperfusion damage. *Ann Med.* 1991. 23:583-8.
- 37) Wasserman RH. Vitamin D and the dual processes of intestinal calcium absorption. *J Nutr.* 2004. 134:3137-9.

- 38) Franzini-Armstrong C, Protasi F, Tjsskens P. The assembly of calcium release units in cardiac muscle. *Ann N Y Acad Sci.* 2005. 1047:76-85.
- 39) Winslow RL, Rice J, Jafri S, Marban E, O'Rourke B. Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure, II: model studies. *Circ Res.* 1999. 84:571-86.
- 40) Schatzmann HJ. ATP-dependent Ca^{++} -extrusion from human red cells. *Experientia.* 1966. 22(6):364-5.
- 41) Lotersztajn S, Eparand R, Mallat A, Pavoine C, Pecker F. The liver plasma membrane Ca^{2+} pump: hormonal sensitivity. *Biochimie.* 1985. 67:1169-7.
- 42) Hasselbach W. ATP-driven active transport of calcium in the membranes of sarcoplasmic reticulum. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1964. 160:501-4.
- 43) Marx SO, Marks AR. Regulation of the ryanodine receptor in heart failure. *Basic Res Cardiol.* 2002. 1:149-51.
- 44) Bers DM, Fill M. Coordinated feet and the dance of ryanodine receptors. *Science.* 1998. 281:790-1.
- 45) Xu L, Meissner G. Regulation of cardiac muscle Ca^{2+} release channel by sarcoplasmic reticulum lumenal Ca^{2+} . *Biophys J.* 1998. 75:2302-12.
- 46) Yanp M, Yamamoto T, Ikemoto N, Matsuzaki M. Abnormal ryanodine receptor function in heart failure. *Pharmacol Ther.* 2005.107:377-91.
- 47) Gunter TE, Pfeiffer DR. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol.* 1990. 258:C755-86.
- 48) Gunter TE, Gunter KK, Sheu SS, Gavin CE. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am J Physiol.* 1994. 267:C313-39.
- 49) Lenzen S, Munster W, Rustenbeck I. Dual effect of spermine on mitochondrial Ca^{2+} transport. *Biochem J.* 1992. 286:597-602.
- 50) Montero M, Lobaton CD, Hernandez-Sanmiguel E, Santodomingo J, Vay L, Moreno A, Alvarez J. Direct activation of the mitochondrial calcium uniporter by natural plant flavonoids. *Biochem J.* 2004. 384:19-24.
- 51) Thayer SA, Müller RJ. Regulation of the intracellular free calcium concentration in single rat dorsal root ganglion neurones *in vitro*. *J Physiol.* 1990. 425:85-115.
- 52) Unitt JF, McCormack JG, Reid D, MacLachlan LK, England PJ. Direct evidence for a role of intramitochondrial Ca^{2+} in the regulation of oxidative phosphorylation in the stimulated rat heart. Studies using ^{31}P n.m.r. and ruthenium red. *Biochem J.* 1989. 262:293-301.
- 53) Hansford RG. Dehydrogenase activation by Ca^{2+} in cells and tissues. *J Bioenerg Biomembr.* 1991. 23:823-54.
- 54) Rizzuto R, Simpson AW, Brini M, Pozzan T. Rapid changes of mitochondrial Ca^{2+} revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature.* 1992. 358:325-7.
- 55) Rizzuto R, Pinton P, Brini M, Chiesa A, Filippin L, Pozzan T. Mitochondria as biosensors of calcium microdomains. *Cell Calcium.* 1999. 26:193-9.
- 56) Hansford RG. Dehydrogenase activation by Ca^{2+} in cells and tissues. *J Bioenerg Biomembr.* 1991. 23:823-54.
- 57) Territo PR, Mootha VK, French SA, Balaban RS. Ca^{2+} activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F(0)/F(1)-ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000. 278:C423-35.

REFERENCIAS

- 58) Mildaziene V, Baniene R, Nauciene Z, Bakker BM, Brown GC, Westerhoff HV, Kholodenko BN. Calcium indirectly increases the control exerted by the adenine nucleotide translocator over 2-oxoglutarate oxidation in rat heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys*. 1995. 324:130-4.
- 59) Lehninger AL. A soluble, heat-labile, high-affinity Ca^{2+} -binding factor extracted from rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*. 1971. 42:312-8.
- 60) Gomez-Puyou A, De Gomez-Puyou MT, Becker G, Lehninger AL. An insoluble Ca^{2+} -binding factor from rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*. 1972. 47:814-9.
- 60a) Moore C. Specific inhibition of mitochondrial Ca^{++} transport by ruthenium red. *Biochem Biophys Res Commun*. 1971. 42:298-305.
- 61) Panfili E, Sandri G, Sottocasa GL, Lunazzi G, Liut G, Graziosi G. Specific inhibition of mitochondrial Ca^{2+} transport by antibodies directed to the Ca^{2+} -binding glycoprotein. *Nature*. 1976. 264:185-6.
- 62) Saris NE, Sirota TV, Virtanen I, Niva K, Penttila T, Dolgachova LP, Mironova GD. Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter by antibodies against a 40-kDa glycoprotein. *J Bioenerg Biomembr*. 1993. 25:307-12.
- 63) Mironova GD, Sirota TV, Pronevich LA, Trofimenko NV, Mironov GP, Grigorjev PA, Kondrashova MN. Isolation and properties of Ca^{2+} -transporting glycoprotein and peptide from beef heart mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*. 1982. 14:213-25.
- 64) Mironova GD, Baumann M, Kolomytkin O, Krasichkova Z, Berdimuratov A, Sirota T, Virtanen I, Saris NE. Purification of the channel component of the mitochondrial calcium uniporter and its reconstitution into planar lipid bilayers. *J Bioenerg Biomembr*. 1994. 26:231-8.
- 65) Zazueta C, Zafra G, Vera G, Sanchez C, Chavez E. Advances in the purification of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter using the labeled inhibitor $^{103}\text{Ru}_{360}$. *J Bioenerg Biomembr*. 1998. 30:489-98.
- 66) Zazueta C, Correa F, Garcia N, Garcia G de J. Different subunit location of the inhibition and transport sites in the mitochondrial calcium uniporter. *J Bioenerg Biomembr*. 2004. 36:439-45.
- 67) Correa F, Zazueta C. Mitochondrial glycosidic residues contribute to the interaction between ruthenium amine complexes and the calcium uniporter. *Mol Cell Biochem*. 2005. 272:55-62.
- 68) Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*. 2004. 427:360-4.
- 69) Montero M, Lobaton CD, Hernandez-Sanmiguel E, Santodomingo J, Vay L, Moreno A, Alvarez J. Direct activation of the mitochondrial calcium uniporter by natural plant flavonoids. *Biochem J*. 2004. 384:19-24.
- 70) Knox CD, Belous AE, Pierce JM, Wakata A, Nicoud IB, Anderson CD, Pinson CW, Chari RS. Novel role of phospholipase C- δ 1: regulation of liver mitochondrial Ca^{2+} uptake. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004. 287:G533-40.
- 71) Montero M, Lobaton CD, Moreno A, Alvarez J. A novel regulatory mechanism of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter revealed by the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB202190. *FASEB J*. 2002. 16:1955-7.
- 72) Montero M, Alonso MT, Albillas A, Garcia-Sancho J, Alvarez J. Mitochondrial Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release mediated by the Ca^{2+} uniporter. *Mol Biol Cell*. 2001. 12:63-71.
- 73) Ichas F, Jouaville LS, Mazat JP. Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell*. 1997. 89:1145-53.

REFERENCIAS

- 74) Crompton M, Costi A. A heart mitochondrial Ca^{2+} -dependent pore of possible relevance to re-perfusion-induced injury. Evidence that ADP facilitates pore interconversion between the closed and open states. *Biochem J*. 1990. 266:33-9.
- 75) Zoratti M, Szabo I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta*. 1995. 1241:139-76.
- 76) Grover GJ, Atwal KS, Sleph PG, Wang FL, Monshizadegan H, Monticello T, Green DW. Excessive ATP hydrolysis in ischemic myocardium by mitochondrial F1F0-ATPase: effect of selective pharmacological inhibition of mitochondrial ATPase hydrolase activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004. 287:H1747-55.
- 77) Hurtado A. Some clinical aspects of life at high altitudes. *Ann Intern Med*. 1960. 53:247-58.
- 78) Poupa O, Krofta K, Prochazka J, Turek Z. Acclimation to simulated high altitude and acute cardiac necrosis. *Fed Proc*. 1966. 25:1243-6.
- 79) Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986. 74:1124-36.
- 80) Noma A. ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. *Nature*. 1983. 305:147-8.
- 81) Yao Z, Gross GJ. Effects of the K_{ATP} channel opener bimakalim on coronary blood flow, monophasic action potential duration, and infarct size in dogs. *Circulation*. 1994. 89:1769-75.
- 82) Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T. ATP-sensitive K^+ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature*. 1991. 352:244-7.
- 83) Paucek P, Mironova G, Mahdi F, Beavis AD, Woldegiorgis G, Garlid KD. Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K^+ channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J Biol Chem*. 1992. 267:26062-9.
- 84) Gross GJ, Fryer RM. Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels and myocardial preconditioning. *Circ Res*. 1999. 84:973-9.
- 85) Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, Grover GJ. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res*. 1997. 81:1072-82.
- 86) Liu Y, Ren G, O'Rourke B, Marban E, Seharaseyon J. Pharmacological comparison of native mitochondrial $\text{K}(\text{ATP})$ channels with molecularly defined surface $\text{K}(\text{ATP})$ channels. *Mol Pharmacol*. 2001. 59:225-30.
- 87) Jung O, Englert HC, Jung W, Gogelein H, Scholkens BA, Busch AE, Linz W. The $\text{K}(\text{ATP})$ channel blocker HMR 1883 does not abolish the benefit of ischemic preconditioning on myocardial infarct mass in anesthetized rabbits. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 2000. 361:445-51.
- 88) Kitakaze M, Hori M, Takashima S, Sato H, Inoue M, Kamada T. Ischemic preconditioning increases adenosine release and 5'-nucleotidase activity during myocardial ischemia and reperfusion in dogs. Implications for myocardial salvage. *Circulation*. 1993. 87:208-15.
- 89) Genade S, Moolman JA, Lochner A. Opioid receptor stimulation acts as mediator of protection in ischaemic preconditioning. *Cardiovasc J S Afr*. 200. 12:8-16.
- 90) Parratt JR, Vegh A, Papp JG. Bradykinin as an endogenous myocardial protective substance with particular reference to ischemic preconditioning—a brief review of the evidence. *Can J Physiol Pharmacol*. 19950. 73:837-42.

REFERENCIAS

- 91) Naga Prasad SV, Barak LS, Rapacciuolo A, Caron MG, Rockman HA. Agonist-dependent recruitment of phosphoinositide 3-kinase to the membrane by β -adrenergic receptor kinase 1: a role in receptor sequestration. *J Biol Chem*. 2001. 276: 18953-1895.
- 92) Murphy E. Primary and secondary signaling pathways in early preconditioning that converge on the mitochondria to produce cardioprotection. *Circ Res*. 2004. 94:7-16.
- 93) Axford-Gatley RA, Wilson GJ. Reduction of experimental myocardial infarct size by oral administration of alpha-tocopherol. *Cardiovasc Res*. 1991. 25:89-92.
- 94) Petty MA, Dow J, Grisar JM, De Jong W. Effect of a cardioselective alpha-tocopherol analogue on reperfusion injury in rats induced by myocardial ischaemia. *Eur J Pharmacol*. 1991. 192:383-8.
- 95) Haramaki N, Packer L, Assadnazari H, Zimmer G. Cardiac recovery during post-ischemic reperfusion is improved by combination of vitamin E with dihydrolipoic acid. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993. 196:1101-7.
- 96) Ambrosio G, Becker LC, Hutchins GM, Weisman HF, Weisfeldt ML. Reduction in experimental infarct size by recombinant human superoxide dismutase: insights into the pathophysiology of reperfusion injury. *Circulation*. 1986. 76:1424-33.
- 97) Uraizae A, Reimer KA, Murry CE, Jennings RB. Failure of superoxide dismutase to limit size of myocardial infarction after 40 minutes of ischemia and 4 days of reperfusion in dogs. *Circulation*. 1987. 75:1237-48.
- 98) Shuter SL, Davies MJ, Garlick PB, Hearse DJ, Slater TF. Studies on the effects of antioxidants and inhibitors of radical generation on free radical production in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy. *Free Radic Res Commun*. 1990. 9:223-32.
- 99) Clark RE, Christlieb IY, Henry PD, Fischer AE, Nora JD, Williamson JR, Sobel BE. Nifedipine: a myocardial protective agent. *Am J Cardiol*. 1979. 44:825-31.
- 100) Yoon SB, McMillin-Wood JB, Michael LH, Lewis RM, Entman ML. Protection of canine cardiac mitochondrial function by verapamil-cardioplegia during ischemic arrest. *Circ Res*. 1985. 56:704-8.
- 101) Gaviraghi G, Michell D, Trist DG. Recent developments in the use of calcium antagonists in myocardial protection. *Pharmacol Res*. 1995. 31:251-4.
- 102) Chavez E, Tellez F, Pichardo J, Milan R, Cuellar A, Carbajal K, Cruz D. On the protection by ketorolac of reperfusion-induced heart damage. *Comp Biochem Physiol C*. 1996. 115:95-100.
- 103) Chavez R, Bravo C, Zazueta C, Pichardo J, Uribe A, Corona N, Reyes-Vivas H, Gonzalez C, Chavez E. Ionophoretic-like properties of ketorolac for calcium. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993. 267:1134-9.
- 104) Thandroyen FT, McCarthy J, Burton KP, Opie LH. Ryanodine and caffeine prevent ventricular arrhythmias during acute myocardial ischemia and reperfusion in rat heart. *Circ Res*. 1988. 62:306-14.
- 105) Yu G, Zucchi R, Ronca-Testoni S, Ronca G. Protection of ischemic rat heart by dantrolene, an antagonist of the sarcoplasmic reticulum calcium release channel. *Basic Res Cardiol*. 2000. 95:137-43.
- 106) Nazareth W, Yafei N, Crompton M. Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin A. *J Mol Cell Cardiol*. 1991. 23:1351-4.
- 107) Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J*. 1995. 307:93-8.

REFERENCIAS

- 108) Richter C, Winterhalter KH, Baumhuter S, Lotscher HR, Moser B. ADP-ribosylation in inner membrane of rat liver mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983. 80:3188-92.
- 109) Di Lisa F, Menabo R, Canton M, Barile M, Bernardi P. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD^+ and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem*. 2001. 276:2571-5.
- 110) Arteaga D, Odor A, Lopez RM, Contreras G, Pichardo J, Garcia E, Aranda A, Chavez E. Impairment by cyclosporin A of reperfusion-induced arrhythmias. *Life Sci*. 1992. 51:1127-34.
- 111) Griffiths EJ, Halestrap AP. Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1993. 25:1461-9.
- 112) Clarke SJ, McStay GP, Halestrap AP. Sangliferhrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A. *J Biol Chem*. 2002. 277:34793-9.
- 113) Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, Chalabreysse L, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*. 2005. 38:367-74.
- 114) Brustovetsky N, Tropschug M, Heimpel S, Heldkamper D, Klingenberg M. A large Ca^{2+} -dependent channel formed by recombinant ADP/ATP carrier from *Neurospora crassa* resembles the mitochondrial permeability transition pore. *Biochemistry*. 2002. 41:11804-11.
- 115) Klingenberg M. Principles of carrier catalysis elucidated by comparing two similar membrane translocators from mitochondria, the ADP/ATP carrier and the uncoupling protein. *Ann N Y Acad Sci*. 1985. 456:279-88.
- 116) Chavez E, Pena A, Zazueta C, Ramirez J, Garcia N, Camillo R. Inactivation of mitochondrial permeability transition pore by octylguanidine and octylamine. *J Bioenerg Biomembr*. 2000. 32:193-8.
- 117) Parra E, Cruz D, Garcia G, Zazueta C, Correa F, Garcia N, Chavez E. Myocardial protective effect of octylguanidine against the damage induced by ischemia reperfusion in rat heart. *Mol Cell Biochem*. 2005. 269:19-26.
- 118) Brustovetsky N, Dubinsky JM. Limitations of cyclosporin A inhibition of the permeability transition in CNS mitochondria. *J Neurosci*. 2000. 20:8229-37.
- 119) Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004. 287:C817-33.
- 120) Brustovetsky N, Klingenberg M. Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca^{2+} . *Biochemistry*. 1996. 35:8483-8.
- 121) Ferrari R, di Lisa F, Raddino R, Visioli O. The effects of ruthenium red on mitochondrial function during post-ischaemic reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 1982. 14:737-40.
- 122) Benzi RH, Lerch R. Dissociation between contractile function and oxidative metabolism in postischemic myocardium. Attenuation by ruthenium red administered during reperfusion. *Circ Res*. 1992. 71:567-7.
- 123) Grover GJ, Dzwonczyk S, Sleph PG. Ruthenium red improves postischemic contractile function in isolated rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1990. 16:783-9.
- 124) Zucchi R, Ronca F, Ronca-Testoni S. Modulation of sarcoplasmic reticulum function: a new strategy in cardioprotection?. *Pharmacol Ther*. 2001. 89:47-65.

REFERENCIAS

- 125) Ying WL, Emerson J, Clarke MJ, Sanadi DR. Inhibition of mitochondrial calcium ion transport by an oxo-bridged dinuclear ruthenium ammine complex. *Biochemistry*. 1991. 30:4949-52.
- 126) Matlib MA, Zhou Z, Knight S, Ahmed S, Choi KM, Krause-Bauer J, Phillips R, Altschuld R, Katsube Y, Sperelakis N, Bers DM. Oxygen-bridged dinuclear ruthenium amine complex specifically inhibits Ca^{2+} uptake into mitochondria *in vitro* and *in situ* in single cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 1998. 273:10223-31.
- 127) Wieckowski MR, Wojtczak L. Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Lett*. 1998. 423:339-42.
- 128) Hansford RG, Cohen L. Relative importance of pyruvate dehydrogenase interconversion and feed-back inhibition in the effect of fatty acids on pyruvate oxidation by rat heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys*. 1978. 191:65-81.
- 129) McCormack JG, Denton RM. Role of Ca^{2+} ions in the regulation of intramitochondrial metabolism in rat heart. Evidence from studies with isolated mitochondria that adrenaline activates the pyruvate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase complexes by increasing the intramitochondrial concentration of Ca^{2+} . *Biochem J*. 1984. 218:235-47.
- 130) Moreno-Sanchez R, Hansford RG. Dependence of cardiac mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity on intramitochondrial free Ca^{2+} concentration. *Biochem J*. 1988 Dec 1;256(2):403-12.
- 131) Pepe S, Tsuchiya N, Lakatta EG, Hansford RG. PUFA and aging modulate cardiac mitochondrial membrane lipid composition and Ca^{2+} activation of PDH. *Am J Physiol*. 1999. 276:H149-58.
- 132) Glastris B, Pfeiffer SE. Mammalian membrane marker enzymes: sensitive assay for 5'-nucleotidase and assay for mammalian 2',3'-cyclic-nucleotide-3'-phosphohydrolase. *Methods Enzymol*. 1974. 32:124-31.
- 133) Ferguson-Miller S, Brautigan DL, Margoliash E. Definition of cytochrome c binding domains by chemical modification. III. Kinetics of reaction of carboxydinitrophenyl cytochromes c with cytochrome c oxidase. *J Biol Chem*. 1978. 253:149-59.
- 134) Colilla W, Jorgenson RA, Nordlie RC. Mammalian carbamyl phosphate: glucose phosphotransferase and glucose-6-phosphate phosphohydrolase: extended tissue distribution. *Biochim Biophys Acta*. 1975. 377:117-25.
- 135) Meissner G, Henderson JS. Rapid calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles is dependent on Ca^{2+} and is modulated by Mg^{2+} , adenine nucleotides, and calmodulin. *J Biol Chem*. 1987. 262:3065-73.
- 136) Tellez JF, Carvajal K, Cruz D, Carabez A, Chavez E. Effect of peroxone on arrhythmias and markers of cell injury during reperfusion in the anesthetized rat. *Life Sci*. 1999. 65:1615-23.
- 137) Hoerter J, Gonzalez-Barroso MD, Couplan E, Mateo P, Gelly C, Cassard-Doucier AM, Diolez P, Bouillaud F. Mitochondrial uncoupling protein 1 expressed in the heart of transgenic mice protects against ischemic-reperfusion damage. *Circulation*. 2004. 110:528-33.
- 138) Fortin P, Dumont A, Babai F. Ultracytochemical study of lytic complex insertion in the glycocalyx of red cells during immune hemolysis mediated by complement. *J Struct Biol*. 1990.103:241-8.
- 139) Baldwin KM. The fine structure of healing over in mammalian cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol*. 1977. 9:959-66.
- 140) Gupta MP, Innes IR, Dhalla NS. Responses of contractile function to ruthenium red in rat heart. *Am J Physiol*. 1988. 255:H1413-20.
- 141) Van de Velde M, DeWolff M, Leather HA, Wouters PF. Effects of lipids on the functional and metabolic recovery from global myocardial stunning in isolated rabbit hearts. *Cardiovasc Res*. 2000. 48:129-37.

