

Papel de uniportador de calcio mitocondrial en la respuesta adrenérgica del miocardio

- Dr. Gerardo de J. García Rivas¹
- Dra. Cecilia Zazueta Mendizabal²
- Méd. Víctor Manuel Ocaña Arriaga³
- Méd. Evaristo Fernández Sada⁴
- Biól. Sandra Leticia Rivero Aranda⁵

Resumen

- Palabras clave

Calcio, mitocondria, uniportador, estímulo adrenérgico.

Conocer los mecanismos de consumo y producción de energía en el corazón es esencial para entender los procesos fisiopatológicos en el sistema cardiovascular. El presente estudio aporta información a la correlación que existe entre el trabajo cardiaco con el metabolismo mitocondrial, y cómo el transporte del Calcio (Ca^{2+}) en la mitocondria participa en estos mecanismos.

Se estudió la respuesta adrenérgica en presencia y ausencia Ru360 (inhibidor específico de la entrada de Ca^{2+} mitocondrial). Se observó que dosis crecientes de Ru360 inhiben el consumo de oxígeno y el trabajo cardiaco, la relación entre estos parámetros fue lineal. En presencia de norepinefrina, se observó un incremento superior al doble del trabajo cardiaco en corazones controles; sin embargo, en los corazones tratados con el inhibidor, dicha respuesta solamente fue del 18%. La medición de la actividad de la piruvato deshidrogenasa (para estimar la concentración de calcio mitocondrial) mostró un aumento de 3 veces después del estímulo adrenérgico en corazones controles, no así en los corazones tratados con Ru360. Este trabajo demuestra que la inhibición del transporte del calcio en la mitocondria produce efectos sobre el acoplamiento entre el metabolismo oxidativo y el trabajo cardiaco. Los hallazgos soportan la hipótesis de que el calcio intramitocondrial es un orquestador del suministro y la demanda energética durante la estimulación hormonal.

Introducción

En condiciones de reposo, el gasto cardiaco normal en un varón sano es en promedio de 5.6 litros por minuto; sin embargo, durante el ejercicio o el estrés, en el que el sistema simpático es activado, el bombeo del corazón puede ser del doble o el triple al aumentar la frecuencia cardiaca y la fuerza de contracción. Además, es bien conocido que el gasto cardiaco en todo momento es dependiente de la producción de energía.¹

En el corazón se ha postulado que el Ca^{2+} intracelular es un orquestador que regula la demanda y la producción de energía.² Durante la activación simpática, las proteínas encargadas de la relajación y contracción miocárdica son las principales consumidoras de ATP (i.e. la Ca^{2+} -ATPasa de miosina, la Ca^{2+} -ATPasa de retículo sarcoplásmico, la Ca^{2+} -ATPasa del sarcolema, la Na^+/K^+ -ATPasa).³ En este sentido, se ha demostrado que el total del ATP celular se consume en segundos en el corazón bajo estimulación adrenérgica.⁴

El principal sitio de producción de energía son las mitocondrias, que en los cardiomiocitos ocupan aproximadamente el 30% del volumen celular y están localizadas en cercanía a los sitios de consumo energético (i.e. los miofilamentos contráctiles, retículo sarcoplásmico y los túbulos-T).

Por otro lado, la producción de energía en la mitocondria también es regulada por Ca^{2+} intracelular. El metabolismo oxidativo depende de la disponibilidad de electrones en la cadena respiratoria (el estado redox del NADH/NAD); dado que el NADH es producido por el ciclo de Krebs y las enzimas moduladoras de esta vía son activadas por Ca^{2+} , se ha determinado que este catión estimula la síntesis de ATP (ver Figura 1).^{5,6}

¹ Centro de Innovación y Transferencia en Salud de la Escuela de Medicina del Tecnológico de Monterrey.

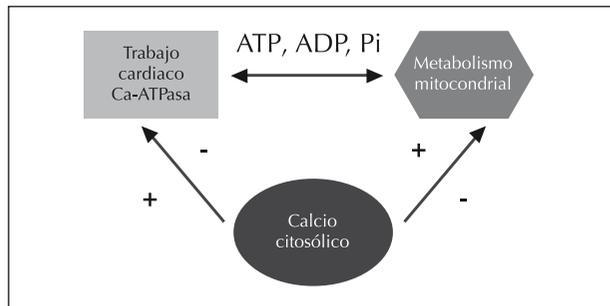
Cátedra de Cardiología y Medicina Vascular. Instituto de Cardiología y Medicina Vascular del Tecnológico de Monterrey.

² Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". México D. F.

^{3, 4, 5} Centro de Innovación y Transferencia en Salud de la Escuela de Medicina del Tecnológico de Monterrey.

Cátedra de Cardiología y Medicina Vascular.

Figura 1. Relación entre el gasto cardiaco y el metabolismo mitocondrial



El modelo plantea que el calcio citosólico puede modular de forma paralela el gasto cardiaco 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 Krebs, la ATP sintetasa y el translocador de adenín nucleótidos. Como se observa en la figura, la relación entre el gasto cardiaco y el metabolismo es sostenida por la concentración de metabolitos energéticos, es proporcionada por la mitocondria.

Un prerrequisito para la activación de metabolismo oxidativo producida por Ca^{2+} es la cantidad que de este elemento ingresa a la mitocondria, y si este aumento es suficiente para activar a las deshidrogenasas de ciclo de Krebs. El sistema de transporte de Ca^{2+} mitocondrial está mediado por 2 mecanismos separados: el de entrada, a través de un uniportador (UCam) que facilita el movimiento de Ca^{2+} a favor de su gradiente electroquímico y el de salida, que se lleva a cabo mediante el intercambio con Na^{+} o H^{+} .⁷

Estudios previos de este grupo han mostrado que la perfusión intravenosa del complejo dinuclear de rutenio (Ru360, un inhibidor del UCam) es capaz de inhibir en el miocardio, el transporte de Ca^{2+} en la mitocondria y modificar el metabolismo oxidativo.⁸

El objetivo de este trabajo es determinar el impacto que tiene la modulación de UCam en la repuesta adrenérgica, con el fin de contribuir a la descripción de los mecanismos que controlan el consumo y la producción de energía en el corazón durante diversas demandas de gasto cardiaco (ver Figura 1).

Material y métodos

Perfusión del corazón aislado

Todos los experimentos se realizaron en corazones de rata Wistar machos con peso entre 250-300 gr, de acuerdo con las guías para el cuidado y uso de animales de laboratorio publicada por la US National

Institutes of Health. Diez minutos antes de anestesiar a las ratas se les administraron 200 U de heparina para evitar la coagulación. Pasado este tiempo las ratas se anesistiaron con pentobarbital (50 mg.Kg-1 i.p.). Se les practicó una toracotomía central, se removió 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 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 μ m, con la siguiente composición (mM): 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 presión intraventricular se determinó introduciendo un balón 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 se canuló y conectó a una cámara cerrada para medir la concentración de oxígeno en el eluyente coronario, por medio de un electrodo tipo Clark. La velocidad de consumo de oxígeno se calculó como la diferencia de concentración entre la solución de perfusión antes de pasar por el tejido cardiaco, y la concentración en el eluyente coronario.⁹ El trabajo cardiaco (gasto cardiaco en esta preparación) se determinó como el producto de la frecuencia cardiaca por la presión intraventricular.

Síntesis de Ru360

El $(\mu-O)[(HCO_2)(NH_3)Ru]_2Cl_3$ (Ru360) se sintetizó de acuerdo con el método descrito por Ying y cols.¹⁰ Se formaron diferentes compuestos aminados de rutenio como resultado de la reacción de $RuCl_3$ (Aldrich Chem Co.) con NH_4OH . Los compuestos formados se separaron por cromatografía de intercambio catiónico, utilizando un gradiente de 0.2 a 0.6 mM de formiato de amonio. Las fracciones eluidas en aproximadamente 0.4 mM 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. La concentración de Ru360 se determinó por medio de su coeficiente de extinción molar ($\epsilon_{360} = 2.6 \times 10^4$ mol.l-1.cm-1).

Actividad de la piruvato deshidrogenada (PDH)

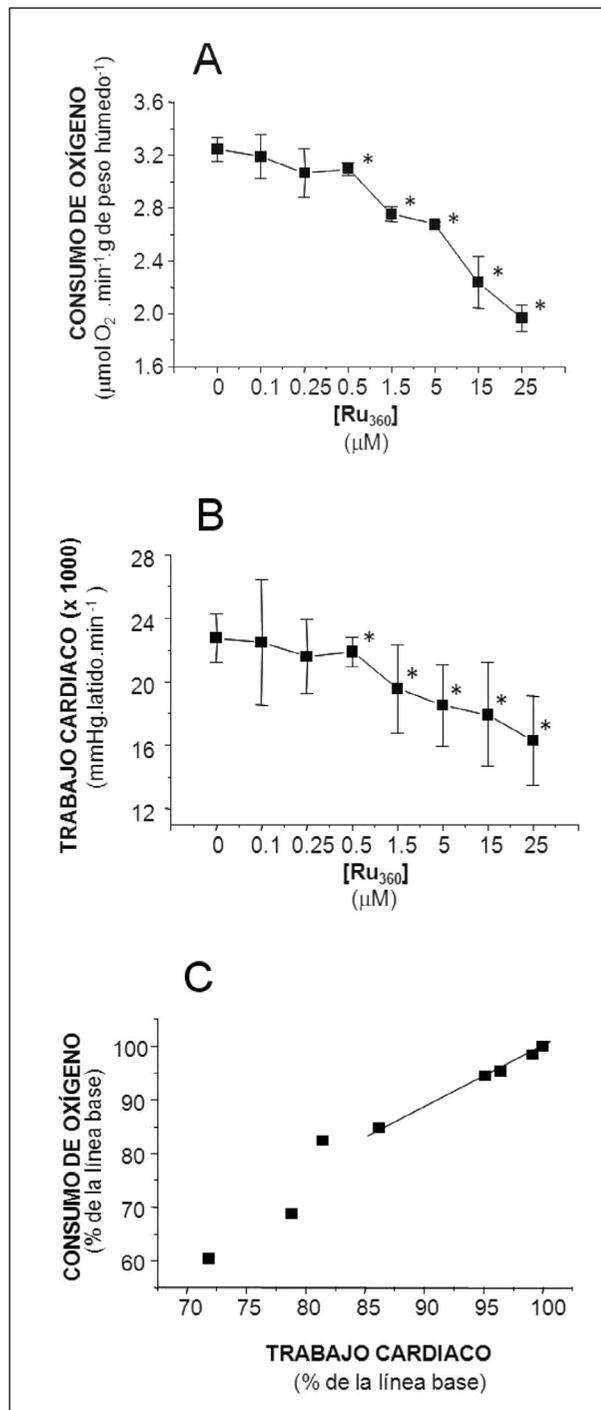
La estimación de la concentración de Ca^{2+} intramitocondrial ($[Ca^{2+}]_m$) se realizó midiendo la actividad de la PDH. Para medir esta actividad enzimática se tomó tejido homogenizado en N_2 líquido y se transfirió a una solución fría de arresto, de la siguiente composición (en mM): 50 HEPES, 3 EGTA, 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, evitando la interconversión de PDH activa en inactiva.¹¹ La cuantificación de la forma activa de la enzima (especie desfosforilada) se realizó midiendo el aumento de la absorbancia (340nm) que acompaña la aparición de NADH acoplado a la descarboxilación de piruvato por la PDH. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry.

Resultados

Las preparaciones de corazón aislado fueron similares en todos los experimentos. En la Figura 2A se muestra el efecto que producen sobre el consumo de oxígeno, dosis crecientes de Ru360. En estas preparaciones se determinó una velocidad de respiración basal de $3.25 \pm 0.1 \mu\text{molO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}$ de peso húmedo⁻¹, dicho parámetro disminuyó significativamente ($P \geq 0.05$) por la perfusión $0.5 \mu\text{M}$ de Ru360. En concentraciones altas del inhibidor la respiración del corazón aislado se inhibió 40% ($25 \mu\text{M}$) mostrando un comportamiento dosis dependiente. En el panel B se observa el trabajo cardiaco de los mismos corazones, con un valor de $22.7 \pm 1.42 \times 1000 \text{ mmHg} \cdot \text{latido} \cdot \text{min}^{-1}$ en condiciones basales. En presencia de concentraciones crecientes de Ru360 este parámetro disminuyó significativamente desde la dosis de $0.5 \mu\text{M}$. En concentraciones altas del inhibidor, el trabajo cardiaco disminuyó 20% ($15 \mu\text{M}$). El panel C muestra la relación porcentual normalizada del trabajo cardiaco y el consumo de oxígeno. En esta correlación se determinó que a bajas concentraciones del inhibidor (80 a 100% de la actividad) la correlación entre el metabolismo y el gasto cardiaco es lineal.