- 142) Di Lisa F, Menabo R, Barbato R, Siliprandi N. Contrasting effects of propionate and propionyl-L-carnitine on energy-linked processes in ischemic hearts. *Am J Physiol*. 1994. 267:H455-61.
- 143) Xu L, Tripathy A, Pasek DA, Meissner G. Ruthenium red modifies the cardiac and skeletal muscle Ca^{2+} release channels (ryanodine receptors) by multiple mechanisms. *J Biol Chem*. 1999. 274:32680-91.
- 144) del Monte F, Lebeche D, Guerrero JL, Tsuji T, Doye AA, Gwathmey JK, Hajjar RJ. Abrogation of ventricular arrhythmias in a model of ischemia and reperfusion by targeting myocardial calcium cycling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004. 101:5622-7.
- 145) Tsuchihashi K, Curtis MJ. Influence of tedisamil on the initiation and maintenance of ventricular fibrillation: chemical defibrillation by Ito blockade? *J Cardiovasc Pharmacol*. 1991. 18:445-56.
- 145a) Walker MJ, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RW, Janse MJ, Yellon DM, Cobbe SM, Coker SJ, Harness JB, Harron DW. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res*. 1988. 22:447-55.
- 146) Vinnakota KC, Bassingthwaite JB. Myocardial density and composition: a basis for calculating intracellular metabolite concentrations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004. 286:H1742-9.
- 147) Carvajal K, El Hafidi M, Baños G. Myocardial damage due to ischemia and reperfusion in hypertriglyceridemic and hypertensive rats: participation of free radicals and calcium overload. *J Hypertens*. 1999. 17:1607-16.
- 148) Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation*. 2001. 104:2981-9.
- 149) EMIP-FR group. Effect of 48-h intravenous trimetazidine on short- and long-term outcomes of patients with acute myocardial infarction, with and without thrombolytic therapy; A double-blind, placebo-controlled, randomized trial. The EMIP-FR Group. European Myocardial Infarction Project—Free Radicals. *Eur Heart J*. 2000. 21:1537-46.
- 150) Cannon RO 3rd. Mechanisms, management and future directions for reperfusion injury after acute myocardial infarction. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2005. 2:88-94.
- 151) Verma S, Fedak PW, Weisel RD, Butany J, Rao V, Maitland A, Li RK, Dhillon B, Yau TM. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation*. 2002. 105:2332-6.
- 152) Yellon DM, Baxter GF. Reperfusion injury revisited: is there a role for growth factor signaling in limiting lethal reperfusion injury?. *Trends Cardiovasc Med*. 1999. 9:245-9.
- 153) Ross AM, Gibbons RJ, Stone GW, Kloner RA, Alexander RW. AMISTAD-II Investigators. 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*. 2005. 45:1775-80.
- 154) Rupprecht HJ, vom Dahl J, Terres W, Seyfarth KM, Richardt G, Schultheis HP, Buerke M, Sheehan FH, Drexler H. Cardioprotective effects of the Na^{+}/H^{+} exchange inhibitor cariporide in patients with acute anterior myocardial infarction undergoing direct PTCA. *Circulation*. 2000. 101:2902-8.
- 155) Ito H, Taniyama Y, Iwakura K, Nishikawa N, Masuyama T, Kuzuya T, Hori M, Higashino Y, Fujii K, Minamino T. Intravenous nicorandil can preserve microvascular integrity and myocardial viability in patients with reperfused anterior wall myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 1999. 33:654-60.
- 156) Temsah RM, Netticadan T, Chapman D, Takeda S, Mochizuki S, Dhalla NS. Alterations in sarcoplasmic reticulum function and gene expression in ischemic-reperfused rat heart. *Am J Physiol*. 1999. 277:H584-94.
- 157) Hajnoczky G, Csordas G, Madesh M, Pacher P. The machinery of local Ca^{2+} signalling between sarco-endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Physiol*. 2000. 529:69-81.

- 158) Filippin L, Magalhaes PJ, Di Benedetto G, Colella M, Pozzan T. Stable interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum allow rapid accumulation of calcium in a subpopulation of mitochondria. *J Biol Chem*. 2003; 278:39224-34.
- 159) Molkenin JD. Calcineurin and beyond: cardiac hypertrophic signaling. *Circ Res*. 2000; 87:731-8.
- 160) Javadov SA, Clarke S, Das M, Griffiths EJ, Lim KH, Halestrap AP. Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart. *J Physiol*. 2003; 549:513-24.
- 161) Lesnefsky EJ, Hoppel CL. Ischemia-reperfusion injury in the aged heart: role of mitochondria. *Arch Biochem Biophys*. 2003; 420:287-97.
- 162) Lesnefsky EJ, Chen Q, Moghaddas S, Hassan MO, Tandler B, Hoppel CL. Blockade of electron transport during ischemia protects cardiac mitochondria. *J Biol Chem*. 2004; 279:47961-7.
- 163) Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL. Heterogeneous response of subsarcolemmal heart mitochondria to calcium. *Am J Physiol*. 1986; 250:H741-8.
- 164) Zazueta C, Sosa-Torres ME, Correa F, Garza-Ortiz A. Inhibitory properties of ruthenium amine complexes on mitochondrial calcium uptake. *J Bioenerg Biomembr*. 1999; 31:551-7.
- 165) Schulman D, Latchman DS, Yellon DM. Effect of aging on the ability of preconditioning to protect rat hearts from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 281:H1630-6.
- 166) Wang L, Cherednichenko G, Hernandez L, Halow J, Camacho SA, Figueredo V, Schaefer S. Preconditioning limits mitochondrial Ca^{2+} during ischemia in rat hearts: role of K(ATP) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 280:H2321-8.
- 167) Fryer RM, Eells JT, Hsu AK, Henry MM, Gross GJ. Ischemic preconditioning in rats: role of mitochondrial K(ATP) channel in preservation of mitochondrial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; 278:H305-12.
- 168) Miyamae M, Camacho SA, Weiner MW, Figueredo VM. Attenuation of posts ischemic reperfusion injury is related to prevention of $[Ca^{2+}]_m$ overload in rat hearts. *Am J Physiol*. 1996; 271:H2145-53.
- 169) Carry MM, Mrak RE, Murphy ML, Peng CF, Straub KD, Fody EP. Reperfusion injury in ischemic myocardium: protective effects of ruthenium red and of nitroprusside. *Am J Cardiovasc Pathol*. 1989; 2:335-44.
- 170) Balazs T, Herman EH, Earl FL, Wolff FW. Cardiotoxicity studies with diazoxide, reserpine, guanethidine, and combinations of diazoxide and propranolol in dogs. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1975; 33:498-504.
- 171) Silvani P, Camporesi A, Mandelli A, Wolfier A, Salvo I. A case of severe diazoxide toxicity. *Paediatr Anaesth*. 2004; 14:607-9.
- 172) Belmar E, Garcia-Ugaldé G, Tapia R. Motor alterations and neuronal damage induced by intracerebral administration of Ruthenium red: effect of NMDA receptor antagonists and other anticonvulsant drugs. *Mol Chem Neuropathol*. 1995; 26:285-99.
- 173) Grigalba, M., Vercesi, A. and Schreier, S. Ca^{2+} -induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca^{2+} -stimulation generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. *Biochemistry*. 1999; 38:13279-13287.
- 174) Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett*. 2001; 495:12-5.
- 175) Aronis A, Komarnitsky R, Shilo S, Tirosh O. Membrane depolarization of isolated rat liver mitochondria attenuates permeability transition pore opening and oxidant production. *Antioxid Redox Signal*. 2002; 4:647-54.

REFERENCIAS

- 176) Maciel EN, Vercesi AE, Castilho RF. Oxidative stress in Ca^{2+} -induced membrane permeability transition in brain mitochondria. *J Neurochem*. 2001. 79:1237-45.
- 177) Balaban RS. Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium. *J Mol Cell Cardiol*. 2002. 34:1259-71.

XI.- APÉNDICE

TRABAJOS PUBLICADOS

Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter by the oxo-bridged dinuclear ruthenium amine complex (Ru₃₆₀) prevents from irreversible injury in postischemic rat heart

Gerardo de Jesús García-Rivas¹, Agustín Guerrero-Hernández², Guadalupe Guerrero-Serna², José S. Rodríguez-Zavala¹ and Cecilia Zazueta¹

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología 'Ignacio Chávez', México D.F., México

² Departamento de Bioquímica, CINVESTAV, México D.F., México

Keywords

calcium uniporter; mitochondria; permeability transition pore; reperfusion; Ru₃₆₀

Correspondence

C. Zazueta, Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología 'Ignacio Chávez', Juan Badiano 1, Sección XVI, Tlalpan, México D.F., 14080, México
Fax: +52 55 55730926
Tel: +52 55 55732911 ext. 1465
E-mail: czazueta@hotmail.com

Note

This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for the DSc degree of Gerardo de Jesús García-Rivas for the Doctorate in Biomedical Sciences of the National Autonomous University of Mexico.

(Received 5 April 2005, accepted 16 May 2005)

doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04771.x

Several models of control networks suggest that the cytosolic calcium concentration ($[Ca^{2+}]_c$) regulates both the utilization of ATP in the contractile process, as well as the mitochondrial production of ATP, by increasing the mitochondrial matrix free-calcium concentration ($[Ca^{2+}]_m$) through a mechanism that activates the citrate cycle dehydrogenases in response to specific cell demands [1,2].

Abbreviations

$\Delta\psi$, mitochondrial membrane potential; $[Ca^{2+}]_c$, cytosolic calcium concentration; $[Ca^{2+}]_m$, mitochondrial matrix free-calcium concentration; CsA, cyclosporin A; IFM, interfibrillar mitochondria; I/R, ischemia-reperfusion; mCaU, mitochondrial calcium uniporter; mPTP, mitochondrial permeability transition pore; PDH, pyruvate dehydrogenase; RC, respiratory control; RR, ruthenium red; Ru₃₆₀, oxo-bridged dinuclear ruthenium amine complex; Ryan, ryanodine; RyR, calcium release channel in sarcoplasmic reticulum; SLM, subsarcolemmal mitochondria; SR, sarcoplasmic reticulum; SRV, sarcoplasmic reticulum vesicles.

Mitochondrial calcium overload has been implicated in the irreversible damage of reperfused heart. Accordingly, we studied the effect of an oxo-bridged dinuclear ruthenium amine complex (Ru₃₆₀), which is a selective and potent mitochondrial calcium uniporter blocker, on mitochondrial dysfunction and on the matrix free-calcium concentration in mitochondria isolated from reperfused rat hearts. The perfusion of Ru₃₆₀ maintained oxidative phosphorylation and prevented opening of the mitochondrial permeability transition pore in mitochondria isolated from reperfused hearts. We found that Ru₃₆₀ perfusion only partially inhibited the mitochondrial calcium uniporter, maintaining the mitochondrial matrix free-calcium concentration at basal levels, despite high concentrations of cytosolic calcium. Additionally, we observed that perfused Ru₃₆₀ neither inhibited Ca^{2+} cycling in the sarcoplasmic reticulum nor blocked ryanodine receptors, implying that the inhibition of ryanodine receptors cannot explain the protective effect of Ru₃₆₀ in isolated hearts. We conclude that the maintenance of postischemic myocardial function correlates with an incomplete inhibition of the mitochondrial calcium uniporter. Thus, the chemical inhibition by this molecule could be an approach used to prevent heart injury during reperfusion.

Indeed, under pathological conditions, such as those observed during ischemia-reperfusion (I/R), mitochondrial calcium overload might cause a series of vicious cycles, leading to the transition from reversible to irreversible myocardial injury [3,4]. High $[Ca^{2+}]_m$ generates energy-consuming futile cycles of uptake and release, as mitochondrial transport competes with the oxidative phosphorylation system for respiratory

energy [5]. In addition, mitochondrial calcium overload is related to a nonspecific increase in the inner membrane permeability. This is characterized by a loss of the mitochondrial membrane potential and release of solutes of < 1500 Da across the inner membrane, through a pore sensitive to the immunosuppressant, cyclosporin A (CsA) [6,7]. Increase of $[\text{Ca}^{2+}]_m$ is a specific and almost absolute requirement for this mega channel opening [5]. Our observations, and reports from other researchers, indicate that mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$) and $[\text{Ca}^{2+}]_m$, among other factors, interact strongly to regulate the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) that opens during hypoxia/reoxygenation in isolated mitochondria [8,9]. It is reasonable to predict that in isolated hearts, enhanced cardioprotection would be promoted by interventions that diminish $[\text{Ca}^{2+}]_m$ after I/R, thus preventing the opening of the mPTP. In this regard, ruthenium red (RR), a mitochondrial calcium uptake inhibitor, has been used to prevent the reperfusion injury. Such approaches have shown a diminution on mitochondrial injury [10] and the recovery of contractile function [11]. Indeed, RR interacts with many proteins besides the mitochondrial calcium uniporter (mCaU) [12,13]. It is assumed that the inhibition of such proteins accounts for the observed protective effect, either by reducing the mitochondrial calcium uptake directly or by reducing the $[\text{Ca}^{2+}]_k$ [11].

Recently, a compound identified as an oxygen-bridged dinuclear ruthenium amine complex (Ru_{360}) was isolated from commercial RR samples [14]. This complex has now been established as the most potent and specific inhibitor of the mCaU *in vitro* [15,16]. It has no effect in the sarcoplasmic reticulum (SR) calcium movements or on the sarcolemmal $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, actinomyosin ATPase activity or L-type calcium channel currents, as determined in SR vesicles or in isolated myocytes [15]. To gain insight into the contribution of the mitochondrial uniporter to myocardial injury during I/R in isolated hearts, we examined the ability of perfused Ru_{360} to attenuate tissue injury and to maintain mitochondrial homeostasis.

We found that isolated hearts perfused with 250 nM Ru_{360} demonstrate an impressive recovery of cardiac mechanical functions. Our findings indicate that the mCaU is a specific target of this compound in perfused hearts, as it had no effect on SR calcium uptake/release movements, according to previous reports of intact cardiac myocytes [15]. We also observed that $[\text{Ca}^{2+}]_m$ decreases dramatically in mitochondria obtained from Ru_{360} -treated postischemic hearts, correlating with its ability to maintain ATP

synthesis. We conclude that the ultimate barrier against I/R damage is the mCaU, thus, the chemical inhibition of this molecule could be a strategy for cardioprotection.

Results

Ru_{360} preserves contractile function and mechanical performance in postischemic reperfused hearts

Ru_{360} has been shown to permeate the cell membrane in intact cardiac myocytes and to inhibit calcium uptake into mitochondria, providing that sufficient accumulation is achieved [15]. To determine the effect of this novel compound on the mechanical performance of isolated rat hearts subjected to I/R, hearts were preincubated with Ru_{360} for 30 min before ischemia. We found that pretreatment with Ru_{360} exerted a dose-dependent protective effect on cardiac contractile function against postischemic damage (Fig. 1). A minimum concentration of 250 nM Ru_{360} promoted a maximal mechanical recovery in hearts subjected to I/R. It was possible to maintain this effect with slightly higher concentrations (1 μM) of Ru_{360} . Recovery decreased when concentrations of > 1 μM Ru_{360} were used, possibly owing to contractile activity alterations, as reported for RR [17].

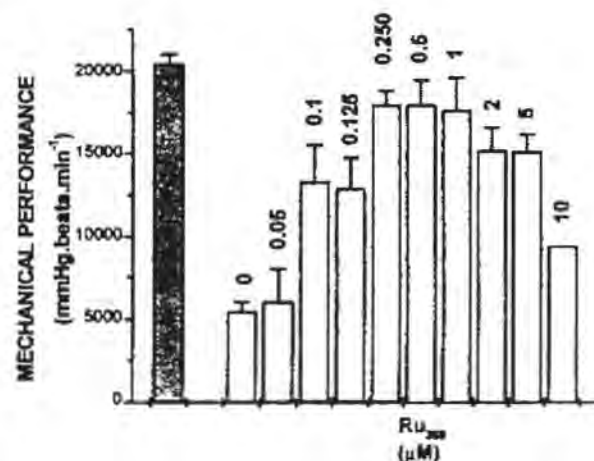


Fig. 1. The oxygen-bridged dinuclear ruthenium amine complex (Ru_{360}) improves mechanical performances in postischemic hearts in a dose-dependent manner. Recovery of mechanical performance in ischemia-reperfusion (I/R) hearts was evaluated at different concentrations of Ru_{360} . The inhibitor was perfused for 30 min before ischemia. The bars represent the mean \pm SE of at least three hearts. The shaded bar represents the mechanical performance of control hearts after 60 min of continuous flow.

Table 1. Effect of different concentrations of the oxygen-bridged dinuclear ruthenium amine complex (Ru₃₆₀) on the contractile force development of control hearts. Contractile force development was evaluated at different time-points. Values are the mean of at least three different experiments ± SE.

Ru ₃₆₀ concentration (μM)	Contractile force development (mmHg)		
	10 min	20 min	30 min
0	93 ± 5	92 ± 7	93 ± 6
0.1	93 ± 15	93 ± 10	97 ± 18
0.25	96 ± 5	96 ± 7	97 ± 6
1.5	97 ± 13	94 ± 12	93 ± 14
5	94 ± 6	87 ± 16	83 ± 11
15	90 ± 14	79 ± 14*	76 ± 9*
25	68 ± 15*	74 ± 11*	68 ± 12*

* $P \leq 0.05$ significantly different vs. control between each time point.

To discard this possibility, we measured contractile force development in control hearts exposed to different Ru₃₆₀ concentrations. Ru₃₆₀ concentrations of < 5 μM were found to have no effect on the contractile force. Higher concentrations depressed the contractile force development and elevated the resting tension (15–25 μM). This effect was dependent on the length of the perfusion period (Table 1).

We decided to use the minimum concentration that exerted maximal mechanical recovery in reperfused hearts (250 nM) and at which no effect on contractile function was observed.

Time-dependent experiments were performed to evaluate the effect of Ru₃₆₀ perfusion at such a concentration. At early reperfusion times, the mechanical performance of postischemic hearts (I/R) and of reperfused hearts treated with Ru₃₆₀ (I/R + Ru₃₆₀) was nearly 50% of that observed in control hearts (Fig. 2A). In remarkable contrast to reperfused hearts, I/R + Ru₃₆₀ hearts gradually increased their mechanical performance, reaching 85% of the values observed in control hearts.

Contractile function and oxygen consumption ratio were used to evaluate the recovery of I/R + Ru₃₆₀ hearts. The index of oxidative metabolism efficiency, in terms of contractile performance, was obtained according to Benzi & Lerch [11]. The ratio between mechanical performance and oxygen consumption was measured in individual hearts at the indicated time-points (Fig. 2B). Before the ischemia, the index was slightly, but not statistically, higher in I/R + Ru₃₆₀ hearts compared to control or I/R hearts. This could reflect a decreased respiration rate in Ru₃₆₀-treated hearts. A 100% recovery in I/R + Ru₃₆₀-treated hearts was obtained after 20 min of reperfusion.

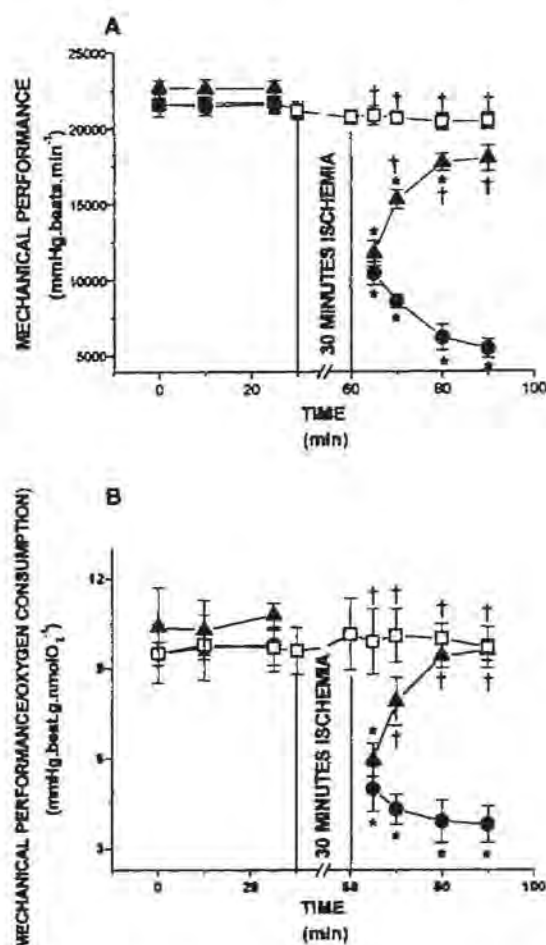


Fig. 2. Effect of the oxygen-bridged dinuclear ruthenium amine complex (Ru₃₆₀) on postischemic heart functions. (A) Temporal course analysis of the Ru₃₆₀ effect on the mechanical heart performance (MP = heart rate × ventricular pressure). (□) Values from control hearts not subjected to ischemia; (●) values from hearts reperfused for 30 min, after 30 min of ischemia-reperfusion (I/R) and (▲) values from hearts perfused with 250 nM Ru₃₆₀ for 30 min and then subjected to I/R (I/R + Ru₃₆₀). (B) MP/oxygen consumption in control, I/R and I/R + Ru₃₆₀ hearts. Symbols represent the same conditions as above. Values are the mean ± SE of at least 22 different experiments. * $P \leq 0.05$ significantly different vs. control and † $P \leq 0.05$ vs. I/R.

Ru₃₆₀ maintains mitochondrial integrity in postischemic reperfused hearts

Respiratory activities of mitochondria isolated from control, I/R and I/R + Ru₃₆₀ hearts were measured in the presence of succinate, as substrate, under conditions of low-calcium buffer (only contaminant calcium in the medium) and also in a medium supplemented with 50 μM calcium (Table 2). In the presence of trace concentrations of calcium, mitochondria from I/R

Table 2. Respiratory activity in mitochondria isolated from control rat hearts, from ischemia-reperfusion (I/R) rat hearts and from rat hearts perfused with 250 nM Ru_{360} for 30 min and then subjected to I/R (I/R+ Ru_{360}). Mitochondrial respiratory activity was determined in the presence of low-calcium buffer and in a medium supplemented with 50 μM calcium. Data are expressed as rates of respiration (natoms of $\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein), and values represent the mean \pm SE of results from at least five different experiments. RC, respiratory control.

	Low-calcium buffer			Supplemented with 50 μM calcium		
	State 3	State 4	RC	State 3	State 4	RC
Control	373 \pm 21 ^b	65 \pm 9 ^b	5.9 \pm 0.85 ^b	427 \pm 32 ^b	84 \pm 8	5 \pm 0.6 ^b
I/R	224 \pm 12 ^a	54 \pm 5	4.1 \pm 0.46 ^a	151 \pm 14 ^a	61 \pm 9	1.8 \pm 0.8 ^a
I/R+ Ru_{360}	362 \pm 16 ^b	60 \pm 9 ^b	6 \pm 0.89 ^b	387 \pm 18 ^{a,b}	71 \pm 4 ^a	5.4 \pm 0.42 ^b

^a $P \leq 0.05$ significantly different vs. control; ^b $P \leq 0.05$ vs. I/R.

hearts exhibited a 40% reduction in the state 3 respiration rate, compared with the control values, while I/R + Ru_{360} mitochondria did not show any statistically significant difference from control mitochondria. State 4 rates and respiratory control (RC) decreased slightly in I/R mitochondria, in agreement with earlier reports [18,19]. Calcium addition promoted extra damage to isolated mitochondria. Under such conditions, control and I/R + Ru_{360} mitochondria were able to maintain oxidative phosphorylation, with RC values of 5 \pm 0.6 and 5.4 \pm 0.4, respectively, in remarkable contrast with the I/R mitochondria, in which the ability to synthesize ATP was clearly compromised (RC = 1.8 \pm 0.8); this value represents $\approx 35\%$ of the corresponding values observed in control and I/R + Ru_{360} mitochondria.

Ru_{360} inhibits the mPTP in reperfed hearts

A mechanism frequently proposed to explain irreversible cardiac injury in I/R implicates mitochondrial calcium overload, which is responsible for a nonspecific increase in the mitochondrial inner membrane permeability. A high $\Delta\psi$ value promotes calcium uptake into the mitochondrial matrix through the calcium uniporter. Under these conditions, mitochondria are able to accumulate and buffer large amounts of calcium, before the $[\text{Ca}^{2+}]_m$ reaches the level required to open nonspecific pores and release calcium and other solutes into the cytoplasm. In this regard, it was important to demonstrate that pretreatment with Ru_{360} prevented the opening of such a mega-channel in I/R mitochondria. The opening of the nonselective pore was determined by measuring the transmembrane electric gradient (Fig. 3, top panel). The $\Delta\psi$ was maintained both in control and in I/R + Ru_{360} mitochondria after the addition of 50 μM calcium: the transitory de-energization indicates calcium movement into the mitochondrial matrix (Traces A and C). On the other hand, the same calcium concentration induced an irreversible

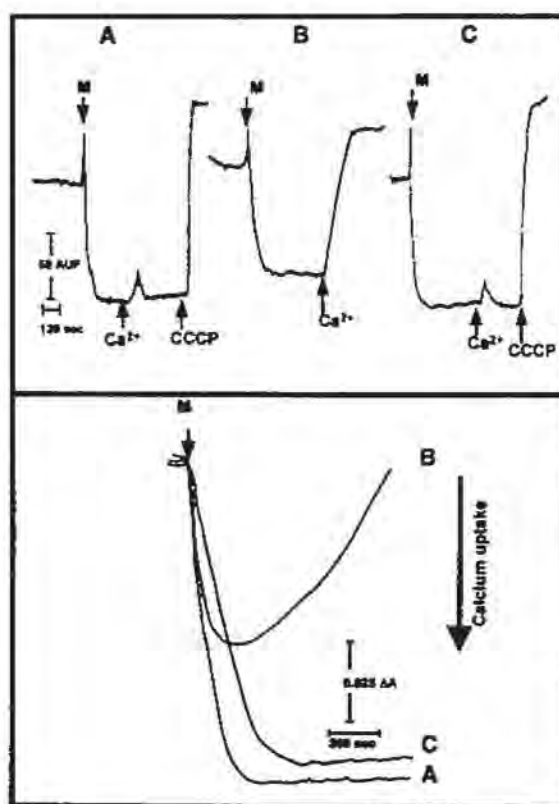


Fig. 3. Effect of oxygen-bridged dinuclear ruthenium amine complex (Ru_{360}) perfusion on the mitochondrial permeability transition pore in ischemia-reperfusion (I/R) hearts. The top panel shows the transmembrane electric potential of mitochondria obtained from control hearts (Trace A), from I/R hearts (Trace B) and from hearts perfused with 250 nM Ru_{360} for 30 min and then subjected to I/R (I/R+ Ru_{360}) (Trace C). Two milligrams of mitochondrial protein (M), 50 μM calcium or 0.2 μM carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone were added, as indicated. The bottom panel shows the calcium transport in isolated mitochondria obtained from control hearts (Trace A), I/R hearts (Trace B) and I/R+ Ru_{360} hearts (Trace C). Conditions are as described in the Experimental procedures. The results shown are representative of at least three different experiments.

decrease in the membrane potential of L/R mitochondria (Trace B), similar to that observed after the addition of $0.5 \mu\text{M}$ carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone to control and L/R + Ru_{360} mitochondria.

mPTP is characterized by the nonspecific efflux of calcium and other metabolites from the mitochondrial matrix. Calcium uptake and release were also measured in isolated mitochondria, with the aim to assess the protective effect of Ru_{360} . Calcium was accumulated by control mitochondria (Fig. 3, bottom panel, Trace A). In contrast, mitochondria isolated from L/R hearts were unable to retain calcium, as a consequence of the mPTP opening (Trace B), a condition that was fully prevented by the addition of CsA (data not shown). No calcium efflux was observed in L/R + Ru_{360} mitochondria (Trace C), indicating that the pore remained closed. Remarkably, the initial calcium influx rate was reduced by 30% in L/R + Ru_{360} as compared to control mitochondria, suggesting a reduction in activity of the mCaU.

Perfusion of isolated hearts with Ru_{360} inhibits mitochondrial calcium uptake

To confirm an interaction between Ru_{360} and mCaU, we measured calcium uptake in isolated mitochondria from control hearts perfused with increasing concentrations of Ru_{360} . Initial uptake rates were evaluated in energized mitochondria under the conditions described. A dose-dependent inhibitory response was observed, achieving a maximum effect in mitochondria isolated from hearts perfused with $15 \mu\text{M}$ Ru_{360} (i.e. 87%), while in mitochondria isolated from hearts perfused with 250 nM Ru_{360} , calcium uptake was inhibited by 32% (Fig. 4).

$[\text{Ca}^{2+}]_m$ overload is a determinant of the irreversible injury in posts ischemic hearts

A first experimental approach to estimate $[\text{Ca}^{2+}]_m$ in isolated hearts was to measure the activated pyruvate dehydrogenase (PDH) activity in heart homogenates at the end of the perfusion protocols. PDH is activated by a calcium-dependent phosphatase. A threefold increase in PDH activity, after enzymatic dephosphorylation, was obtained in L/R hearts compared to control hearts (29.6 ± 2 vs. $11 \pm 2.4 \text{ nmol NADH min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ of protein; $P \leq 0.001$, $n = 5$). No significant differences were found in PDH activity between L/R + Ru_{360} (11.6 ± 2.2 , $n = 6$) and control hearts.

To reinforce the above data, $[\text{Ca}^{2+}]_m$ was measured in isolated mitochondria, as described by McComarck & Denton [1]. A temporal course analysis of $[\text{Ca}^{2+}]_m$ was obtained from independent experiments using L/R

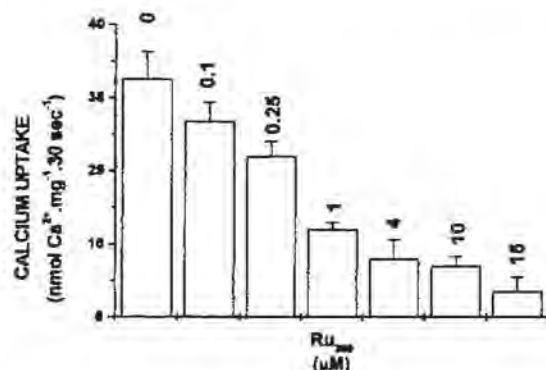


Fig. 4. Perfusion of the oxygen-bridged dinuclear ruthenium amine complex (Ru_{360}) into isolated hearts inhibits the mitochondrial calcium uptake. Initial calcium influx rate of mitochondria obtained from control hearts perfused with different concentrations of Ru_{360} was estimated by $^{45}\text{Ca}^{2+}$, as described in the Experimental procedures. The hearts were perfused for 30 min with Krebs-Henseleit (KH) buffer supplemented with Ru_{360} , and then washed for 30 min with KH and no inhibitor. Data are the mean \pm SE of at least three different experiments.

and L/R + Ru_{360} hearts (Fig. 5). Before ischemia, the $[\text{Ca}^{2+}]_m$ content in control hearts was $229 \pm 9 \text{ nM}$. This value increased progressively during reperfusion, reaching $354 \pm 14 \text{ nM}$ at 30 min of reperfusion. In contrast, hearts treated with Ru_{360} maintained a low level of free calcium, comparable to that observed before ischemia ($188 \pm 14 \text{ nM}$), which is a predictable result assuming a

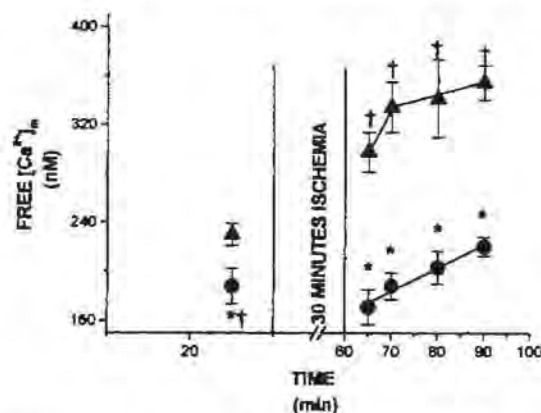


Fig. 5. The oxygen-bridged dinuclear ruthenium amine complex (Ru_{360}) prevents overload of the mitochondrial matrix free-calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) in posts ischemic heart. The $[\text{Ca}^{2+}]_m$ was measured in mitochondria isolated from perfused hearts at the indicated time-points. (●) Values from mitochondria obtained from untreated hearts; (▲) values from mitochondria obtained from hearts treated with Ru_{360} . Each value was obtained from a single heart and the data represent the mean \pm SE of at least three different hearts. * $P \leq 0.05$ significantly different vs. untreated hearts. † $P \leq 0.05$ vs. basal values (before ischemia) in untreated hearts.

partial inhibition of the mCaU. After 30 min of reperfusion, the [Ca²⁺]_m showed a slight increase, but did not exceed the basal levels of free calcium measured, before ischemia, in mitochondria from untreated hearts. The increase in [Ca²⁺]_m levels was compared with the total calcium content in mitochondria. The total calcium in control mitochondria was 0.68 ± 0.15 nmol·mg⁻¹ of protein and increased significantly (2.16 ± 0.75 nmol·mg⁻¹; *P* < 0.05 *n* = 4) after 30 min of reperfusion, whereas total calcium in L/R + Ru₃₆₀ mitochondria did not change significantly (0.78 ± 0.24 nmol·mg⁻¹; *n* = 4) after 30 min of reperfusion.

¹⁰³Ru₃₆₀ binding to isolated heart subcellular fractions

We measured the association of the inhibitor to subcellular fractions related to calcium movements in the cell. Surprisingly, the microsomal fraction, enriched with SR and sarcolemma, binds twice as much ¹⁰³Ru₃₆₀ compared to the enriched mitochondrial fraction (2.3 ± 0.6 pmol of ¹⁰³Ru₃₆₀·mg⁻¹ of protein vs. 1.2 ± 0.15 pmol ¹⁰³Ru₃₆₀·mg⁻¹ of protein; *n* = 4). The purity of these fractions was determined by measuring the activities of D-glucose phosphate phosphohydrolase and 5'-ribonucleotide phosphohydrolase for the microsomal fraction and of cytochrome *c* oxidase for mitochondria.

We found 8% D-glucose phosphate phosphohydrolase total activity in the mitochondrial fraction and no contaminant activity of cytochrome *c* oxidase in the microsomal fraction. In addition, in the microsomal fraction, 329.3 nmol·mg⁻¹·min⁻¹ of 5'-ribonucleotide phosphohydrolase activity was found vs. 20.4 nmol·mg⁻¹·min⁻¹ in the mitochondrial fraction, indicating sarcolemmal contamination in the microsomal fraction.

The discrepancy between our binding results and other reports showing that Ru₃₆₀ has no effect either in SR calcium movements or on sarcolemmal Na⁺/Ca²⁺ exchanger or L-type calcium channels [15], led us to investigate the nature of the inhibitor association with the microsomal fraction.

Ru₃₆₀ effect on ryanodine receptor activity

Our first approach was to re-evaluate the effect of Ru₃₆₀ on some calcium transporters in sarcoplasmic reticulum vesicles (SRV). As RR is one of the most potent inhibitors of the calcium release channel in SR (RyR) [13], we measured the efficiency of Ru₃₆₀ to block the RyR, estimating ATP-dependent calcium uptake, and also directly measuring the RyR activity in SRV. In Fig. 6A, the effect of 10 μM RR and 10 μM Ru₃₆₀ on ATP-dependent calcium uptake in SRV is

compared. To ensure maximal uptake, we used 300 μM ryanodine (Ryan) to block the release channel.

ATP addition alone promoted calcium uptake into SRV that accounted for 50% of the maximal uptake (14.3 ± 3 vs. 28.6 ± 6 nmol of Ca²⁺ per mg of protein per 5 min). RR induced 14% increase over control uptake (18.3 ± 4 nmol of Ca²⁺ per mg of protein per 5 min), while Ru₃₆₀-treated vesicles showed no difference in calcium uptake compared to control SRV. In the same figure (Fig. 6B), the temporal courses of SRV calcium release in the presence of Ru₃₆₀, Ryan and RR are compared. As expected, Ryan and RR partially inhibited SRV calcium release at the indicated concentrations, while Ru₃₆₀ had no effect.

Effect of RR and Ru₃₆₀ on ryanodine binding to RyR

By using a high affinity [³H]Ryan-binding assay (which is considered an indicator of the open state of RyR), we obtained additional evidence to support the contention that Ru₃₆₀ does not affect RyR. In this regard, Ryan binding was not significant at 100 nM free calcium, but was maximally stimulated by 100 μM free calcium. Therefore, we assessed the effect of RR and Ru₃₆₀ on high affinity [³H]Ryan binding at 100 μM free calcium. While 10 μM RR inhibited Ryan binding by 86%, in agreement with a previous report [20], the effect of 10 μM Ru₃₆₀ on high affinity [³H]Ryan binding was minimal as it was only decreased by 7% (Fig. 6C).

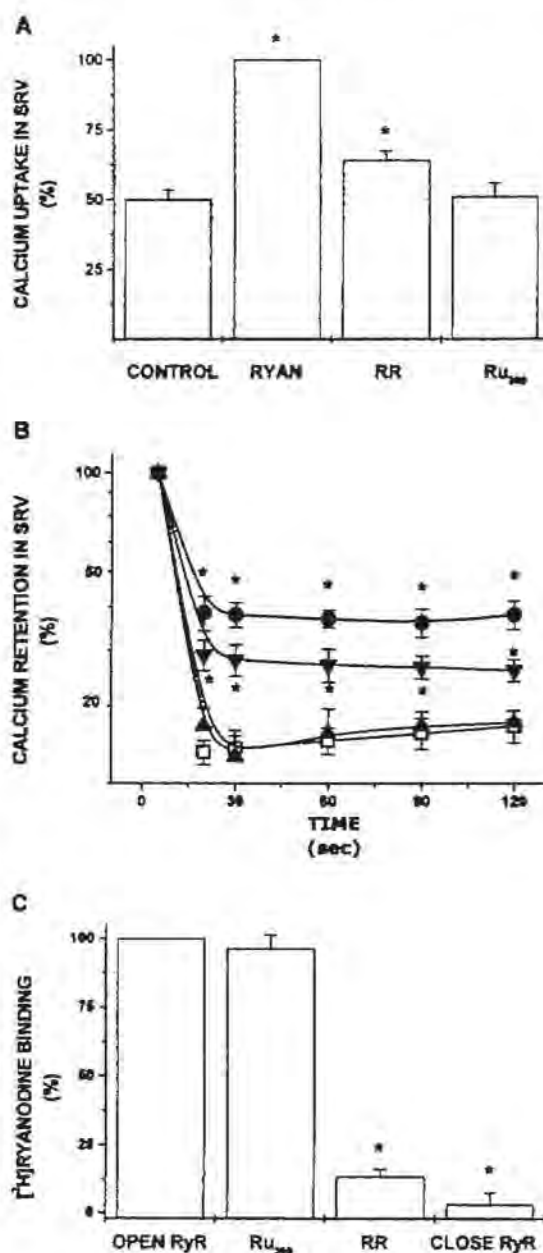
Discussion

Postischemic reperfusion results in irreversible injury, indicated by marked contracture, diminution of left ventricular pressure, augmented vascular resistance, incidence of ventricular fibrillation and important uncoupling between mechanical performance and oxygen consumption [11,21,22]. In this context, several approaches have shown effectiveness in protecting against the reperfusion injury. RR, a classical inhibitor of mitochondrial calcium uptake, has been used to reduce the L/R injury in the heart. Indeed, perfusion with RR produced different effects in heart function that depended on time and dose, probably because of its interaction with multiple sites in the myocardium, mainly on the RyR. In this regard, it has been shown that high concentrations of RR perfused to rat hearts produce a persistent contracture of the ventricular muscle [17]. Perfusion with Ru₃₆₀ at concentrations from 0.1 nM to 5 μM did not have any effect on the contractile force development, suggesting a weak control on calcium cytoplasmic fluxes.

Fig. 6. The oxygen-bridged dinuclear ruthenium amine complex (Ru₃₆₀) does not inhibit calcium movements in sarcoplasmic reticulum. (A) Calcium uptake in sarcoplasmic reticulum vesicles (SRV) was determined by filtration, as described in the Experimental procedures. Maximum transport values (100% ⁴⁵Ca²⁺ accumulation) corresponded to 29 ± 3.5 nmol ⁴⁵Ca²⁺ per mg of protein per 5 min. (B) Calcium release was measured in ⁴⁵Ca²⁺ preloaded vesicles incubated in the presence of 300 μM ryanodine (●), 10 μM Ru₃₆₀ (▲), 10 μM ruthenium red (RR) (▼), and without inhibitor (□) for 2 h (final volume 50 μL). Maximum values for each treatment were normalized in each group. (C) Specific [³H]ryanodine binding was determined in a medium containing 100 μM free Ca²⁺ to maintain the calcium release channel in sarcoplasmic reticulum (RyR) open and in medium containing 100 nM free Ca²⁺ to close the RyR. RR and Ru₃₆₀ (10 μM) were tested in the open condition. Maximal [³H]ryanodine binding was obtained by incubating SRV with 100 μM free calcium (395 fmol [³H]ryanodine·mg⁻¹ of SRV). All values represent the mean ± SE of at least four separate experiments. *P < 0.05 significantly different vs. control.

Substantial evidence suggests that calcium accumulation in mitochondria may play a key role as a trigger of mitochondrial malfunction, especially when it is accompanied by another source of stress, particularly oxidative stress. During reperfusion not only calcium, but also oxygen radical production, increases, contributing to a decrease in the maximum rate of electron transport [18,19]. The results reported in Table 2 demonstrate that mitochondria from L/R hearts exhibit lower rates of state 3 respiration, as compared with mitochondria from control and L/R + Ru₃₆₀ hearts. Moreover, mitochondrial state 4 respiratory rates and RC changed during reperfusion, indicating alterations in mitochondrial integrity. Reperfusion sensitized mitochondria to the opening of the mPTP, in remarkable contrast to mitochondria from control and L/R + Ru₃₆₀ hearts (Fig. 4). In L/R mitochondria, calcium addition diminished the Δψ. The fact that Ru₃₆₀ inhibited such an effect reinforces the proposal that mPTP opening is triggered by mitochondrial calcium overload while bringing about myocardial and mitochondrial injury [4,6,23]. Our data are also consistent with early reports showing that, *in vitro*, calcium uncouples oxidative phosphorylation and abolishes the membrane potential in sensitized mitochondria obtained from ischemic hearts [24].

In L/R injury there are other mechanisms that have been suggested to account for the loss of mitochondrial respiratory activity during postischemic reperfusion. For example, a diminished state 3 respiration in mitochondria isolated from rat hearts subjected to ischemia and reperfusion has been related to a decrease in cytochrome *c* oxidase activity owing, at least in part, to a loss of cardiolipin content [18].



Another plausible mechanism, which indeed could be a consequence of calcium-triggered mPTP opening, is cytochrome *c* release from mitochondria by disruption of the outer mitochondrial membrane, resulting from mitochondrial swelling [25]. Recent reports also indicate that mitochondria, undergoing mPTP, release other molecules (i.e. Smac/DIABLO, AIF) located in the intermembrane space, which participate in the apoptotic death signaling [26,27].

An important limitation in assessing the relevance of mPTP in L/R injury in the intact heart is the

contradictory finding that CsA, the most potent inhibitor of mPTP opening in isolated mitochondria, is unable to prevent the entry into mitochondria of 2-deoxy[³H]glucose during reperfusion. 2-Deoxy[³H]glucose readily enters the cytoplasm, but can only access the mitochondrial matrix when the pore opens [28]. Other reports also indicate that CsA confers only limited protection against reperfusion injury and even promotes injury at high concentrations (i.e. 1 μ M) [6]. Furthermore, CsA is not completely specific: it inhibits calcineurin, which also plays an important role in modulating cellular death signals [29]. Therefore, many research groups have attempted to identify more specific inhibitors of the mPTP. In this respect, CsA analogues such as N-Me-Val-4-cyclosporin [30], as well as the immunosuppressant, Sanglifehrin A, have been reported to antagonize the opening of the mPTP, without inhibiting calcineurin [31]. Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and protects from reperfusion injury by its binding to cyclophilin-D at a site different from that at which CsA binds. However, it is clear that neither Sanglifehrin A nor CsA inhibit mPTP opening when mitochondria are exposed to a sufficiently strong stimulus [6,31,32]. During reperfusion, a scenario of elevated matrix calcium in the presence of oxidative stress and adenine nucleotide depletion could represent such a strong stimulus.

It has been suggested that ischemic preconditioning of the isolated heart, in terms of protection, could be related to an indirect inhibition of the mPTP by diminishing calcium overload [33]. Our results support such a proposal, by the direct demonstration that the mCaU is partially inhibited by Ru₃₆₀ perfusion.