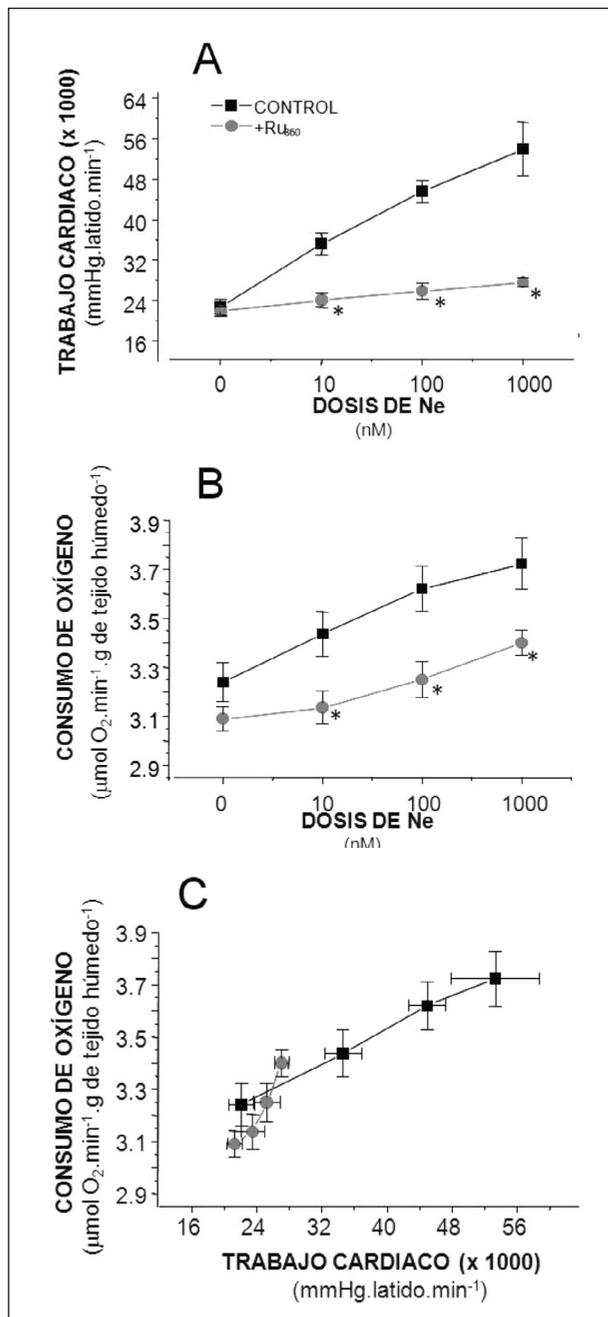
La Figura 3A muestra que los corazones controles aumentan hasta 2.3 veces el trabajo cardiaco en presencia de Ne ($1 \mu\text{M}$). Sin embargo, en los corazones previamente tratados con Ru360 el trabajo sólo se estimula un 18%. En el panel B de la Figura 3 se muestra el aumento del consumo de oxígeno por efecto del agonista adrenérgico. En los corazones controles este parámetro aumentó aproximadamente 15% ($1 \mu\text{M}$); pero en los corazones tratados con el inhibidor, el consumo de oxígeno sólo aumentó 9%. En la Figura

Figura 2. Efecto del Ru360 sobre la relación entre el metabolismo energético y el trabajo cardiaco



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 cardiaco. El panel C muestra la relación entre estas dos variables. Las diferentes concentraciones de Ru360 se perfundieron en corazones aislados por 30 minutos antes de determinar las variables. Los valores representan la media \pm ES de al menos 3 diferentes experimentos. * $P \geq 0.05$ vs. Control.

Figura 3. Efecto del Ru360 sobre la relación entre el metabolismo energético y el trabajo cardíaco en condiciones de estimulación adrenérgica

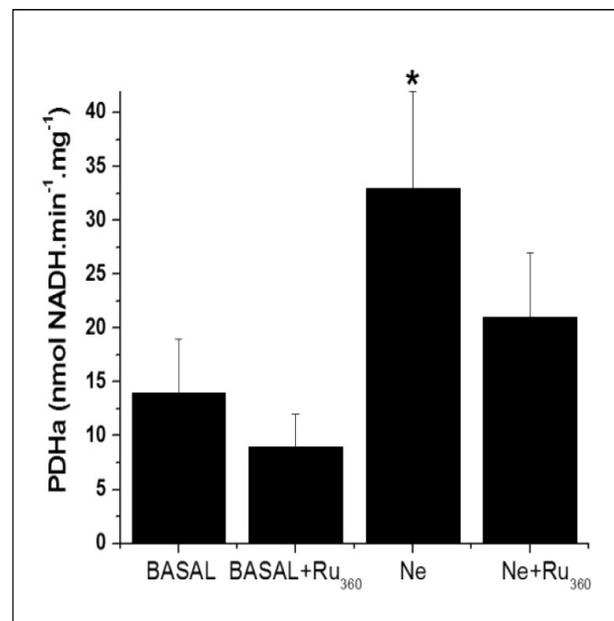


El panel A muestra el efecto de concentraciones crecientes de norepinefrina (Ne) sobre el consumo de oxígeno (respiración mitocondrial) de corazones controles (■) y tratados con Ru360 (●). El panel B muestra el efecto sobre el trabajo cardíaco. El panel C muestra la relación entre los parámetros anteriores. La concentración utilizada de Ru360 fue 0.5 µM. La perfusión de Ne se llevó a cabo 30 minutos después de la perfusión con Ru360 en los corazones tratados y en el mismo intervalo en los controles. Los valores representan la media ± ES de al menos 3 diferentes experimentos. *P≥0.05 vs. Control.

3C se observa la relación entre el trabajo cardíaco y el consumo de oxígeno. En los corazones controles se determinó que existe linealidad y acoplamiento de ambos parámetros, mientras que en los corazones tratados con Ru360, dicha correlación se desplazaba hacia el metabolismo oxidativo. Para estimar la concentración de $[Ca^{2+}]_m$ en los protocolos anteriores, se utilizó la medición de la actividad de piruvato deshidrogenasa activa (PDHa) en homogenizados de corazón (después de la estimulación adrenérgica). La PDHa es activada por una fosfatasa sensible a Ca^{2+} mitocondrial;¹² 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.

La actividad basal de la PDHa aumentó tres veces en los corazones estimulados con Ne. La actividad basal de los corazones tratados con Ru360 fue menor (no estadísticamente significativa) que los controles. Los corazones tratados con el inhibidor y sometidos al estímulo hormonal no mostraron diferencia significativa en la actividad de PDHa comparada con la actividad basal del grupo control (ver Figura 4).

Figura 4. Efecto de la activación adrenérgica sobre la actividad del complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDHa)



La actividad de PDHa se determinó en homogenizados de corazones aislados. La condición basal se llevó a cabo en corazones controles y tratados con Ru360 en ausencia de Norepinefrina (Ne). La dosis de Ne utilizada fue 1 µM. Los valores representan la media ± es de al menos 4 diferentes experimentos. *P≥0.05 vs. basal.

Discusión

Diversos estudios indican que la mitocondria tiene una función importante en la regulación del Ca^{2+} intracelular; sin embargo, existe mucha controversia respecto a la cantidad y la velocidad con la que el Ca^{2+} es tomado por la mitocondria. Esto se debe a que la mitocondria *in vitro* puede acumular hasta 1M de Ca^{2+} ; sin embargo, la importancia *in vivo* de este transporte se ha cuestionado, ya que en condiciones fisiológicas la concentración de Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) es cercana a 100 nM y la afinidad del UCam por el Ca^{2+} es mayor a 10 μM . En esta visión, la baja afinidad del UCam por el Ca^{2+} sugiere que la mitocondria no puede acumularlo durante la estimulación celular, dado que el aumento en el Ca^{2+} c. inducido por un estímulo hormonal rara vez excede valores de 1–2 μM .

Esta hipótesis ha sido materia intensa de debate y algunos grupos que han mostrado evidencia en contra del transporte rápido de Ca^{2+} en la mitocondria *in situ*;¹³⁻¹⁵ por otro lado, muchos reportes se oponen diametralmente 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 Ca^{2+} mitocondrial.¹⁶

Otros grupos utilizando la fotoproteína aequorina (que es sensible a la concentración de calcio, $[\text{Ca}^{2+}]$) han medido los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ después de la estimulación hormonal y han observado que ésta provoca un rápido aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_m$.¹⁷