Free matrix calcium in L/R + Ru₃₆₀ mitochondria after 30 min of reperfusion was comparable to the [Ca²⁺]_m in control mitochondria. Interestingly, mitochondria pretreated with Ru₃₆₀ before the ischemia, showed a diminished [Ca²⁺]_m compared to untreated mitochondria, thus confirming the precise targeting of Ru₃₆₀ to the mitochondrial uniporter, even in the absence of high [Ca²⁺]_e.

We also confirmed early reports that Ru₃₆₀ interacts specifically with mitochondria, as it was unable to inhibit calcium uptake and release in SRV. Indeed, we found a surprisingly high binding to the microsomal fraction isolated from ¹⁰³Ru₃₆₀-treated hearts. We hypothesize that Ru₃₆₀ could be nonspecifically bound to the cellular membrane. In this respect, Matlib and co-workers measured ¹⁰³Ru₃₆₀ uptake into isolated myocytes, finding a biphasic accumulation that was dependent on time [15]. The fast phase was associated with cell surface binding, while the slow phase was assumed to be an intracellular accumulation. The well

known affinity of some ruthenium amine compounds to proteoglycans, abundant components of plasmatic membranes, could account for the observed high level of Ru₃₆₀ binding to the microsomal fraction. Furthermore, observations from our laboratory indicate that both RR and Ru₃₆₀ exert their inhibitory effect by interaction with glycosidic residues at the mCaU [34].

The intriguing finding, that Ru₃₆₀ protected against reperfusion damage, partially blocking calcium overload in mitochondria, can be supported by a conclusion based on a differential susceptibility of the mCaU population to the inhibitor. The existence of two functional and biochemical populations of cardiac mitochondria may explain this observation. It has been reported that subsarcolemmal mitochondria (SLM) are located beneath the plasmatic membrane and that interfibrillar mitochondria (IFM) are present between the myofibrils [35]. These two populations are affected differently in ischemic cardiomyopathy. The increased damage may occur secondary either to their location in the myocyte or as a result of an inherent susceptibility to damage. In SLM, the ischemic damage is more rapid and severe than in IFM. Cytochrome *c* content and cytochrome *c* oxidase activity are reduced in SLM after ischemia [36] and the rate of oxidative phosphorylation is diminished [37]. Furthermore, SLM have a decreased capacity for calcium accumulation compared with IFM [38]. These data led us to speculate that although any uniporter molecule could be a potential target for Ru₃₆₀, the inhibitor would be concentrated in the readily accessible SLM uniporter population. The mitochondrial population, with higher susceptibility to be damaged, would be protected and the IFM would be able to maintain the cellular function by means of an increased calcium uptake capacity. Supporting this hypothetical scenario, there is a proposed mechanism of permeability transition propagation, where local liberation of calcium from mitochondria triggers propagating waves of Ca²⁺-induced calcium release in the entire mitochondrial network [39].

In a recent review of cardiac energy metabolism, the importance of [Ca²⁺]_e regulation by the mCaU is pointed out [2]. High [Ca²⁺]_e microdomains at close contact regions between mitochondria and the RyR have been experimentally demonstrated. These calcium 'hot spots' could be sensed by the calcium uniporter, activating the low affinity uptake. Additionally, a novel mitochondrial channel, which transports calcium with very high affinity, has been suggested to be the mCaU [40].

A powerful tool for obtaining insight into the role of this transporter in metabolic homeostasis would be

a specific knockout of the putative transport protein. Indeed, the more realistic approximation at present is the use of specific inhibitors of the mCaU. In this respect, we demonstrated that the novel inhibitor, Ru₃₆₀, improves the functional recovery of hearts reperfused after ischemia, regulating the activity of the mCaU.

Experimental procedures

Animals

This investigation was performed in accordance with The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by the United States National Institutes of Health (US-NIH). Male Wistar rats between 250 and 300 g were used in all experiments.

Synthesis of Ru₃₆₀ and ¹⁰³Ru₃₆₀

Ru₃₆₀ (μ -oxo)bis(*trans*-formatotetramine ruthenium), is a coordination complex containing two ruthenium atoms surrounded by amine groups and linked by an oxygen-bridge, that forms a binuclear and nearly linear structure. To synthesize the complex, we followed the procedure described by Ying *et al.* [14]. The purified preparation was slightly yellowish and exhibited a single λ_{max} at 360 nm. The radiolabeled complex (¹⁰³Ru₃₆₀) was synthesized by a microscale protocol, using 1 mCi ¹⁰³RuCl₃, as previously reported [16].

Isolated heart perfusion

The hearts were mounted according to the Langendorff model, as described previously [41], at a constant flow rate of 12 mL·min⁻¹. Perfusion was started with Krebs-Henseleit (KH) buffer, supplemented with 2.5 mM CaCl₂, 8.6 mM glucose and 0.02 mM sodium octanoate as metabolic substrates. Mechanical function was measured at a left ventricular end-diastolic pressure of 10 mmHg, using a latex balloon inserted into the left ventricle and connected to a pressure transducer. Two silver electrodes were attached, one to the apex and the other to the right atria, for electrocardiogram monitoring (Instrumentation and Technical Development Dept, INC, México D.F., Mexico). The pulmonary artery was also cannulated and connected to a closed chamber (Gilson, Lewis Center, OH, USA) to measure the oxygen concentration in the coronary effluent by means of a Clark-type electrode (YSI, Yellow Springs, OH, USA). The rate of oxygen consumption was calculated as the difference between the oxygen concentration in the perfusion medium before and after passing through the organ. All variables were recorded by using a computer acquisition data system designed by the Instrumentation and Technical

Development Department (Instituto Nacional de Cardiología 'Ignacio Chavez', México D.F., Mexico).

Protocols

All hearts were equilibrated for 15 min with KH buffer. Subsequently, three different protocols were followed. The control hearts ($n = 22$) were maintained under constant perfusion for 90 min. The L/R hearts ($n = 23$) were perfused for 30 min, then subjected to 30 min of no-flow ischemia and finally to 30 min of reperfusion. In the third group, hearts were perfused with 250 nM Ru₃₆₀ for 30 min before the ischemia period and then reperfused for an additional 30 min (L/R + Ru₃₆₀) ($n = 25$).

Mitochondrial integrity measurements

At the end of the protocols the hearts were minced into small pieces, digested for 10 min using 1.5 mg·mL⁻¹ Nagarse in ice-cold isolation medium (250 mM sucrose, 10 mM Hepes, 1 mM EDTA; pH 7.3), centrifuged at 11 000 g for 10 min and then washed in the same buffer without the protease (Nagarse, ICN, Aurora, OH, USA). Tissue was homogenized in isolation medium and the mitochondrial fraction was obtained by differential centrifugation, as previously described [9]. Mitochondrial oxygen consumption was measured by using a Clark-type oxygen electrode. The experiments were carried out at 25 °C in 1.5 mL of respiration medium containing 125 mM KCl, 10 mM Hepes and 3 mM KH₂PO₄/Tris, pH 7.3. Incubations were started by adding 1.5 mg of mitochondrial protein. State 4 respiration was evaluated with 10 mM succinate plus 1 μ g·mL⁻¹ rotenone. State 3 respiration was stimulated by the addition of 200 μ M ADP. RC was calculated as the ratio between state 3 and state 4 rates. The membrane potential was measured fluorometrically by using 5 μ M safranin [42].

Mitochondrial calcium uptake

Calcium uptake was measured by using the metallochromic indicator, Arsenazo III, according to Chavez *et al.* [9]. The assay medium contained 125 mM KCl, 10 mM Hepes, 10 mM succinate, 200 μ M ADP, 3 mM P_i, 1 mM EGTA, 2 μ g·mL⁻¹ rotenone and 50 μ M free calcium, as calculated by using the Chelator program (Th. Schoenmakers, Nijmegen, the Netherlands), pH 7.3. Quantification of calcium uptake was carried out by a filtration technique using ⁴⁵CaCl₂ [specific activity 1000 counts per minute (c.p.m.)·nmol⁻¹] in the same medium.

Calcium content in mitochondria

Frozen cardiac tissue from each group was used to determine the activity of pyruvate dehydrogenase as an indicator

of mitochondrial calcium concentration, according to Pepe *et al.* [23]. In addition, free and total mitochondrial calcium were measured using mitochondria isolated by a method designed to minimize Ca²⁺ redistribution [1]. Free calcium ([Ca²⁺]_m) was measured by using the fluorescent indicator, Fluo-3/AM [43], assuming a dissociation constant, $K_D = 400$ nM, for Fluo-3 [44]. Total mitochondrial calcium was estimated by atomic absorption spectrophotometric analysis using CaCO₃ as standard [23].

¹⁰³Ru₃₆₀ binding to isolated heart subcellular fractions

Control hearts were used to evaluate the inhibitor binding to subcellular fractions. Hearts were perfused with 250 nM ¹⁰³Ru₃₆₀ for 30 min and then washed with a KH solution containing 250 nM unlabeled Ru₃₆₀ for an additional 30 min, to eliminate nonspecific inhibitor binding. Cardiac tissue was homogenized in isolation medium and the mitochondria and microsomal fraction were obtained by differential centrifugation [9,45]. Mitochondria purity was evaluated by measuring cytochrome oxidase activity (EC 1.9.3.1), as described by Ferguson-Miller [46], while microsomal fraction purity was estimated by evaluating D-glucose-6-phosphate phosphohydrolase activity (EC 3.1.3.9), according to Colilla *et al.* [47]. The sarcolemmal membrane content in the microsomal fraction was determined by measuring the activity of 5'-ribonucleotide phosphohydrolase (EC 3.1.3.5), according to a method described by Glastris & Pfeiffer [48].

Calcium transport in SRV

A microsomal fraction enriched with SRV was obtained following the method of Tate *et al.* [45] and evaluated for ATP-dependent calcium uptake. The samples were incubated for 60 min in a buffer containing 0.1 mM KCl, 20 mM Tris/malate, 1 mM EGTA, pH 6.8, plus 50 μM free ⁴⁵Ca²⁺, with or without 300 μM ryanodine (Ryan), and 10 μM Ru₃₆₀ or 10 μM RR. Calcium uptake was initiated at 25 °C by the addition of 10 volumes of a solution containing 0.25 M KCl, 20 mM Hepes, pH 7.4, supplemented with 5 mM Mg-ATP, 10 mM sodium oxalate, 5 mM sodium azide, 1 mM EGTA and 20 μM free calcium.

Calcium efflux in SRV was estimated as retained ⁴⁵Ca²⁺, using the technique described by Meissner & Henderson [49]. Briefly, SRV were passively loaded with 5 mM ⁴⁵Ca²⁺ (0.1 mCi·mL⁻¹) for 2 h at 22 °C. SRV were diluted 150-fold in an iso-osmolar medium containing 0.1 M KCl, 10 mM Tris-malate, 1 mM EGTA and 50 μM free calcium, pH 6.8. Retained ⁴⁵Ca²⁺ was determined by filtration at different time-points. Maximal loading for each condition was obtained by diluting the vesicles into a solution containing high calcium (i.e. 0.1 M KCl, 10 mM Tris/malate and 5 mM CaCl₂, pH 6.8).

[³H]Ryanodine binding assays

High affinity [³H]Ryanodine binding was determined by using 50 μg of SRV protein and 6 nM of [³H]Ryanodine (57 Ci mmol⁻¹; NEN, Boston, MA, USA). SRV were incubated for 2 h at 25 °C in 100 μL of a standard incubation medium, containing 0.6 M KCl, 20 mM Hepes-K, 1 mM EGTA, pH 6.8. Sufficient CaCl₂ was added to this solution to have either 100 nM or 100 μM free calcium concentrations, to either close or fully open RyR, respectively. To test the effect of RR and Ru₃₆₀ on ryanodine receptors, both compounds were added at a final concentration of 10 μM and incubated for the indicated time. Then, aliquots were filtered through glass-fiber filters (Whatman GF/C, Clifton, NJ, USA), treated with 0.3% (v/v) polyethylenimine and washed twice with cold washing buffer (10 mM Hepes, 100 mM KCl, pH 7.4). Radioactivity retained in the filters was measured in a scintillation counter and nonspecific binding was determined with 20 μM ryanodine.

Statistics

The results are expressed as mean ± SE. Significance ($P \leq 0.05$) was determined for discrete variables by analysis of variance (ANOVA), using the PRISM™ (GraphPad, San Diego, CA, USA) program.

References

- McCormack JG & Denton RM (1984) Role of Ca²⁺ ions in the regulation of intramitochondrial metabolism in rat heart. Evidence from studies with isolated mitochondria that adrenaline activates the pyruvate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase complexes by increasing the intramitochondrial concentration of Ca²⁺. *Biochem J* **218**, 235–247.
- Balaban RS (2002) Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium. *J Mol Cell Cardiol* **34**, 1259–1271.
- Miyata H, Lakatta EG, Stern MD & Silverman HS (1992) Relation of mitochondrial and cytosolic free calcium to cardiac myocyte recovery after exposure to anoxia. *Circ Res* **71**, 605–613.
- Di Lisa F & Bernardi P (1998) Mitochondrial functions as a determinant of recovery on death in cell response to injury. *Mol Cell Biochem* **184**, 379–391.
- Gunter TE, Yule DI, Gunter KK, Eliseev RA & Salter JD (2004) Calcium and mitochondria. *FEBS Lett* **567**, 96–102.
- Griffiths EJ & Halestrap AP (1993) Protection by cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* **25**, 1461–1469.
- Crompton M, Costi A & Hayat L (1987) Evidence for the presence of a reversible Ca²⁺-dependent pore activa-

- ted by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem J* **245**, 915–918.
- 8 Korge P, Goldhaber JJ & Weiss JN (2001) Phenylarsine oxide induces mitochondrial permeability transition, hypercontracture, and cardiac cell death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H2203–H2213.
 - 9 Chavez E, Moreno-Sanchez R, Zazueta C, Rodriguez JS, Bravo C & Reyes-Vivas H (1997) On the protection by inorganic phosphate of calcium-induced membrane permeability transition. *J Bioenerg Biomembr* **29**, 571–577.
 - 10 Ferrari R, Di Lisa F, Raddino R & Visioli O (1982) The effects of ruthenium red on mitochondrial function during post-ischaemic reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* **14**, 737–740.
 - 11 Benzi RH & Lerch R (1992) Dissociation between contractile function and oxidative metabolism in post-ischemic myocardium. Attenuation by ruthenium red administered during reperfusion. *Circ Res* **71**, 567–576.
 - 12 Yamada A, Sato O, Watanabe M, Walsh MP, Ogawa Y & Imaizumi Y (2000) Inhibition of smooth-muscle myosin-light-chain phosphatase by Ruthenium Red. *Biochem J* **349**, 797–804.
 - 13 Zucchi R & Ronca-Testoni S (1997) The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and diesterases. *Pharmacol Rev* **49**, 1–51.
 - 14 Ying WL, Emerson J, Clarke MJ & Sanadi DR (1991) Inhibition of mitochondrial calcium ion transport by an oxo-bridged dinuclear ruthenium ammine complex. *Biochemistry* **30**, 4949–4952.
 - 15 Matlib MA, Zhou Z, Knight S, Ahmed S, Choi KM, Krause-Bauer J, Phillips R, Altschuld R, Katsube Y, Sperelakis N et al. (1998) Oxygen-bridged dinuclear ruthenium amine complex specifically inhibits Ca²⁺ uptake into mitochondria *in vitro* and *in situ* in single cardiac myocytes. *J Biol Chem* **273**, 10223–10231.
 - 16 Zazueta C, Sosa-Torres ME, Correa F & Garza-Ortiz A (1999) Inhibitory properties of ruthenium amine complexes on mitochondrial calcium uptake. *J Bioenerg Biomembr* **31**, 551–557.
 - 17 Gupta MP, Innes IR & Dhalla NS (1988) Responses of contractile function to ruthenium red in rat heart. *Am J Physiol* **255**, H1413–H1420.
 - 18 Petrosillo G, Ruggiero FM, Di Venosa N & Paradisi G (2003) Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion: role of reactive oxygen species and cardiolipin. *FASEB J* **17**, 714–716.
 - 19 Lucas DT & Szewda LI (1998) Cardiac reperfusion injury: aging, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 510–514.
 - 20 Xu L, Tripathy A, Pasek DA & Meissner G (1999) Ruthenium red modifies the cardiac and skeletal muscle Ca²⁺ release channels (ryanodine receptors) by multiple mechanisms. *J Biol Chem* **274**, 32680–32691.
 - 21 Carvajal K, El Hafidi M & Banos G (1999) Myocardial damage due to ischemia and reperfusion in hypertriglyceridemic and hypertensive rats: participation of free radicals and calcium overload. *J Hypertens* **17**, 1607–1616.
 - 22 Parra E, Cruz D, Garcia G, Zazueta C, Correa F, Garcia N & Chavez E (2005) Myocardial protective effect of octylguanidine against the damage induced by ischemia reperfusion in rat heart. *Mol Cell Biochem* **269**, 19–26.
 - 23 Pepe S, Tsuchiya N, Lakatta EG & Hansford RG (1999) PUFA and aging modulate cardiac mitochondrial membrane lipid composition and Ca²⁺ activation of PDH. *Am J Physiol* **276**, H149–H158.
 - 24 Di Lisa F, Menabo R, Barbato R & Siliprandi N (1994) Contrasting effects of propionate and propionyl-L-carnitine on energy-linked processes in ischemic hearts. *Am J Physiol* **267**, H455–H461.
 - 25 Gogvadze V, Robertson JD, Zhivotovsky B & Orrenius S (2001) Cytochrome c release occurs via Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent mechanisms that are regulated by Bax. *J Biol Chem* **276**, 19066–19071.
 - 26 Halestrap AP, Clarke SJ & Javadov SA (2004) Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion – a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* **61**, 372–385.
 - 27 Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L et al. (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**, 549–554.
 - 28 Griffiths EJ & Halestrap AP (1995) Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J* **307**, 93–98.
 - 29 Molkenkin JD (2000) Calcineurin and beyond: cardiac hypertrophic signaling. *Circ Res* **87**, 731–738.
 - 30 Di Lisa F, Menabo R, Canton M, Barile M & Bernardi P (2001) Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD⁺ and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem* **276**, 2571–2575.
 - 31 Clarke SJ, McStay GP & Halestrap AP (2002) Sangli-fehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A. *J Biol Chem* **277**, 34793–34799.
 - 32 Brustovetsky N & Dubinsky JM (2000) Limitations of cyclosporin A inhibition of the permeability transition in CNS mitochondria. *J Neurosci* **20**, 8229–8237.
 - 33 Javadov SA, Clarke S, Das M, Griffiths EJ, Lim KH & Halestrap AP (2003) Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transi-

- tion pores in the reperfused rat heart. *J Physiol* **549**, 513–524.
- 34 Correa F & Zazueta C (2005) Mitochondrial glycosidic residues contribute to the interaction between ruthenium amine complexes and the calcium uniporter. *Mol Cell Biochem* **272**, 55–62.
- 35 Palmer JW, Tandler B & Hoppel CL (1977) Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *J Biol Chem* **252**, 8731–8739.
- 36 Lesnefsky EJ, Chen Q, Moghaddas S, Hassan MO, Tandler B & Hoppel CL (2004) Blockade of electron transport during ischemia protects cardiac mitochondria. *J Biol Chem* **279**, 47961–47967.
- 37 Duan J & Karmazyn M (1989) Relationship between oxidative phosphorylation and adenine nucleotide translocase activity of two populations of cardiac mitochondria and mechanical recovery of ischemic hearts following reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol* **67**, 704–709.
- 38 Palmer JW, Tandler B & Hoppel CL (1986) Heterogeneous response of subsarcolemmal heart mitochondria to calcium. *Am J Physiol* **250**, H741–H748.
- 39 Pacher P & Hajnoczky G (2001) Propagation of the apoptotic signal by mitochondrial waves. *EMBO J* **20**, 4107–4121.
- 40 Kirichok Y, Krapivinsky G & Clapham DE (2004) The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* **427**, 360–364.
- 41 Carvajal K, Banos G & Moreno-Sanchez R (2003) Impairment of glucose metabolism and energy transfer in the rat heart. *Mol Cell Biochem* **249**, 57–65.
- 42 Wieckowski MR & Wojtczak L (1998) Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Lett* **423**, 339–342.
- 43 Moreno-Sanchez R & Hansford RG (1988) Dependence of cardiac mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity on intramitochondrial free Ca²⁺ concentration. *Biochem J* **256**, 403–412.
- 44 Kao JP, Harootunian AT & Tsien RY (1989) Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by Fluo-3. *J Biol Chem* **264**, 8179–8184.
- 45 Tate CA, Bick RJ, Chu A, Van Winkle WB & Entman ML (1985) Nucleotide specificity of cardiac sarcoplasmic reticulum. GTP-induced calcium accumulation and GTPase activity. *J Biol Chem* **260**, 9618–9623.
- 46 Ferguson-Miller S, Brautigan DL & Margoliash E (1976) Correlation of the kinetics of electron transfer activity of various eukaryotic cytochromes c with binding to mitochondrial cytochrome c oxidase. *J Biol Chem* **251**, 1104–1115.
- 47 Colilla W, Jorgenson RA & Nordlie RC (1975) Mammalian carbamyl phosphate: glucose phosphotransferase and glucose-6-phosphate phosphohydrolase: extended tissue distribution. *Biochim Biophys Acta* **377**, 17–25.
- 48 Glastris B & Pfeiffer SE (1974) Mammalian membrane marker enzymes: sensitive assay for 5'-nucleotidase and assay for mammalian 2',3'-cyclic-nucleotide-3'-phosphohydrolase. *Methods Enzymol* **32**, 24–31.
- 49 Meissner G & Henderson JS (1987) Rapid calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles is dependent on Ca²⁺ and is modulated by Mg²⁺, adenine nucleotides, and calmodulin. *J Biol Chem* **262**, 3065–3073.



ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A.C.
AMP-900928062


REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA
Facultad de Medicina, Ciudad Universitaria, UNAM
Apartado Postal 70-281
México, D.F., 7 de marzo de 2006

AUTOR: Gerardo de Jesús García-Rivas

Por medio de la presente se les comunica que su artículo titulado: "**Canales mitocondriales de potasio sensibles a ATP y cardioprotección**", fue aceptado en la Revista de Educación Bioquímica REB correspondiente al Vol. 25 No. 1 marzo 2006.

Esperando tener nuevamente noticias tuyas, reciban un cordial saludo.

ATENTAMENTE


Dr. José Víctor Calderón Salinas
Editor en Jefe

Para cualquier comunicación, contactar a Marivel Rojas G.
Asistente Editorial del REB
Tel. 5623-21-70; FAX: 5616-24-19
Correo electrónico: reb@laguna.fmedic.unam.mx

Canales mitocondriales de potasio sensibles a ATP y cardioprotección

Gerardo de Jesús García-Rivas.

Departamento de Bioquímica. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

Juan Badiano 1. Sección XVI, 14080. México D.F. Tel.55732911 ext. 1465. Fax 55730926. Correo E. ailthamones@yahoo.com

Canales mitocondriales de K_{ATP} y cardioprotección

ABSTRACT

Ischemic preconditioning (IPC) is an effective situation for reducing heart damage trigger by ischemia reperfusion. IPC consists of exposing heart to a single or multiple brief periods of ischemia before the occurrence of more prolonged ischemic insult, which otherwise would lead to massive myocardial damage and cell death. Comprehensive data suggest the participation of ATP-sensitive potassium channels in IPC protection. Although this type of channels is present in both the sarcolemmal and the inner mitochondrial membrane of heart cells, the evidence reviewed here suggest that the mitochondrial channels and not those present in the sarcolemma, contribute to the cardioprotection. The pharmacological modulation of these channels is emphasized.

Keywords: cardioprotection, mitochondrial potassium channels, diazoxide, reperfusion injury.

RESUMEN

Una de las estrategias más efectivas para proteger al corazón del daño por reperfusión es someterlo a uno o varios períodos cortos de isquemia antes de una isquemia prolongada y severa, que pueda conducir al daño miocárdico y a la muerte celular. Esta estrategia conocida como preconditionamiento isquémico (PCI) se basa en la activación de diversos mecanismos cuya importancia se encuentra actualmente bajo discusión. Se ha sugerido que los canales mitocondriales de potasio sensibles a ATP, participan en la protección derivada del PCI. En esta revisión se presenta información reciente que sustenta esta hipótesis y enfatiza la modulación farmacológica de este tipo de canales.

Palabras clave: cardioprotección, canales mitocondriales de potasio, diazóxido, daño por reperfusión.

INTRODUCCIÓN

Nuestro conocimiento de la fisiología de los canales iónicos ha aumentado enormemente durante los últimos 20 años, debido a los avances en las técnicas de medición de canal único y de clonación molecular. Hasta el momento más de 50 diversos canales de potasio se han identificado y de acuerdo a sus características estructurales se han clasificado en al menos dos grandes grupos. Los canales formados por proteínas con seis dominios transmembranales, que incluyen a los dependientes de voltaje (K_v) y a los canales de potasio activados por calcio (K_{Ca}) y los canales formados por 2 dominios transmembranales, que agrupa a los rectificadores entrantes (K_{ir}), a los acoplados a proteínas G y a los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}) (1). Este último tipo de canales se identificaron hace veintidós años, por Akinori Noma en parches de membrana plasmática de cardiomiocitos ventriculares. Posteriormente fueron encontrados en otros tejidos incluyendo el cerebro, el músculo liso y esquelético, el endotelio y el páncreas, órgano en donde se les ha relacionado con la secreción de la insulina. Ya que estos canales se activan al disminuir la concentración de ATP intracelular y acoplan el metabolismo miocárdico con la actividad eléctrica, se propuso que durante la hipoxia estos canales podrían servir como un mecanismo endógeno de cardioprotección, al acortar la duración del potencial de acción y limitar la entrada de calcio a las células cardiacas (2). Hasta 1994 se asumía que éste era el mecanismo de acción del preconditionamiento isquémico (PCI) y que el efecto protector de los agonistas de los canales de K_{ATP} contra el daño por reperfusión se debía a su acción sobre dichos canales. Sin embargo, a partir del trabajo de Yao y Gross se acumularon evidencias de que el efecto protector no siempre correlacionaba con la reducción del potencial de acción, situación que implicaba la existencia de sitios adicionales, posiblemente intracelulares, para explicar el efecto protector de estos agonistas (3).

Los canales mitocondriales de potasio sensibles a ATP ($mitK_{ATP}$), se describieron por primera vez por Inoue y colaboradores en 1991 en mitoplastos gigantes preparados a partir de mitocondrias de hígado de rata (4). Este grupo reportó que la conductancia de estos canales (alrededor de 10 pS en 100 mM de potasio en la matriz y 33 mM en el citosol), era inactivada reversiblemente por ATP y además compartían antagonistas con los canales de membrana plasmática. Un año más tarde, Paucke en el laboratorio de Keith Garlid, aisló y purificó parcialmente un canal $mitK_{ATP}$ de mitocondrias de corazón de res y demostró que estos canales tenían características similares a los de la membrana plasmática. Sin embargo, observó que su función estaba relacionada principalmente con el control del volumen de la matriz mitocondrial y no con la regulación de la actividad eléctrica como se había descrito para los canales de K_{ATP} de la membrana plasmática (5). Al estudiar el efecto de los inhibidores y activadores de estos canales sobre algunas funciones mitocondriales, se dio la pauta para establecer una estrecha relación entre los canales $mitK_{ATP}$ y la cardioprotección, lográndose explicar la paradójica observación, de que algunos activadores de canales de K_{ATP} protegían durante la reperfusión post-isquémica, sin alterar la actividad de los canales de K_{ATP} en la membrana plasmática.

Canales mitK_{ATP} y cardioprotección

La adaptación del corazón a la hipoxia crónica como estrategia de cardioprotección, resultó de una serie de estudios epidemiológicos a finales de los cincuenta que mostraban una disminución significativa en la incidencia de infartos miocárdicos en personas que vivían a gran altura. Estas observaciones fueron confirmadas en estudios experimentales, usando una cámara hipobárica, mostrando que dicha condición limitaba el tamaño del infarto miocárdico (6). Después de un gran periodo de escepticismo, Charles Murry en el laboratorio de Robert Jennings encontró que 4 ciclos breves de oclusión coronaria antes de una oclusión de 40 minutos, reducían el infarto en un 75% (7). A partir de estos hallazgos, este fenómeno fue llamado PCI y se convirtió en una de las estrategias más efectivas para proteger al corazón del daño por reperfusión. Los mecanismos de cardioprotección generados por el PCI, se encuentran aún bajo discusión; sin embargo, diversos estudios sugieren que los canales K_{ATP} pudieran estar involucrados, pues se ha determinado que durante los ciclos breves de hipoxia estos canales se activan. Adicionalmente el tratamiento con activadores de estos canales reproducen el efecto protector del PCI, mientras que los bloqueadores de los mismos evitan la protección del PCI.

En 1997 el grupo de Garlid presentó el primer trabajo en el que se mostraba evidencia directa de la relación entre los canales mitK_{ATP} y la cardioprotección. Este grupo de investigadores reportó que la farmacología de los canales de K_{ATP} de la membrana plasmática y la de los canales mitK_{ATP} era sorprendentemente diferente al analizar el efecto protector contra el daño por reperfusión de la sulfonamida diazóxido. Este compuesto demostró tener una potencia 2000 veces más alta sobre los canales mitocondriales ($K_{0.5}=0.4\mu\text{M}$) que sobre los de sarcolema ($855\mu\text{M}$). El espectacular efecto protector del diazóxido fue bloqueado por la glibenclamida y otros antagonistas de los canales de K_{ATP} . Estos resultados sugerían que el diazóxido y otros abridores de canales de K_{ATP} interactúan con los canales de la mitocondria para producir el efecto cardioprotector (8). En concordancia con los resultados de Garlid y colaboradores, estudios en el laboratorio de Eduardo Marbán han demostrado que el diazóxido es un abridor selectivo de canales mitK_{ATP} y que el 5-hidroxicanoato (5-HD), es un bloqueador también muy específico para estos canales y capaz de suprimir el efecto protector del PCI (9).

Adicionalmente se ha sugerido que los canales K_{ATP} del sarcolema no están involucrados en el mecanismo del PCI, ya que novedosos y selectivos bloqueadores de los canales K_{ATP} de la membrana plasmática como el HMR1883, no inhiben el PCI como lo hace el 5-HD (10).

Farmacología de los canales mitK_{ATP}

La naturaleza anfipática de los abridores y bloqueadores de los canales K_{ATP} , hace que interactúen con diversos blancos intracelulares generando efectos inespecíficos que complican la interpretación de los resultados. En la tabla 1, se resume la selectividad de diferentes agonistas y antagonistas sobre canales sarcolemales o mitocondriales. De acuerdo con los hallazgos encontrados en

cardiomiocitos y en mitocondrias aisladas, los compuestos más selectivos para los mitK_{ATP} son el diazóxido, el nicoradil y el BMS-191095 que tienen una actividad muy baja sobre los canales de sarcolema. Existe un grupo de abridores de canales de K_{ATP} (e.g. cromacalim, levocromacalim, EMD60480, EMD57970, pinacidil, el sulfato de minoxidil y el KRN2391) que producen efectos en el rango submicromolar pero que no pueden discriminar entre los dos tipos de canales. En cuanto a los bloqueadores la glibenclamida actúa sobre ambos, el HMR1098 ha mostrado ser un bloqueador que preferentemente inhibe los canales en la membrana plasmática. En contraparte, el 5-HD inhibe selectivamente los canales mitocondriales con efectos mínimos sobre los canales K_{ATP} del sarcolema. Sin embargo, las condiciones experimentales en la que se realizó esta caracterización, parecen ser importantes en la selectividad de estos compuestos. Por ejemplo, el diazóxido no es muy potente en los canales K_{ATP} en el sarcolema de células cardiacas; sin embargo, es un activador muy eficiente sobre las isoformas de los canales de K_{ATP} de células pancreáticas y de músculo liso. Por ello los posibles efectos de estos compuestos sobre la disminución del infarto miocárdico podrían ir más allá de los blancos no mitocondriales en otros órganos y sistemas.

Complicando aún más este panorama, la selectividad de estas drogas puede alterarse por condiciones patológicas. Por ejemplo, durante la isquemia como resultado de cambios en la concentración de los fosfatos de alta energía o por cambios en el pH, la sensibilidad a abridores de canales K_{ATP} parece aumentar. Otro hallazgo sorprendente es que el bloqueador 5-HD en estas condiciones, i.e. $[\text{ADP}]=1\text{mM}$ a pH 6.6, puede activar los canales mitK_{ATP} (11).

Para establecer el potencial terapéutico de estos fármacos debe examinarse la selectividad de estos canales en condiciones fisiológicas así como en condiciones de inhibición metabólica durante la isquemia para evaluar su participación en el efecto protector.

Mecanismo de cardioprotección

Desde 1998 se han planteado diversas hipótesis sobre el posible mecanismo de protección de los canales mitK_{ATP} . Dichas hipótesis no son excluyentes unas con otras ya que es probable que todas contribuyan a la preservación de la función mitocondrial y contráctil en el corazón. Existe evidencia experimental que fortalece la posibilidad de que los canales mitK_{ATP} disminuyan la sobrecarga de calcio mitocondrial, la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm), fenómenos que llevan al daño miocárdico y cuya relación con los canales mitK_{ATP} se revisa a continuación.

A) Disminución de la sobrecarga de calcio

Durante la reperfusión la producción de ERO en la mitocondria induce la lipoperoxidación de membranas provocando un aumento en la concentración de calcio intracelular, debido principalmente a su liberación de receptáculos endógenos como el retículo sarcoplásmico. El aumento en el calcio intracelular tiene como consecuencia la acumulación de calcio en la matriz mitocondrial. Este aumento de calcio en la mitocondria genera un ciclo fútil de liberación-recaptura

en el que se pierde energía, pues la entrada de calcio en la mitocondria es dependiente de un gradiente eléctrico transmembranal negativo en el interior. Lui y colaboradores sugirieron en 1997 que los abridores de mitK_{ATP} podrían disminuir la acumulación de calcio mitocondrial durante la reperfusión (12); esta hipótesis fue confirmada el siguiente año por el grupo de Terzic (13) que determinó que el diazóxido y el pinacidil disminuyen la velocidad de entrada de calcio a las mitocondrias aisladas y que este efecto es inhibido por 5-HD, este fenómeno se atribuyó a la despolarización parcial (10-25mV) del gradiente eléctrico transmembranal que ocurre como respuesta a los abridores de canales mitK_{ATP} . Este mecanismo se ha estudiado recientemente por nuestro grupo, utilizando inhibidores específicos del transporte de calcio mitocondrial. Nuestros resultados muestran que la disminución en la velocidad de entrada de calcio a la mitocondria está asociada a un impresionante efecto protector contra el daño por reperfusión (14).

B) Aumento/disminución en la producción de ERO

Las ERO tienen un papel esencial y a la vez contradictorio en el PCI y en la protección mediada por los abridores de los canales mitK_{ATP} . Al parecer la protección a través del PCI está mediada por la generación de ERO, por medio de vías activadas por radicales libres que regulan principalmente a la proteína cinasa C (PKC) por medio de un mecanismo aún no determinado (15). Adicionalmente diversos grupos han reportado que la protección por abridores de canales de K_{ATP} , es inhibida por atrapadores de radicales libres. En contraposición, se ha demostrado que las ERO producen un daño irreversible a las células cardíacas durante la reperfusión y se ha obtenido evidencia experimental que apoya la hipótesis de que el PCI disminuye la producción de ERO en la mitocondria (16). La contradicción entre los resultados obtenidos por diferentes grupos hace necesario obtener pruebas adicionales que puedan aclarar la participación de este mecanismo en el PCI.

C) Apertura del PTPm

La transición de la permeabilidad mitocondrial es reconocida recientemente como una de las vías centrales de diversos procesos fisiopatológicos. El poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial es un megacanal de gran conductancia (≈ 120 pS) que tiene múltiples estados de subconductancia y un diámetro de poro de ≈ 2 nm (17). La apertura del PTPm se favorece bajo diversas condiciones pero principalmente debido a la acumulación de calcio en la matriz mitocondrial, acompañada de la disminución en la relación ATP/ADP y a un aumento en la producción de ERO. La apertura irreversible del PTPm durante la reperfusión transforma a la mitocondria, de principal productor de ATP a consumidor, acelerando la debacle energética y promoviendo la muerte celular. Adicionalmente, la apertura del PTPm provoca hinchamiento mitocondrial que causa la ruptura de la membrana interna y libera moléculas pro-apoptóticas que se encuentran en el espacio intermembranal, i.e. citocromo c, Smac/DIABLO y Endo G que promuevan la muerte celular a través de un mecanismo dependiente de caspasas. La inhibición de la apertura de PTPm por

bloqueadores específicos y por el PCI, constituye un paradigma en cardioprotección. Sin embargo, muy recientemente se ha demostrado que un estado transitorio de baja conductancia de este poro es un prerrequisito para que el PCI y los abridores de los mitK_{ATP} puedan ejercer su efecto protector. Esta conductancia transitoria puede limitar la acumulación de calcio en la matriz, favoreciendo la salida de calcio y generando las ERO, que activan proteínas cinasas implicadas en el mecanismo de protección del PCI (18). Una representación esquemática del papel de esta apertura transitoria del PTPm se presenta en la figura 2.

Estructura molecular de los canales mitK_{ATP} .

La estructura de la proteína formadora del canal en la mitocondria es muy controversial y hasta el momento no se han obtenido resultados definitivos. En general, la actividad de entrada de potasio se ha observado en liposomas reconstituidos con proteínas mitocondriales con pesos entre 50 y 60 KDa. En estos proteoliposomas se ha identificado una proteína de 54 KDa que podría ser un componente de los canales mitK_{ATP} (5). Adicionalmente, se ha sugerido que los canales mitK_{ATP} pueden estar constituidos por subunidades de canales rectificadores entrantes (Kir) en asociación con un receptor de sulfonilurea (SUR). Esta hipótesis está sustentada por experimentos en los que anticuerpos contra Kir6.1 reconocen a una proteína de 51 KDa en preparaciones mitocondriales de la membrana interna (19). En contraposición, la protección del PCI en corazones de ratones knockout para Kir6.1 y Kir6.2 se mantuvo intacta sugiriendo que estas subunidades no forman parte de los canales mitK_{ATP} (20). La posibilidad de que un SUR pueda constituir este canal se sostiene con base en diversos reportes que muestran que las membranas mitocondriales presentan sitios de baja unión a sulfonilurea y por la presencia de una proteína de 63 KDa con esas características de unión (21). Recientemente, el grupo de Eduardo Marbán en Baltimore describió que la enzima del ciclo de Krebs succinato deshidrogenasa (SDH), que se encuentra formando supercomplejos macromoleculares en la membrana interna mitocondrial ser purificada y reconstituida en liposomas o en bicapas lipídicas, mostró actividad semejante a los canales mitK_{ATP} . Esta actividad no solo es sensible a ligandos de los canales mitK_{ATP} sino también a inhibidores de la SDH. Usando la técnica de co-inmunoprecipitación, este grupo identificó al menos cuatro proteínas que interactúan físicamente con la SDH: la proteína mABC1 (por su nombre en inglés ATP-binding cassette protein 1), el ANT, la ATP sintetasa y el acarreador de fosfatos. Una fracción que contenía este supercomplejo fue incorporada en liposomas y mostró actividad semejante a los canales mitK_{ATP} sensible a 5-HD. Estos datos sugieren que este complejo formado (al menos) por estas cinco proteínas de la membrana interna mitocondrial es el componente estructural y funcional de los canales mitK_{ATP} (22) (Figura 2).

Conclusiones

El potencial farmacológico y terapéutico de los canales K_{ATP} resulta de mucho interés para el tratamiento de las patologías asociadas al daño por isquemia-reperfusión en el corazón. Sin

embargo, falta comprender con mayor detalle los mecanismos que producen su efecto protector durante la reperfusión miocárdica. La participación de los canales mitocondriales en el mecanismo protector, esta apoyada por mucha evidencia farmacológica. Sin embargo, es indispensable la purificación y la caracterización de estos canales, para contribuir al desarrollo de fármacos más selectivos para un posible tratamiento clínico, ya que la mayoría de los abridores de los canales K_{ATP} tienen poca selectividad tisular y por ello su uso en la clínica es limitado.

Referencias

- 1.- Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, Covarrubias M, Desir GV, Furuichi K, Ganetzky B, Garcia ML, Grissmer S, Jan LY, Karschin A, Kim D, Kuperschmidt S, Kurachi Y, Lazdunski M, Lesage F, Lester HA, McKinnon D, Nichols CG, O'Kelly I, Robbins J, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti M, Seino S, Stuehmer W, Tamkun MM, Vandenberg CA, Wei A, Wulff H, Wymore RS (2003) International Union of Pharmacology XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev* 55:583-586
- 2.- Noma A (1983) ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. *Nature* 305:147-8
- 3.- Yao Z, Gross GJ (1994) Effects of the K_{ATP} channel opener bimakalim on coronary blood flow, monophasic action potential duration, and infarct size in dogs. *Circulation* 89:1769-75
- 4.- Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T (1991) ATP-sensitive K^+ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 352:244-7
- 5.- Paucek P, Mironova G, Mahdi F, Beavis AD, Woldegiorgis G, Garlid KD (1992) Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K^+ channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J Biol Chem* 267:26062-9
- 6.- Poupa O, Krofka K, Prochazka J, Turek Z (1966) Acclimation to simulated high altitude and acute cardiac necrosis. *Fed Proc* 25:1243-6
- 7.- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74:1124-36
- 8.- Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, Grover GJ (1997) Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res.* 81:1072-82
- 9.- Liu Y, Ren G, O'Rourke B, Marban E, Seharaseyon J (2001) Pharmacological comparison of native mitochondrial K(ATP) channels with molecularly defined surface K(ATP) channels. *Mol Pharmacol.* 59:225-30
- 10.- Jung O, Englert HC, Jung W, Gogelein H, Scholkens BA, Busch AE, Linz W (2000) The K(ATP) channel blocker HMR 1883 does not abolish the benefit of ischemic preconditioning on myocardial infarct mass in anesthetized rabbits. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 361:445-51
- 11.- D'ahan N, Moreau C, Prost AL, Jacquet H, Alekseev AE, Terzic A, Vivaudou M (1999) Pharmacological plasticity of cardiac ATP-sensitive potassium channels toward diazoxide revealed by ADP. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:12162-7
- 12.- Liu Y, Sato T, O'Rourke B, Marban E (1998) Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation* 97:2463-9

- 13.- Holmuhamedov EL, Wang L, Terzic A (1999) ATP-sensitive K⁺ channel openers prevent Ca²⁺ overload in rat cardiac mitochondria. *J Physiol* 519:347-60
- 14.- García-Rivas GJ, Guerrero-Hernández A, Guerrero-Serna G, Rodríguez-Zavala JS, Zazueta C (2005) Inhibition of mitochondrial calcium uniporter by oxo-bridged dinuclear ruthenium amine complex (Ru₃₆₀) prevents from irreversible injury in post-ischemic rat heart. *FEBS J* 272:3477-3488
- 15.- Forbes RA, Steenbergen C, Murphy E (2001) Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. *Circ Res* 88:802-9
- 16.- Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML (1987) Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:1404-7
- 17.- Crompton M, Costi A (1990). A heart mitochondrial Ca²⁺-dependent pore of possible relevance to re-perfusion-induced injury. Evidence that ADP facilitates pore interconversion between the closed and open states. *Biochem J* 266:33-9
- 18.- Hausenloy D, Wynne A, Duchon M, Yellon D (2004) Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning-induced protection. *Circulation* 109:1714-7
- 19.- Suzuki M, Kotake K, Fujikura K, Inagaki N, Suzuki T, Gonoi T, Seino S, Takata K (1997) Kir6.1: a possible subunit of ATP-sensitive K⁺ channels in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 241:693-7
- 20.- Seharaseyon J, Ohler A, Sasaki N, Fraser H, Sato T, Johns DC, O'Rourke B, Marban E (2000) Molecular composition of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels probed by viral Kir gene transfer. *J Mol Cell Cardiol* 32:1923-30
- 21.- Grover GJ, Garlid KD (2000) ATP-Sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology. *J Mol Cell Cardiol* 32:677-95
- 22.- Ardehali H, Chen Z, Ko Y, Mejia-Alvarez R, Marban E (2004) Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:11880-

Tabla 1. Efecto diferencial de los abridores y los bloqueadores de los canales de K_{ATP} sobre los canales de mitocondria ($mitK_{ATP}$) y los de sarcolema (K_{ATP}).