En 1998, el grupo de Lemasters, por medio de microscopía confocal y diversos indicadores fluorescentes, observó los cambios en la concentración de Ca^{2+} en las mitocondrias de cardiomiocitos intactos. Las mitocondrias interfibrilares (cercasas al aparato contráctil) alcanzaron un pico máximo del de 522nM, pero en presencia de agonistas adrenérgicos (isoproterenol) éste aumentó a 750nM. 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 Ca^{2+} *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 sarcoplásmico forma numerosos sitios de contacto con las membranas de la mitocondria y que la apertura de los canales li-

beradores de Ca^{2+} en el retículo (receptor de rianodina, RyR) genera un “hot spot” de Ca^{2+} en la cercanía de la membrana mitocondrial. La evidencia funcional sobre la existencia de este microdominio de Ca^{2+} fue proporcionada por Sharma y cols.¹⁸ y Szalai y cols.,¹⁹ estos grupos midieron simultáneamente la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ y $[\text{Ca}^{2+}]_m$ en células cardiacas por medio de indicadores fluorescentes. Después de aplicar cafeína (agonista del RyR) observaron un rápido incremento en la concentración de Ca^{2+} , tanto del citosol como de la mitocondria, más relevante fue que estos grupos determinaron que cuando el Ca^{2+} citosólico fue “capturado” con BAPTA o EGTA (quelantes de calcio) la concentración citosólica, pero no la mitocondrial, disminuyó; sugiriendo que existe un microdominio de Ca^{2+} localizado entre el RyR y el UCam.

En este trabajo se contribuyó a esta controversia, al mostrar que la disminución del transporte de Ca^{2+} en la mitocondria tiene importantes efectos sobre el trabajo cardiaco y el metabolismo oxidativo del corazón aislado. El análisis de la relación gasto de ATP (trabajo cardiaco)/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 cardiaco (ver Figura 2).

Es importante 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. En estas condiciones sería interesante determinar algunos metabolitos energéticos, como el ATP, la fosfocreatina y el fosfato inorgánico (Pi), a fin de poder relacionar su concentración con el trabajo cardiaco.

Los resultados mostrados en la Figura 3 muestran que la inhibición del UCam impide la activación hormonal del trabajo cardiaco, de igual forma a lo que ocurre en un corazón con insuficiencia, donde existen anomalías del metabolismo oxidativo (alteraciones en los metabolitos de alta energía en el miocardio). En el corazón con insuficiencia cardiaca se han descrito múltiples defectos sobre el manejo de Ca^{2+} Intracelular,²⁰ y además se sabe que estos corazones se encuentran en un déficit energético.²¹ Los niveles totales de fosfocreatina están reducidos en pacientes con insuficiencia cardiaca y durante la progresión de la enfermedad existe un decremento en la relación fosfocreatina/ATP.²² El mecanismo estudiado sobre el déficit energético sugiere que las mitocondrias del corazón con falla presentan daños a nivel de la mem-

brana interna, menor velocidad de la respiración, defectos en la cadena respiratoria y una capacidad disminuida de fosforilación oxidativa.²³ Adicional a esto, en modelos animales de cardiomiopatía diabética se ha determinado una reducción en la velocidad de transporte de Ca²⁺ mitocondrial. Dicha reducción ha sido revertida después de un tratamiento con insulina.²⁴ La cinética del transiente de Ca²⁺ en la mitocondria se encontró alterada, sobre todo en el tiempo para alcanzar el pico máximo (time to peak), pues en cardiomiocitos de ratas controles fue 115±21ms y aumentó en las diabéticas a 182±19ms.²⁵

El grupo de Hansford utilizando un modelo de insuficiencia cardiaca identificó que la disminución del transiente de Ca²⁺ citosólico producía subsecuentemente una reducción en la acumulación de Ca²⁺ en la mitocondria (488nM en células con falla cardiaca vs. 830 nM en controles); y al igual que los corazones de este estudio tratados con Ru360 (ver Figura 4), en ese trabajo también observaron una disminución en la respiración, asociado a la reducción de la actividad de la Piruvato deshidrogenasa (PDHa) (esta enzima de la matriz mitocondrial es activada por Ca²⁺ por medio de un mecanismo de fosforilación/desfosforilación). El modelo animal de cardiopatía mostró que al activar el metabolismo mitocondrial (con piruvato) se recuperaron los parámetros hemodinámicos.²⁶ Al considerar estos hallazgos, es razonable reflexionar que la actividad del UCam puede estar alterada en la progresión de falla cardiaca.