	$mitK_{ATP}$	K_{ATP}
Abridores de canales de K		
Diazóxido	√	a
Nicoradil	√	b
BMS-180448	√	x
BMS-191095	√	x
Cromacalima	√	√
EMD60480, EMD57970	√	√
Pinacidil	√	√
KRN2391	√	√
Sulfato de minoxidil	√	√
Sildenafil	√	√
Isoflurano	√	√
Apricalima	√	√
MCC-134	x	√
Levosimendan	√	√
Bloqueadores de canales de K		
5-Hidroxicanoato (5-HD)	√	c
MCC-134	√	x
Glibenclamida, glipizida, glisoxepida	√	√
Glimepirida	d	√
HMR1098 (1883)	e	√

Tabla I. Los abridores de canales, diazóxido, BMS191095, BMS-180448 y los inhibidores 5-HD y MCC-134 han mostrado selectividad sobre la forma mitocondrial, mientras que la glimepirida y el HMR-1883 son más selectivos para los canales de membrana plasmática. (√) Significa que el abridor o bloqueador muestra actividad sobre la proteína; (x) que el compuesto no mostró ningún efecto. En algunos casos, la selectividad depende del tipo de célula y de las condiciones experimentales. a. El Diazóxido puede activar los canales K_{ATP} a altas concentraciones o cuando la concentración de ADP es alta; b. El nicoradil activa los canales K_{ATP} a altas concentraciones; c. El 5-HD inhibe los canales K_{ATP} a bajo pH; d. La Glimepirida inhibe los canales K_{ATP} , pero no inhibe la cardioprotección; e. HMR-1883 bloquea los canales K_{ATP} , pero no inhibe el PCI. (Modificado de O'Rourke B (2004) Circ. Res 94:420-432.)

Figura 1. Esquema hipotético en el que un estado transitorio de baja conductancia del PTPm, puede producir PCI. La estructura del PTPm incluye al canal aniónico dependiente del voltaje (VDAC), el translocador de adenin nucleótidos (ANT) y la ciclofilina D (CFD). El PCI y los abridores de canales mitK_{ATP} producen una apertura transitoria del PTPm, que protege al corazón por medio de la reducción de la sobrecarga de calcio mitocondrial y facilita la señalización del PCI a través de las ERO (modificado de 18).

Figura 2. Representación esquemática del supercomplejo mitocondrial que presenta actividad de canal mitK_{ATP} . El complejo contiene al menos cinco proteínas: la proteína mABC1 (por su nombre en inglés ATP-binding cassette protein 1), el translocador de adenin nucleótidos (ANT), la ATP sintetasa (ATPasa), el acarreador de fosfatos (AP) y la succinato deshidrogenasa (SDH). La subunidad formadora del poro del canal no ha sido aún caracterizada.

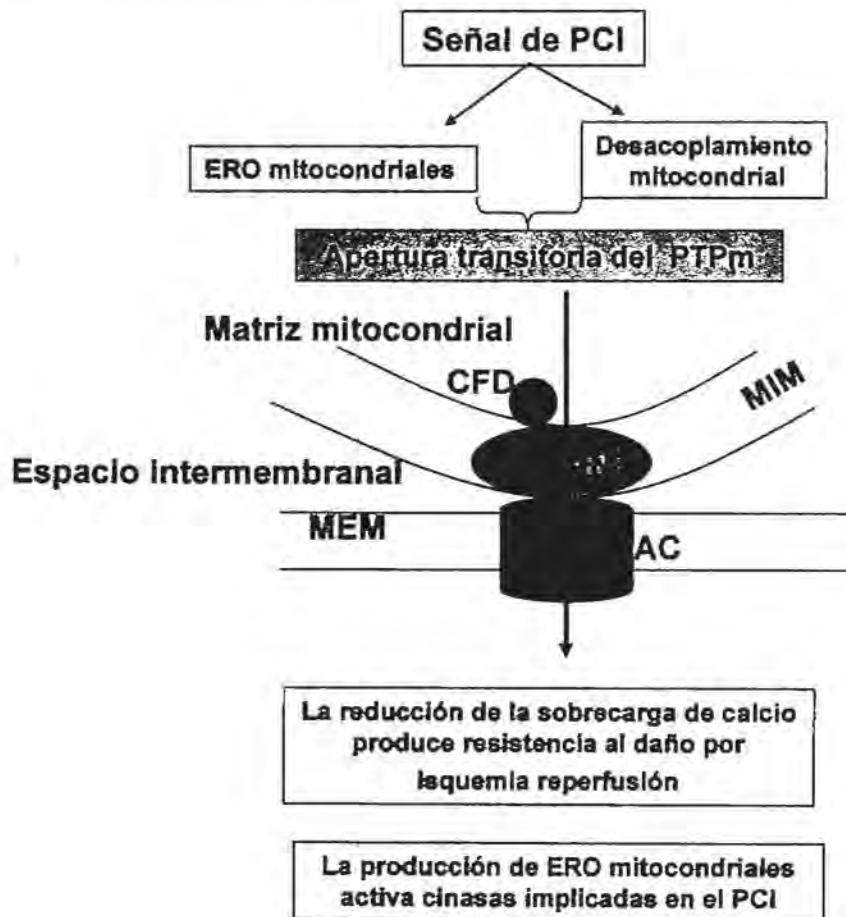


Figura 1

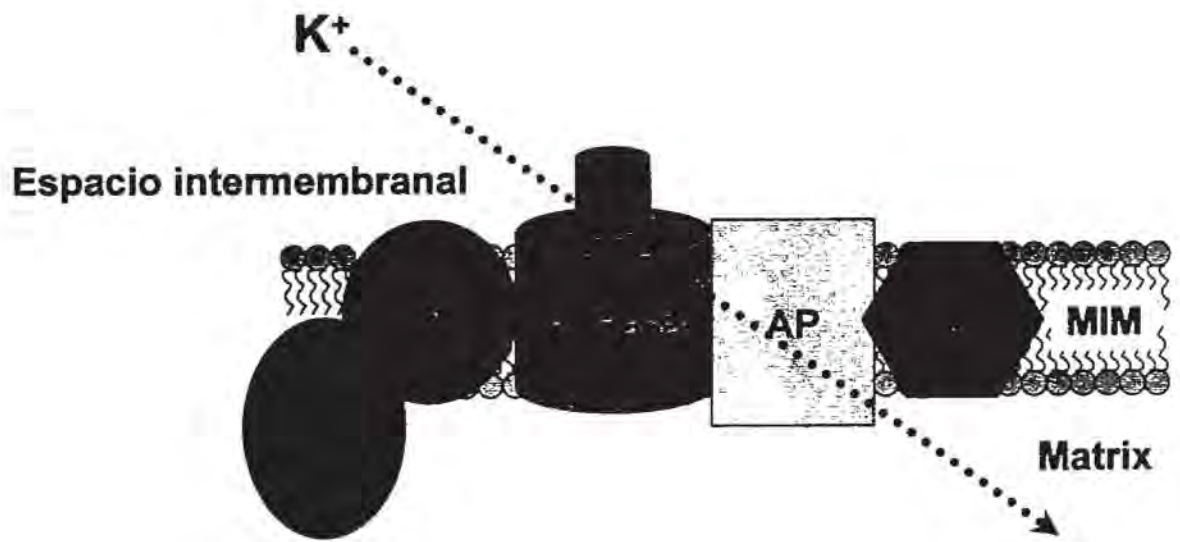


Figura 2

TRABAJO ENVIADO

The mitochondrial calcium uniporter as a target for cardioprotection against left ventricular reperfusion damage.

Gerardo de J. García-Rivas, Karla Carvajal, Francisco Correa and Cecilia Zazueta.

Departamento de Bioquímica. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Juan Badiano 1.

Sección XVI, Tlalpan, México D.F., 14080. México.

Short title: Cardioprotective effect of Ru₃₆₀.

Author to whom proofs and correspondence should be sent:

Cecilia Zazueta Ph.D.

Department of Biochemistry

National Institute of Cardiology

Juan Badiano No. 1

Colonia Sección XVI

Tlalpan 14080, D.F.

Phone (52)-55-55732911 ext 1465.

Fax (52)-55-55730926

e-mail: azazuetam@yahoo.com

Summary

1 Mitochondrial Ca²⁺ overload during reperfusion after transient ischemia induces opening of the mitochondrial permeability transition pore, promoting myocardial irreversible damage. We examined the effect of the oxygen-bridged dinuclear ruthenium amine complex (Ru₃₆₀), a selective inhibitor of the mitochondrial calcium uptake system, in a rat model of ischemia/reperfusion injury.

2 Myocardial reperfusion injury was induced by a 5-min occlusion of the left anterior descending coronary artery, followed by a 5-min reperfusion in anesthetized open-chest rats. We measured reperfusion induced-arrhythmias, marker enzymes of tissular damage and mitochondrial integrity parameters to evaluate the effect of Ru₃₆₀ treatment.

3 Reperfusion elicited a high incidence of arrhythmias, hemodynamic dysfunction, tissular damage and loss of mitochondrial integrity. A intravenous injection of Ru₃₆₀ (27.5 µg kg⁻¹), given 30 min before reperfusion, significantly avoided the damage in the ischemic/reperfused myocardium. Calcium uptake in isolated mitochondria from Ru₃₆₀-treated ventricles was partially diminished, indicating an interaction of this compound with the calcium uniporter.

4 These results demonstrate that Ru₃₆₀ induces cardioprotection in a whole rat model, and thereby could be introduced as a promissory alternative drug in reperfusion therapy.

Keywords: mitochondria; reperfusion injury; calcium uniporter; Ru₃₆₀; permeability transition pore; arrhythmias; calcium overload.

Abbreviations: Ru₃₆₀, the oxygen-bridged dinuclear ruthenium amine complex; ROS, reactive oxygen-derived species; [Ca²⁺]_c, cytosolic calcium concentration; [Ca²⁺]_m, mitochondrial calcium concentration; mCaU, mitochondrial calcium uniporter; mPTP, mitochondrial permeability transition pore; RR, ruthenium red; I/R, the ischemia/reperfusion group; I/R+Ru₃₆₀, the Ru₃₆₀-treated group; SAP, systemic arterial pressure; HR, heart rate; VT, ventricular tachycardia; VF, ventricular fibrillation; CK, creatine kinase, LDH, lactate dehydrogenase; ICP-OES, inductively coupled plasma optical emission spectroscopy; RC, Respiratory control; CSA, cyclosporin A.

1. Introduction

Mitochondrial oxidative phosphorylation entirely provides all the energy required for the contractile process. This energy accounts for more than 90% of the myocardial energetic demand (Mootha et al., 1997). Under pathological conditions such as ischemia, mitochondrial ATP synthesis is abolished, resulting in severe damage to the integrity of heart cells. At reperfusion, abrupt re-oxygenation causes further cell damage by reactive oxygen-derived species (ROS) (Ferrari et al., 2004). ROS affect the sarcoplasmic reticulum and the sarcolemmal membranes, increasing cytosolic calcium concentration ([Ca²⁺]_c) (Krause et al., 1989; Dixon et al., 1990) and consequently the mitochondrial calcium concentration ([Ca²⁺]_m) (Miyamae et al., 1996). At high [Ca²⁺]_m, mitochondria undergoes through calcium release and re-uptake energy-consuming futile cycles, because the proton-driven energy from the respiratory chain is used for cation transport instead for mitochondrial ATP production (Saris & Carafoli, 2005). In addition, mitochondrial calcium overload triggers a non-specific increase in the inner membrane permeability, which contributes to the uncoupling of oxidative phosphorylation and thereby to a diminished ATP synthesis. Recent reports also indicate that mitochondria undergoing non-specific membrane permeability transition, release intramitochondrial molecules that participate in the apoptotic death signaling, i.e. cytochrome c, Smac/DIABLO and the apoptosis inducing factor (Regula & Kirshenbaum, 2004).

On the other hand, it has been suggested that an early mechanism by which ischemic preconditioning exerts its beneficial effects in the post-ischemic heart, is the opening of mitochondrial K⁺-ATP channels, which dissipates the inner mitochondrial membrane potential and reduces the driving force for Ca²⁺ influx through the mitochondrial calcium uniporter (mCaU) (Yellon & Downey, 2003; O'Rourke, 2004). Clearly, this molecule has been a critical target for cardioprotective approaches. In this sense, ruthenium red (RR), a classical inhibitor of the mCaU, has shown protective effects against reperfusion injury in rat hearts (Ferrari et al., 1982; Carry et al., 1989; Miyamae et al., 1996); however, this compound interacts with many proteins related with the excitation-contraction cycle, altering the contractile response in normal hearts and affecting other excitable tissues (Zhou & Bers, 2002; Velasco & Tapia, 2000).

Recently, we demonstrated that Ru₃₆₀, a RR analog exerts specific inhibition on the mCaU, preventing mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening when perfused into the isolated heart at an IC₅₀ ≈ 1 μM (García-Rivas et al., 2005).

Based on the aforementioned, in the present study we explored the efficiency of this compound to protect against ischemia-reperfusion damage in an *in vivo* rat model. Our results suggest that Ru₃₆₀ could be considered a strong candidate to be used as a pharmacological agent against post-ischemic injury, as it exerted protection against mitochondrial calcium overload in a whole animal model.

2. Methods

2.1 Animal groups

All procedures and protocols were performed on male Wistar rats weighing 250–300 g in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the U.S. National Institutes of Health (NHI publication No. 85 (23) revised 1996). The rats were randomly divided into three groups: (1) The control group (n=20) was subjected to thoracotomy, but not to the ischemia/reperfusion protocol. (2) The ischemia/reperfusion group (I/R, n=23) received saline solution (0.9%) for 30 minutes before ischemia and was subjected to the reperfusion protocol. (3) The treated group (I/R+Ru₃₆₀, n=26) was infused through the femoral vein with Ru₃₆₀ for 30 minutes before ischemia and then subjected to the reperfusion protocol.

2.2 Ruthenium complex synthesis

Ru₃₆₀ is a coordination complex containing two ruthenium atoms linked by an oxygen-bridge and surrounded by amine groups that form a nearly linear structure (Figure 1). To synthesize this complex, we followed the procedure described by Ying et al. (1991). The purified preparation was slightly yellowish and exhibited a single λ_{max} at 360 nm. Commercial ruthenium red (RR) was purified by the technique described by Luft (1971). This preparation was not contaminated with Ru₃₆₀. A single absorption peak at 533 nm was observed with distilled water.

2.3 *In vivo* reperfusion protocols

Anesthetized rats with sodium pentobarbital (55 mg kg⁻¹ i.p.) were intubated and air-ventilated (10 mL kg⁻¹, 72 breaths min⁻¹) using a rodent respirator (model 683, Harvard Apparatus). The arterial pressure was measured through a cannula inserted into the femoral artery and connected to a hydrostatic pressure transducer. The ECG was monitored by using three platinum electrodes placed at DII standard position. Arterial pressure and ECG were recorded with a polygraph model 79-D (Grass Instrument Co. Quincy, Mass, US). The femoral vein was cannulated for the administration of ruthenium complexes. Once systemic arterial pressure (SAP) and heart rate (HR) were stabilized, a bolus of the ruthenium compounds or the corresponding saline solution volume was administered to the rats. The

heart was exposed by a left thoracotomy at the fourth intercostal space. Regional ischemia was produced by a ligature (6-0 silk) around the left coronary artery approximately 2 mm from its origin, according to the method of Selye et al. (1960). Myocardial ischemia was confirmed by the appearance of regional cyanosis, akinesia or bulging in the epicardium distal to the ligature. After 5 minutes of ischemia, the ligature was loosened to restore blood flow to the myocardium. Reperfusion was confirmed by the color change in the ventricular surface, from cyanosis to hyperemia and by the appearance of ventricular tachycardia (VT). The heart was reperfused for 5 minutes according to previous reports, to obtain an irreversible damage, characterized by a higher incidence of reperfusion-induced VT and ventricular fibrillation (VF) (Manning & Hearse, 1984; Parra et al., 2005). The incidence and time course of arrhythmias were compared among groups and they were classified in agreement with the Lambeth Convention (Walker et al., 1988).

At the end of the reperfusion protocol, serum levels of creatine kinase (CK) [E.C. 2.7.3.2.] and lactate dehydrogenase (LDH) [E.C. 1.1.1.27.] obtained from blood of the left ventricular cavity, were measured to determine the extent of tissular injury as previously described (Arteaga et al., 1992).

2.4 Measurements of mitochondrial integrity.

Ischemic heart tissue from the left ventricle was minced and homogenized in isolation medium, containing (in mM) KCl (125), EDTA (1) and HEPES-HCl (10), pH 7.3. The mitochondrial fraction was obtained by differential centrifugation as previously described by using the protease Nagarse (García-Rivas et al., 2005). Mitochondrial oxygen consumption was measured using a Clark-type oxygen electrode (Yellow Springs Instruments, OH, US). The experiments were carried out in 1.5 mL of respiration medium, containing (in mM) KCl (125), HEPES-HCl (10) and KH₂PO₄-TRIS (3), pH 7.3. State 4 respiration was evaluated in the presence of 10 mM succinate, plus 1 µg mL⁻¹ rotenone. State 3 respiration was measured after adding 200 µM ADP. Respiratory control index (RC) was calculated as the ratio between state 3 and state 4 rates. ADP/O ratio was calculated as nanomoles of added ADP divided by nanograms of oxygen used during state 3 respiration.

Mitochondrial aconitase activity [E.C.4.2.1.3] was determined spectrophotometrically, by monitoring the disappearance of cis-aconitate at 240 nm ($\epsilon = 3.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Hoerter et al., 2004). One milliunit (mU) was defined as the amount of enzyme that consumed 1 nmol cis-aconitate per minute. Protein content was measured by the Lowry et al. method (1951).

2.5 Measurement of mCaU activity

Mitochondrial calcium uptake was measured using ⁴⁵CaCl₂ (specific activity 1000 cpm nmol⁻¹) using the filtration technique. Briefly, 0.5 mg of mitochondria were incubated in assay medium at the indicated times. Aliquots were withdrawn and filtered through 0.45 µm pore size Millipore filters and the radioactivity retained in the filter was measured in a scintillation counter (Beckman, CA, US). The assay medium contained (in mM) KCl (125), HEPES-HCl (10), 10 succinate (10), KH₂PO₄-TRIS (3),

EGTA (0.5), $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ of rotenone and $50 \mu\text{M}$ of free calcium, calculated by using the Chelator program (Th. Schoenmakers, Nijmegen, Netherlands), pH 7.3.

2.6 Determination of Ru₃₆₀ concentrations in blood and myocardial tissue

Anesthetized rats under assisted respiration were treated with the protective dose of Ru₃₆₀ for 30 minutes. Then, at indicated times blood aliquots were obtained from the left ventricular cavity before the hearts were removed from the rat. The hearts were mounted in a Langendorff apparatus as previously described and washed for 10 minutes with cold Krebs-Henseleit buffer (García-Rivas et al., 2005). Then, the hearts were lyophilized and digested using Suprapure HNO₃, HCl and 30% H₂O₂ (6:2:1) (Merck Darmstadt, Germany). Ruthenium content was analyzed by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES) at 240.272 nm single wavelength in a Simultaneous Optima 4300 DV apparatus (Perkin Elmer, CT, US). Ruthenium standards ($4\text{--}15 \mu\text{g L}^{-1}$) were prepared from primary pure standards ($1000 \mu\text{g L}^{-1}$) (Perkin Elmer, CT, US). For each sample group, independent calibration curves and blanks were prepared. No spectral interferences were detected at 240.272 nm. Ru₃₆₀ content was calculated based on its reported molecular weight, i.e. 550.8 g mol^{-1} .

2.7 Data expression and analysis

Data are expressed as the mean \pm SE. Variance analysis (ANOVA) was used to compare data on heart rate, blood pressure, duration of arrhythmias, mitochondrial activities and calcium transport among control, I/R and I/R+Ru₃₆₀ groups. A *P* value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1 Effect of Ru₃₆₀ on functional recovery of rat hearts after ischemia

A striking feature in myocardial reperfusion is a considerable increase in heart rate (HR), which reflects the appearance of cardiac arrhythmias (del Monte et al., 2004; Tsuchihashi & Curtis, 1991). Ru₃₆₀ elicited a dose-dependent response, reducing the HR when a bolus over $8.2 \mu\text{g kg}^{-1}$ was infused into the rat before ischemia. At higher doses, i.e. $27.5 \mu\text{g kg}^{-1}$, hearts recovered sinus rhythm after 3 minutes of reperfusion. Treatment with saline solution did not prevent reperfusion-induced arrhythmias. We compared the effectiveness of this compound against ruthenium red (RR), a related and widely used inhibitor of calcium uptake, with known cardioprotective properties documented in different models (Ferrari et al., 1982; Carry et al., 1989; Miyamae et al., 1996). RR-treated rats showed a statistical significant reduction in HR at higher doses than those of Ru₃₆₀ from 0.4 to 4 mg kg^{-1} (Figure 2A). We also evaluated the incidence of ventricular fibrillation (VF) in the presence of both compounds. This type of arrhythmias has been used as a criterion of irreversible damage

induced by reperfusion injury (Roh et al., 2005). I/R rats showed a 92% of incidence of VF. In contrast, Ru₃₆₀-treatment gradually diminished the incidence of VF, which disappeared at doses between 13.7 and 27.5 µg kg⁻¹. RR-treatment also decreased the incidence of VF at higher doses (4 mg kg⁻¹) (Figure 2B), enhancing myocardial recovery as previously reported (Carry et al., 1989).

Further experiments with Ru₃₆₀ were performed using a dose of 27.5 µg kg⁻¹. In I/R rats, the systemic arterial pressure (SAP) decreased ≈60% during the reperfusion, whereas in the I/R+Ru₃₆₀ rats, the SAP was maintained (Figure 3B). Increased HR (Figure 3A) correlated with a diminished SAP in I/R rats, indicating reperfusion-induced hemodynamic dysfunctions. There was no significant difference in the total number of arrhythmias that occurred during ischemia between I/R and Ru₃₆₀-treated rats (data not shown). However, in the I/R+Ru₃₆₀ rats the incidence of arrhythmias was significantly modified and the sinus rhythm was recovered at the first minute of reperfusion. At 5 minute of reperfusion normal beats reached ≈90% of the total beats in a minute, in contrast to I/R rats in which normal beats represented 15% of total beats (Figure 4A). To determine the impact of Ru₃₆₀-treatment on the development of cardiac electric abnormalities, we performed an analysis of ventricular arrhythmias in I/R and I/R+Ru₃₆₀ rats. Duration was diminished in I/R+Ru₃₆₀ rats, in comparison to I/R rats. This analysis considers VT and VF. Remarkably, after 3 minutes of reperfusion, VT and VF were totally absent in I/R+Ru₃₆₀ rats (Figure 4B).

To explore cardiac tissular damage induced by reperfusion in Ru₃₆₀-treated rats, we measured CK and LDH activities in sera from both groups. A five-fold increase in CK activity was obtained in I/R rats as compared to the activity measured in the serum of control rats (1448±212 vs 263±68 UI/L; P≤0.001, n=20). CK activity in I/R+Ru₃₆₀-serum was significantly reduced as compared to I/R (604±252UI/L; P≤0.005, n=20). Significant differences were also found in CK activities between I/R+Ru₃₆₀ and control rats (P≤0.05). LDH levels were similar to those observed for CK (control 270±68; I/R 1642±180; I/R+Ru₃₆₀ 714±125). These results support the notion that Ru₃₆₀-treatment in hearts confers resistance to reperfusion injury.

3.2 The effect of Ru₃₆₀ on cardiac mitochondrial integrity after reperfusion

A growing body of experimental evidence supports the idea that mitochondria contribute to cardiac dysfunction and myocyte injury in the pathophysiology of ischemia-reperfusion (Lesnefsky et al., 2001). In this sense we investigated cardiac mitochondrial integrity of Ru₃₆₀-treated rats subjected to reperfusion injury. Mitochondrial respiratory activity was measured in the presence of succinate as substrate (Table I). Mitochondria from I/R ventricles exhibited a 45% reduction in state 3 respiration rate, compared to control mitochondria, whereas respiratory rates in mitochondria obtained from I/R+Ru₃₆₀ ventricles did not show any change. There was no statistical difference between both groups in state 4 respiration rates. Respiratory control (RC) value of control mitochondria was 6.0 ± 0.8, whereas in isolated mitochondria from reperfused ventricles, this value diminished to 3.5 ± 0.6. In contrast, reperfusion did not affect the RC in I/R+Ru₃₆₀ ventricles. The ADP/O indexes for mitochondria

isolated from I/R and from I/R+Ru₃₆₀ ventricles were 0.73±0.3 and 1.4±0.5 respectively, this difference was statistically significant ($P \leq 0.05$). ADP/O values for control and I/R+Ru₃₆₀ mitochondria did not change. It is well known that the oxidative damage produced during reperfusion affects mitochondrial integrity, affecting important enzymatic activities, so we measured mitochondrial aconitase activity, as a reflection of such a damage. Aconitase activity is inversely proportional to the amount of O₂⁻ produced during oxidative stress (Hoerter et al., 2004). In I/R mitochondria, aconitase activity decreased significantly (35%) as compared to control mitochondria. Interestingly, aconitase activity was protected against oxidative damage in I/R+Ru₃₆₀ mitochondria (Figure 5). We determined that Ru₃₆₀ has no ROS-scavenger properties by assessing TBARS content in control mitochondria subjected to oxidative stress as described (García et al., 2005) (data not shown).

3.3 Effect of Ru₃₆₀ on mCaU activity

To assess the effect of Ru₃₆₀ on the mCaU activity, we performed calcium uptake experiments in heart mitochondria from control, I/R and Ru₃₆₀-treated rats. Linear fitting of initial uptake velocities showed a slower calcium influx in mitochondria isolated from Ru₃₆₀-treated hearts compared with control and I/R mitochondria, suggesting an interaction between Ru₃₆₀ and its mitochondrial target. A longer time course analysis showed that in mitochondria from I/R ventricles, calcium uptake was followed by a rapid release probably due to the opening of the mPTP, whereas in mitochondria isolated from control and Ru₃₆₀-treated rats, calcium was maintained inside (Fig 6A). In parallel experiments, we measured mitochondrial membrane potential in mitochondria from each group. As expected, I/R mitochondria developed lower membrane potential than control or Ru₃₆₀-treated mitochondria. Calcium addition induced a transitory mitochondrial membrane depolarization in control and I/R+Ru₃₆₀ mitochondria, whereas in I/R mitochondria it promoted an irreversible drop in the transmembrane potential, indicating the opening of the mPTP (data not shown).

Calcium release in I/R mitochondria was prevented by the addition of CSA in the assay medium (Fig. 6). In this condition calcium accumulation increased 60%.

3.5 Ru₃₆₀ accumulation in heart tissue.

To quantify Ru₃₆₀ accumulation in blood and heart tissue, we measured total ruthenium content at 4 and 30 minutes after Ru₃₆₀ administration. Ruthenium content in blood was 0.41±0.03 µg mL⁻¹ (n=4) four minutes after its administration, this value diminished to 0.32±0.01 µg mL⁻¹ (n=4) 26 minutes later. In the cardiac tissue, ruthenium was undetectable at early administration times (4 minutes), but at minute 30, ruthenium content increased to 1±0.35 µg g⁻¹ dry tissue (n=3). According to reports of protein content and distribution in myocardial cells (Vinnakota & Bassingthwaighe, 2004; Idell-Wenger et al., 1978) we calculated a concentration of 2.1±0.45 pmol Ru₃₆₀ mg⁻¹ of protein of myocardial tissue. The reported K_D values for Ru₃₆₀ in isolated mitochondria are between 0.08–4.2 pmol Ru₃₆₀ mg⁻¹ protein (Matib et al., 1998; Zazueta et al., 1999).

4. Discussion

Calcium homeostasis unbalances during reperfusion are largely due to the release of calcium from intracellular stores, particularly from the sarcoplasmic reticulum (Krause et al., 1989; Tamsah et al., 1999). Experimental observations of calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria suggest the existence of a stable mitochondria-reticulum interaction, where mitochondria could accumulate a large fraction of the calcium released through the ryanodine receptor and the IP3 receptor (Hajnoczky et al., 2000). According to this proposal, confocal image analysis showed evidence of the existence of high calcium concentration microdomains, susceptible to be sensed by mitochondria (Filippin et al., 2003). As calcium accumulation in mitochondria plays a key role in triggering irreversible damage in the post-ischemic heart (Miyata et al., 1992; Miyamae et al., 1996; Garcia-Rivas et al., 2005), we suggest that interventions aimed at reducing mitochondrial calcium overload and hence, membrane potential depolarization, matrix swelling and abolition of ATP synthesis due to the opening of the mPTP, should prevent the irreversible cellular injury induced by reperfusion.

In the present study, we investigated the protective effect of a pharmacological compound, able to directly reduce mitochondrial calcium overload in a whole rat model. Ru₃₆₀ is a mCaU inhibitor that permeates slowly into the cell, and specifically inhibits mitochondrial calcium uptake in intact cardiomyocytes and in isolated heart (Matlib et al., 1998; Garcia-Rivas et al., 2005). We show that in a whole rat model, Ru₃₆₀ treatment reduced myocardial post-ischemic injury, as evaluated by functional recovery analysis and tissular damage markers measurement. Other drugs, like diazoxide (Wang et al., 2001) and ruthenium red (Ferrari et al., 1982; Carry et al., 1989; Miyamae et al., 1996) have been used as modulators of mitochondrial calcium content. Diazoxide is a mitochondrial K⁺-ATP channel opener, that induces an impressive recovery during reperfusion in isolated hearts when used at low concentrations (30-100 μM) [Wang et al., 2001; Garlid et al., 1997; Hausenloy et al., 2004]. In fact, this compound only partially protected at concentrations up to 625 μM in a whole rat model (Fryer et al., 2000). RR also exerts protection in isolated hearts at 0.025-10 μM (Ferrari et al., 1982; Miyamae et al., 1996), but in a whole rat model, it shows protective effect at doses of nearly 30 μM (Carry et al., 1989). At these concentrations both compounds show collateral effects, not only in the heart but in other organs. (Balazs et al., 1975; Silvani et al., 2004; Belmar et al. 1995). Mitochondrial integrity could also be maintained after reperfusion, by inhibiting the opening of the mPTP. In this context, a wide variety of molecules that inhibit this mega-channel, including CSA have been used as protectors against reperfusion injury (Arteaga et al., 1992; Duchon et al., 1993). Other examples are sanglifehrin A (Clarke et al., 2002) and more recently NIM811 (Argaud et al., 2005) and octylguanidine (Parra et al. 2005). Indeed, our proposal is that preventing calcium overload, instead of closing the mPTP could be a more effective strategy, as ROS production in mitochondria appears to be mediated by an increment in $[Ca^{2+}]_m$. By measuring the activity of aconitase, a mitochondrial marker of oxidative stress, we add further support to this idea. I/R mitochondria showed a diminution in

mitochondrial aconitase activity and this inactivation was partially abolished by Ru₃₆₀-treatment, indicating that calcium accumulation into the mitochondrial matrix increases ROS production, an effect also observed by other groups with using RR (Petrosillo et al., 2004; Votyakova & Reynolds, 2005), although the exact mechanism by which $[Ca^{2+}]_m$ induces ROS production is not clear (Brookes et al., 2004). One possible explanation is that calcium induces mitochondrial membrane depolarization, enhancing ROS production (Cadenas & Boveris, 1980; Turrens, 1997), another possibility is that Ca²⁺-binding to cardiolipin molecules dissociates cytochrome c from the inner membrane, inhibiting the respiratory complex III (ubiquinol cytochrome c oxidoreductase) and increasing ROS generation at the ubiquinone cycle (Grijalba et al., 1999; Petrosillo et al., 2004).

In conclusion, we demonstrated that Ru₃₆₀ increases the functional recovery of the heart subjected to ischemia-reperfusion, maintaining mitochondrial integrity when perfused into a whole rat. The mechanism by which this compound prevents the damage involves partial inhibition of mitochondrial calcium transport. Our proposal is that this compound could be introduced as a promising alternative drug to be used in reperfusion therapy. In this context, we determined that higher doses (twenty-fold) than the one used in this work did not produce changes in weight, nor electrical abnormalities or death. However, we recommend further toxicological studies to determine the potential of Ru₃₆₀ to minimize heart injury after transplantation or resuscitation, where post-ischemic damage is involved.

ACKNOWLEDGMENTS:

We thank Dr. Lliana Saldivar and Q. Nadia Munguía (Department of Analytical Chemistry, School of Chemistry, UNAM) for helpful advice and expert technical assistance with ICP-OES. This work was partially supported by CONACyT grant 46456-M to C.Z. This work was presented as part of the doctoral dissertation in partial fulfillment of the requirements for the Doctorate in Biomedical Science degree of Gerardo de Jesús García-Rivas in the graduated studies program of the National Autonomous University of Mexico (UNAM).

References

1. ARGAUD L, GATEAU-ROESCH O, MUNTEAN D, CHALABREYSSE L, LOUFOUAT J, ROBERT D, OVIZE M. (2005). Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **38**, 367-74.
2. ARTEAGA D, ODOR A, LOPEZ RM, CONTRERAS G, PICHARDO J, GARCIA E, ARANDA A, CHAVEZ E. (1992). Impairment by cyclosporin A of reperfusion-induced arrhythmias. *Life Sci.*, **51**, 1127-34.
3. BALAZS T, HERMAN EH, EARL FL, WOLFF FW. (1975). Cardiotoxicity studies with diazoxide, reserpine, guanethidine, and combinations of diazoxide and propranolol in dogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **33**, 498-504.
4. BELMAR E, GARCIA-UGALDE G, TAPIA R. (1995). Motor alterations and neuronal damage induced by intracerebral administration of Ruthenium red: effect of NMDA receptor antagonists and other anticonvulsant drugs. *Mol. Chem. Neuropathol.*, **26**, 285-99.
5. BROOKES PS, YOON Y, ROBOTHAM JL, ANDERS MW, SHEU SS. (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **287**, C817-33.
6. CADENAS E, BOVERIS A. (1980). Enhancement of hydrogen peroxide formation by protophores and ionophores in antimycin-supplemented mitochondria. *Biochem. J.*, **188**, 31-7.
7. CARRY MM, MRAK RE, MURPHY ML, PENG CF, STRAUB KD, FODY EP. (1989). Reperfusion injury in ischemic myocardium: protective effects of ruthenium red and of nitroprusside. *Am. J. Cardiovasc. Pathol.*, **2**, 335-44.
8. CLARKE SJ, MCSTAY GP, HALESTRAP AP. (2002). Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A. *J. Biol. Chem.*, **277**, 34793-9.
9. DEL MONTE F, LEBECHE D, GUERRERO JL, TSUJI T, DOYE AA, GWATHMEY JK, HAJJAR RJ. (2004). Abrogation of ventricular arrhythmias in a model of ischemia and reperfusion by targeting myocardial calcium cycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 5622-7.
10. DIXON IM, KANEKO M, HATA T, PANAGIA V, DHALLA NS. (1990). Alterations in cardiac membrane Ca^{2+} transport during oxidative stress. *Mol. Cell. Biochem.*, **99**, 125-33.
11. DUCHEN MR, MCGUINNESS O, BROWN LA, CROMPTON M. (1993). On the involvement of a cyclosporin A sensitive mitochondrial pore in myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.*, **27**, 1790-4.
12. FERRARI R, DI LISA F, RADDINO R, VISIOLI O. (1982). The effects of ruthenium red on mitochondrial function during post-ischaemic reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **14**, 737-40.
13. FERRARI R, GUARDIGLI G, MELE D, PERCOCO GF, CECONI C, CURELLO S. (2004). Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Curr. Pharm. Des.*, **10**, 1699-711.
14. FILIPPIN L, MAGALHAES PJ, DI BENEDETTO G, COLELLA M, POZZAN T. (2003). Stable interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum allow rapid accumulation of calcium in a subpopulation of mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **278**, 39224-34.
15. FRYER RM, EELLS JT, HSU AK, HENRY MM, GROSS GJ. (2000). Ischemic preconditioning in rats: role of mitochondrial K(ATP) channel in preservation of mitochondrial function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **278**, H305-12.

16. GARCIA N, GARCIA JJ, CORREA F, CHAVEZ E. (2005). The permeability transition pore as a pathway for the release of mitochondrial DNA. *Life Sci.* **76**, 2873-80.
17. GARCÍA-RIVAS GJ, GUERRERO-HERNÁNDEZ A, GUERRERO-SERNA G, RODRÍGUEZ-ZAVALA JS, ZAZUETA C. (2005). Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter by oxo-bridged dinuclear ruthenium amine complex (Ru₃₆₀), prevents from irreversible injury in post-ischemic rat heart. *FEBS J.*, **272**, 3477-88.
18. GARLID KD, PAUCEK P, YAROV-YAROVY V, MURRAY HN, DARBENZIO RB, D'ALONZO AJ, LODGE NJ, SMITH MA, GROVER GJ. (1997). Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ. Res.*, **81**, 1072-82.
19. GRIJALBA, M., VERCESI, A. AND SCHREIER, S. (1999) Ca²⁺-induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca²⁺-stimulation generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. *Biochemistry*, **38**, 13279-13287.
20. HAJNOCZKY G, CSORDAS G, MADESH M, PACHER P. (2000). The machinery of local Ca²⁺ signalling between sarco-endoplasmic reticulum and mitochondria. *J. Physiol.*, **529**, 69-81.
21. HAUSENLOY D, WYNNE A, DUCHEN M, YELLON D. (2004). Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning-induced protection. *Circulation*, **109**, 1714-7.
22. HOERTER J, GONZALEZ-BARROSO MD, COUPLAN E, MATEO P, GELLY C, CASSARD-DOULCIER AM, DIOLEZ P, BOUILLAUD F. (2004). Mitochondrial uncoupling protein 1 expressed in the heart of transgenic mice protects against ischemic-reperfusion damage. *Circulation*, **110**, 528-33.
23. IDELL-WENGER JA, GROTYOHANN LW, NEELY JR. (1978). Coenzyme A and carnitine distribution in normal and ischemic hearts. *J. Biol. Chem.* **253**, 4310-8.
24. KRAUSE SM, JACOBUS WE, BECKER LC. (1989). Alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport in the postischemic "stunned" myocardium. *Circ. Res.*, **65**, 526-30.
25. LESNEFSKY EJ, MOGHADDAS S, TANDLER B, KERNER J, HOPPEL CL. (2001). Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia-reperfusion, aging, and heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **33**, 1065-89.
26. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-75.
27. LUFT JH. (1971). Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. *Anat. Rec.*, **171**, 347-68.
28. MANNING AS, HEARSE DJ. (1984). Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **16**, 497-518.
29. MATLIB MA, ZHOU Z, KNIGHT S, AHMED S, CHOI KM, KRAUSE-BAUER J, PHILLIPS R, ALTSCHULD R, KATSUBE Y, SPERELAKIS N, BERS DM. (1998). Oxygen-bridged dinuclear ruthenium amine complex specifically inhibits Ca²⁺ uptake into mitochondria in vitro and in situ in single cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.*, **273**, 10223-31.
30. MIYAMAE M, CAMACHO SA, WEINER MW, FIGUEREDO VM. (1996). Attenuation of postischemic reperfusion injury is related to prevention of [Ca²⁺]_i overload in rat hearts. *Am. J. Physiol.*, **271**, H2145-53.

31. MIYATA H, LAKATTA EG, STERN MD, SILVERMAN HS. (1992). Relation of mitochondrial and cytosolic free calcium to cardiac myocyte recovery after exposure to anoxia. *Circ. Res.*, **71**, 605-13.
32. MOOTHA VK, ARAI AE, BALABAN RS. (1997). Maximum oxidative phosphorylation capacity of the mammalian heart. *Am. J. Physiol.*, **272**, H769-75.
33. O'ROURKE B. (2004). Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection. *Circ. Res.*, **94**, 420-32.
34. PARRA E, CRUZ D, GARCIA G, ZAZUETA C, CORREA F, GARCIA N, CHAVEZ E. (2005). Myocardial protective effect of octylguanidine against the damage induced by ischemia reperfusion in rat heart. *Mol. Cell. Biochem.*, **269**, 19-26.
35. PETROSILLO G, RUGGIERO FM, PISTOLESE M, PARADIES G. (2004). Ca²⁺-induced reactive oxygen species production promotes cytochrome c release from rat liver mitochondria via mitochondrial permeability transition (MPT)-dependent and MPT-independent mechanisms: role of cardiolipin. *J. Biol. Chem.* **279**, 53103-8.
36. REGULA KM, KIRSHENBAUM LA. (2005). Apoptosis of ventricular myocytes: a means to an end. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **38**, 3-13.
37. ROH HY, JUNG IS, PARK JW, YUN YP, YI KY, YOO SE, KWON SH, CHUNG HJ, SHIN HS. (2005). Cardioprotective effects of [5-(2-methyl-5-fluorophenyl)furan-2-[carbonyl]guanidine (KR-32568) in an anesthetized rat model of ischemia and reperfusion heart injury. *Pharmacology*, **75**, 37-44.
38. SARIS NE, CARAFOLI E. (2005). A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria. *Biochemistry (Mosc.)*, **70**, 187-94.
39. SELYE H, BAJUSZ E, GRASSO S, MENDELL P. (1960). Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology*, **11**, 398-407.
40. SILVANI P, CAMPORESI A, MANDELLI A, WOLFLER A, SALVO I. (2004). A case of severe diazoxide toxicity. *Paediatr. Anaesth.*, **14**, 607-9
41. TEMSAH RM, NETTICADAN T, CHAPMAN D, TAKEDA S, MOCHIZUKI S, DHALLA NS. (1999). Alterations in sarcoplasmic reticulum function and gene expression in ischemic-reperfused rat heart. *Am. J. Physiol.*, **277**, H584-94.
42. TSUCHIHASHI K, CURTIS MJ. (1991). Influence of tedisamil on the initiation and maintenance of ventricular fibrillation: chemical defibrillation by Ito blockade? *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **18**, 445-56.
43. TURRENS JF. (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci. Rep.*, **17**, 3-8.
44. VELASCO I, TAPIA R. (2000). Alterations of intracellular calcium homeostasis and mitochondrial function are involved in ruthenium red neurotoxicity in primary cortical cultures. *J. Neurosci. Res.*, **60**, 543-51.
45. VINNAKOTA KC, BASSINGTHWAIGHTE JB. (2004). Myocardial density and composition: a basis for calculating intracellular metabolite concentrations. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **286**, H1742-9.
46. VOTYAKOVA TV, REYNOLDS IJ. (2005). Ca²⁺-induced permeabilization promotes free radical release from rat brain mitochondria with partially inhibited complex I. *J. Neurochem.*, **93**, 526-37.
47. WALKER MJ, CURTIS MJ, HEARSE DJ, CAMPBELL RW, JANSE MJ, YELLON DM, COBBE SM, COKER SJ, HARNESS JB, HARRON DW, ET AL. (1988). The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc. Res.*, **22**, 447-55.

48. WANG L, CHEREDNICHENKO G, HERNANDEZ L, HALOW J, CAMACHO SA, FIGUEREDO V, SCHAEFER S. (2001). Preconditioning limits mitochondrial Ca^{2+} during ischemia in rat hearts: role of K(ATP) channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **280**, H2321-8.
49. YELLON DM, DOWNEY JM. (2003). Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol. Rev.*, **83**, 1113-51.
50. YING WL, EMERSON J, CLARKE MJ, SANADI DR. (1991). Inhibition of mitochondrial calcium ion transport by an oxo-bridged dinuclear ruthenium ammine complex. *Biochemistry*, **30**, 4949-52.
51. ZAZUETA C, SOSA-TORRES ME, CORREA F, GARZA-ORTIZ A. (1999). Inhibitory properties of ruthenium ammine complexes on mitochondrial calcium uptake. *J Bioenerg. Biomembr.*, **31**, 551-7.
52. ZHOU Z, BERS DM. (2002). Time course of action of antagonists of mitochondrial Ca uptake in intact ventricular myocytes. *Pflugers Arch.*, **445**, 132-8.

Table 1. Respiratory activity in mitochondria isolated from control, I/R and IR+Ru₃₆₀ rat ventricles. Mitochondrial respiratory activity was determined in a standard buffer. Values are the mean \pm SE of at least four different experiments. *P \leq 0.05 significantly different vs control and †P \leq 0.05 vs I/R.

	Control	I/R	I/R+Ru ₃₆₀
State 3 (nmolO min ⁻¹ mg ⁻¹)	372 \pm 34†	205 \pm 18*	358 \pm 45†
State 4 (nmolO min ⁻¹ mg ⁻¹)	61 \pm 13	48 \pm 8	63 \pm 16
ADP/O	1.32 \pm 0.4†	0.73 \pm 0.3*	1.4 \pm 0.5†
RC	6.0 \pm 0.8†	3.5 \pm 0.6*	5.6 \pm 0.7†

Figure legends

Figure 1. Structures of the oxo-bridged amine dinuclear ruthenium complex: $(\mu\text{-O}) [(\text{HCO}_2)(\text{NH}_3)_4\text{Ru}]_2\text{Cl}_3$ (Ru₃₆₀) and ruthenium red (RR). Modified from Ying et al. 1992.

Figure 2. Dose-dependent protective effect of ruthenium complexes. Temporal course analysis of heart rate during reperfusion (Panel A) and incidence of ventricular fibrillation at the 5th minute of

reperfusion (Panel B). Shadowed bar represents values of coronary artery-ligated and reperfused rats (I/R); (■) and black bars represent the values from rats treated with Ru₃₆₀. The doses shown in $\mu\text{g kg}^{-1}$, correspond to 1, 5, 15, 25, 50 nmol kg^{-1} respectively. (□) and white bars represent the values from rats treated with ruthenium red (RR). The doses shown in mg kg^{-1} , correspond to 50, 100, 500, 5000 nmol kg^{-1} respectively.

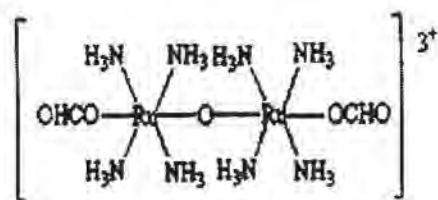
Figure 3. Effect of Ru₃₆₀ on post-ischemic heart functions. A) Temporal course analysis of Ru₃₆₀ effect on systemic arterial pressure (SAP) in control, I/R and I/R+Ru₃₆₀ rats. (□) represent values from control rats not subjected to ischemia; (*) represent values of coronary artery-ligated and reperfused rats (I/R) and (▲) represent the values from rats treated with 27.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of Ru₃₆₀ for 30 minutes and then subjected to ischemia-reperfusion (I/R+Ru₃₆₀). B) Heart rate in control I/R and I/R+Ru₃₆₀ rats. Symbols represent the same conditions as above. Values are the mean of at least 25 different experiments \pm SE. * $P \leq 0.05$, significantly different vs control and † $P \leq 0.05$ vs I/R.

Figure 4. Electric cardiac profile of coronary artery-ligated rats treated with Ru₃₆₀. A) Analysis of the duration of sinus rhythm during reperfusion. White bars represent coronary artery-ligated and reperfused rats (I/R) and black bars correspond to Ru₃₆₀-treated rats. B) Analysis of the duration of arrhythmias produced at reperfusion. Bars represent the same conditions as above. Values are the mean of at least 25 different experiments \pm SE. * $P \leq 0.05$, significantly different vs Ru₃₆₀-treated rats.

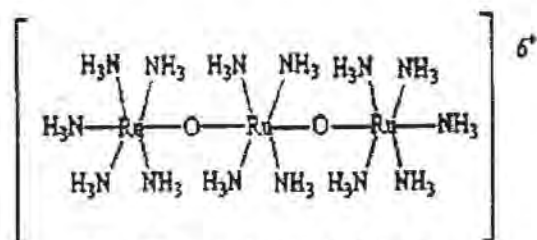
Figure 5. Effect of Ru₃₆₀ treatment on the mitochondrial aconitase activity of coronary artery-ligated rat hearts. Mitochondrial aconitase activity was measured in mitochondria obtained from control rat hearts, coronary artery-ligated and reperfused hearts (I/R) and from rats treated with 27.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of Ru₃₆₀ for 30 minutes and then subjected to ischemia-reperfusion (I/R+Ru₃₆₀). Values given are the mean of at least 4 different experiments \pm SE. * $P \leq 0.05$, significantly different vs control and † $P \leq 0.05$ vs I/R.

Figure 6. Ru₃₆₀ treatment diminishes the initial mitochondrial calcium uptake rate. A) Time course analysis of mitochondrial calcium uptake was evaluated: (□) represent values from control heart; (▲) represent values of coronary artery-ligated and reperfused hearts (I/R) and (●) represent the values from rats treated with 27.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of Ru₃₆₀ and then subjected to ischemia-reperfusion (I/R+Ru₃₆₀). The insert shows the statistical analysis of initial calcium influx rate ($\text{nmolCa}^{2+} \text{mg}^{-1}$). * $P \leq 0.05$ significantly different vs control and † $P \leq 0.05$ vs I/R. B) CSA inhibits the mPTP in mitochondria from coronary artery-ligated hearts. Calcium transport was measured in isolated heart mitochondria from I/R rats in the presence of 1 μM of CSA (Δ) and without CSA (▲). (□) represents values from control mitochondria. The data represent the mean of at least 5 different hearts (panel A) and 4 experiments (panel B) \pm SE.

FIGURE 1



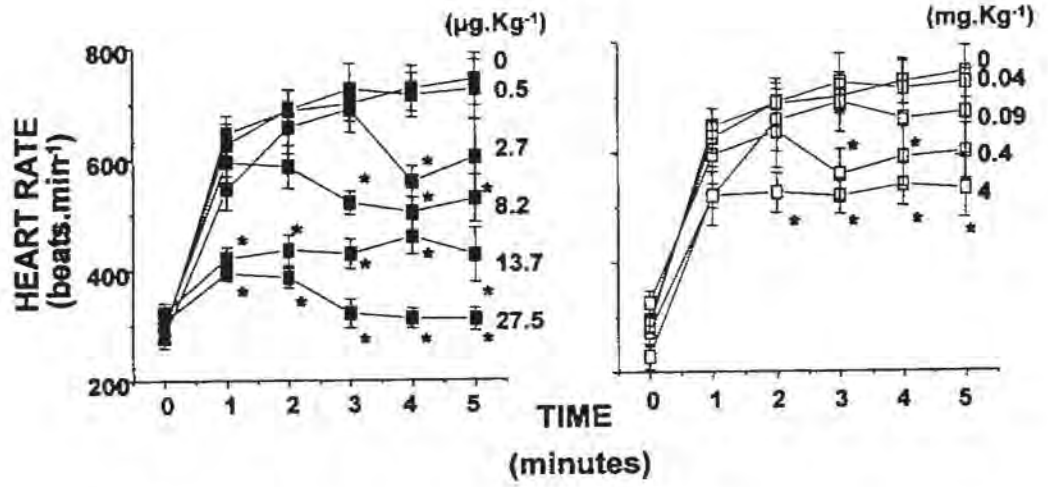
Ru₃₆₀



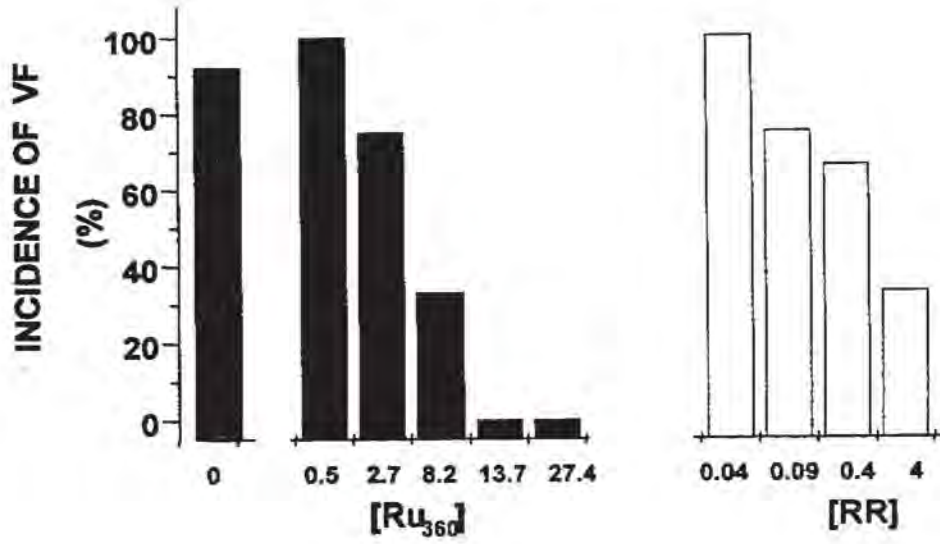
RUTHENIUM RED

FIGURE 2

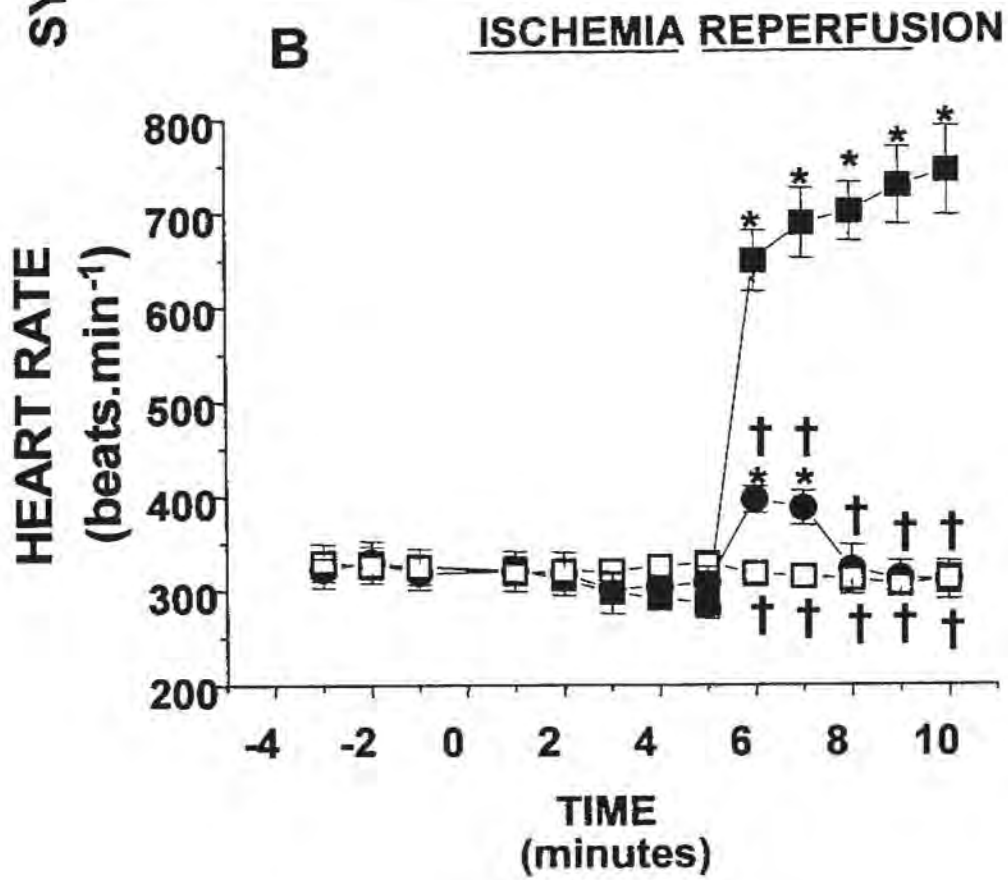
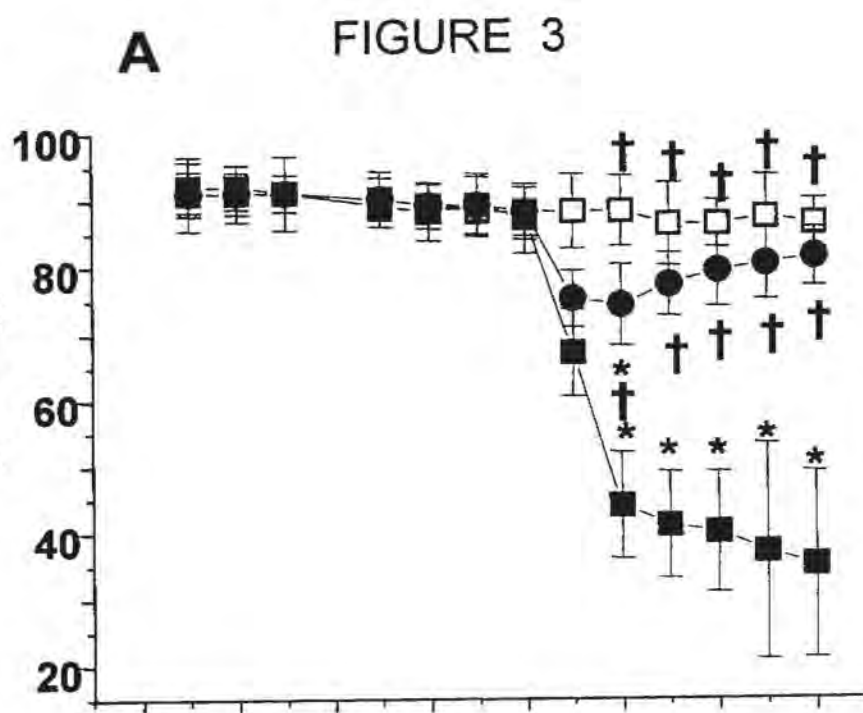
A



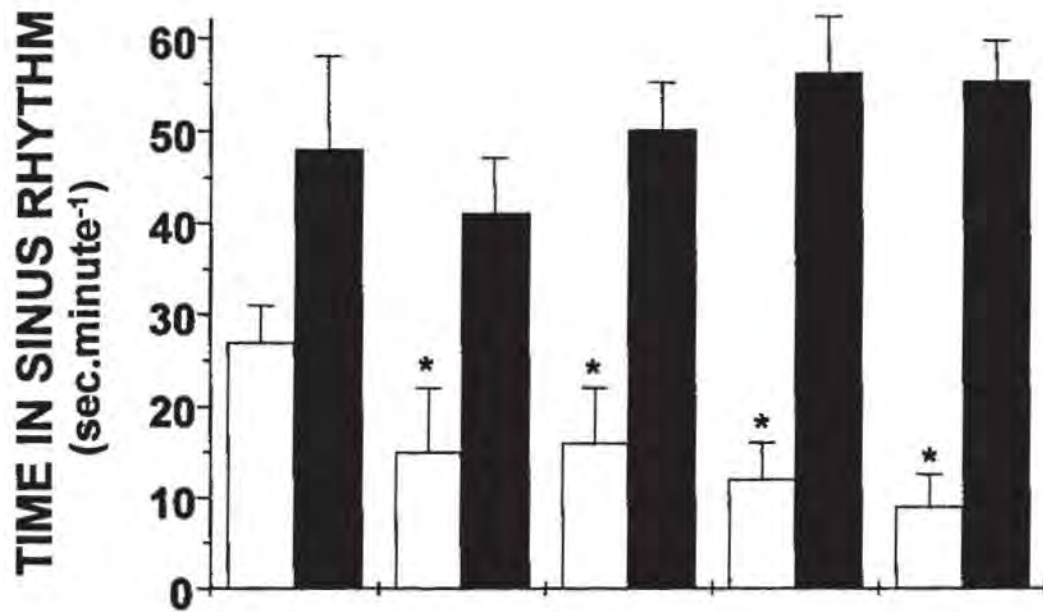
B



**SYSTEMIC ARTERIAL PRESSURE
(mmHg)**



A FIGURE 4



B

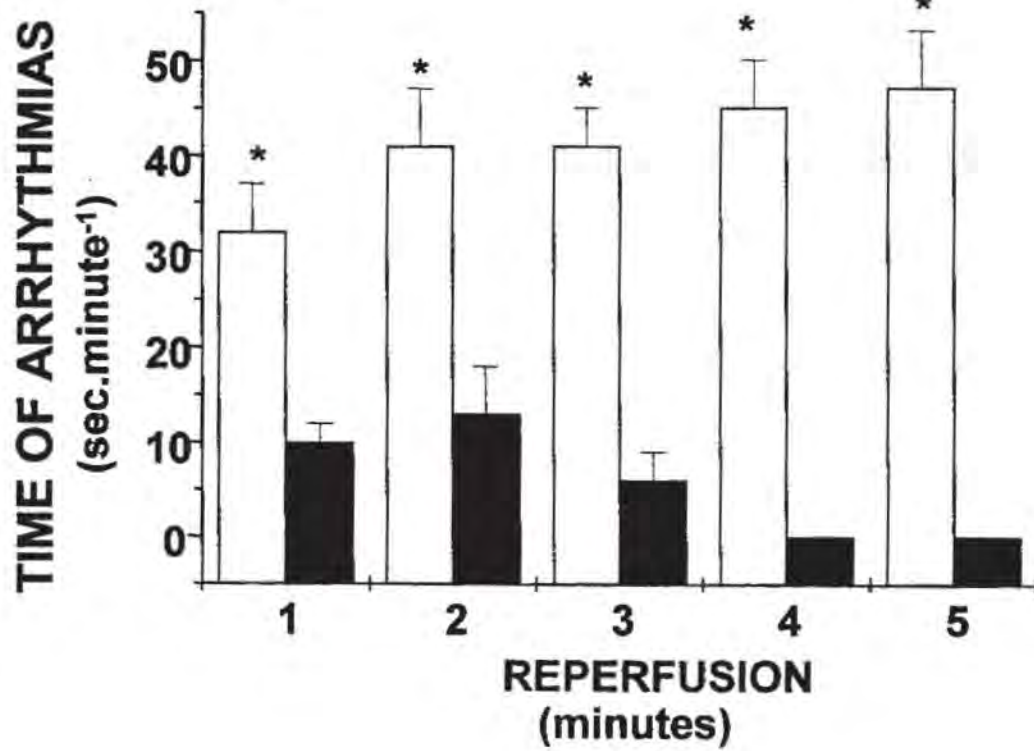


FIGURE 5

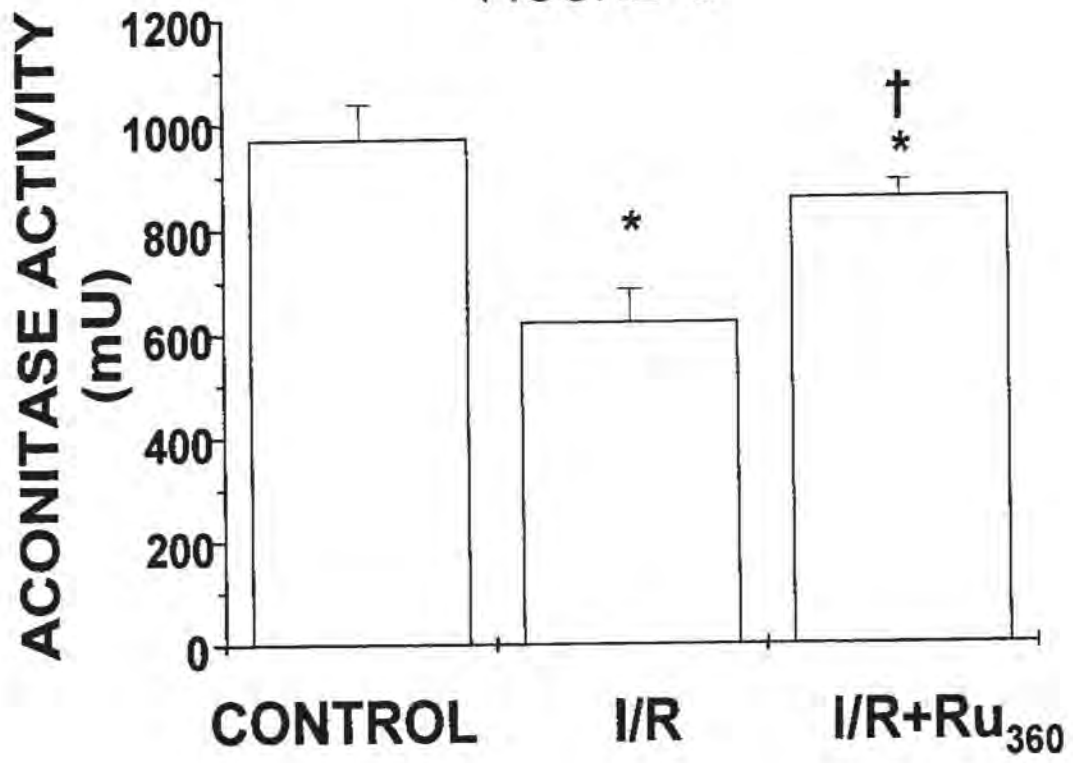


FIGURE 6

Time (sec)	INITIAL RATE		
	Control	VR	VR+Ru ₃₆₀
15	15±0.8	15±0.8	11±0.2*†
30	36±0.8	35±1.3	27±1.5*†
40	52±2.5	53±3.1	34±2.6*†
60	70±5.8	60±8.9	55±4.6*