La aproximación de este trabajo aunque es solamente farmacológica (usando el Ru360) es hasta el momento la forma disponible para manipular la concentración de calcio en la mitocondria en el órgano entero. La posibilidad de que el Ru360 tenga otros blancos moleculares, además del UCam, se ha explorado en trabajos previos de nuestro grupo,^{8,9} en donde se ha observado que la perfusión de Ru360 de 0.1nmol.L⁻¹– 5µmol.L⁻¹ no genera efectos sobre el desarrollo de fuerza contráctil, lo que indica que este inhibidor no controla los flujos de Ca²⁺ citosólico, adicionalmente este inhibidor no fue capaz de inhibir la entrada o salida de Ca²⁺ en vesículas de retículo sarcoplásmico.

Conclusiones

En este trabajo se demostró que la inhibición del UCam produce efectos sobre el acoplamiento entre el metabolismo oxidativo y el trabajo cardiaco. Los hallazgos de este estudio soportan la hipótesis de que el Ca²⁺ citosólico es un orquestador del suministro y la demanda energética durante la estimulación hor-

monal. Adicionalmente, este 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 [Ca²⁺]_m en la homeostasis energética en el corazón en condiciones fisiológica y patológicas, por ejemplo en la falla cardiaca.

Reconocimientos

El presente trabajo se realizó mediante al apoyo parcial del donativo 46456-M del CONACYT a C.Z. y la Cátedra de Cardiología y Medicina Vascular del Tecnológico de Monterrey al Dr. Gerardo de J. García Rivas. El Dr. Víctor M. Ocaña es becario de posgrado de la Cátedra de Cardiología y Medicina Vascular.

Referencias bibliográficas:

1. A.C. Guyton, J.E. Hall, Músculo cardiaco; el corazón como bomba. En Tratado de fisiología medica. A.C. Guyton, J.E. Hall. McGraw-Hill Inc. 9ª Edición México, 1997, pp 115-137.
2. R.S. Balaban, H.L. Kantor, L.A. Katz, R.W. Briggs, Relation between work and phosphate metabolite in the in vivo paced mammalian heart, *Science*, 232 pp. 1121–1123. 1986.
3. D.M. Bers, Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415(6868) pp.198-205. 2002.
4. R.S. Balaban. Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium. *J Mol Cell Cardiol*. 34(10) pp. 1259-71. 2002.
5. P.R. Territo, V.K. Mootha, S.A. French, R.S. Balaban. Ca²⁺ activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F(0)/F(1)-ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol*, 278(2) pp. C423-35. 2000.
6. R.M. Denton, J.G. McCormack, Ca²⁺ as a second messenger within mitochondria of the heart and other tissues, *Annual Review Of Physiology*, 52 pp. 451–466. 1990.
7. T.E. Gunter, D.R. Pfeiffer, Mechanisms By Which Mitochondria Transport Calcium. *Am J Physiol*, 258 pp. 755-86. 1990.
8. G. de J. Garcia-Rivas, K. Carvajal, F. Correa, Zazueta C. Ru360, a specific mitochondrial calcium uptake inhibitor, improves cardiac post-ischaemic functional recovery in rats in vivo. *Br J Pharmacol*. 149(7) pp. 829-37. 2006.
9. G. de Jesus Garcia-Rivas, A. Guerrero-Hernandez, G. Guerrero-Serna, Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter by the oxo-bridged dinuclear ruthenium amine complex (Ru360) prevents from irreversible injury in postischemic rat heart, *FEBS J*, 272(13) pp. 3477-88. 2005.
10. W.L. Ying, J. Emerson, M.J. Clarke, et.al. Inhibition of mitochondrial calcium ion transport by an oxo-bridged dinuclear ruthenium ammine complex. *Biochemistry*. 30 pp 4040-52. 1991.
11. R.G. Hansford, L. Cohen, 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*, 191 pp. 65-81. 1978.
12. C. Maack, B. O'Rourke. "Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetic, *Basic Res Cardiol*, 102(5) pp. 369-92. 2007.
13. R.A. Bassani, J.W. Bassani, D.M. Bers. Mitochondrial and Sarcolemmal Ca²⁺ Transport Reduce [Ca²⁺]_i during caffeine

- contractures in rabbit cardiac myocytes. *J Physiol.* 453 pp. 591-608. 1992.
14. K.R. Sipido, W.G. Wier. Flux of Ca²⁺ across the sarcoplasmic reticulum of guinea-pig cardiac cells during excitation-contraction coupling. *J Physiol.* 435 pp. 605-30. 1991.
15. Z. Zhou, M.A. Matlib, D.M. Bers. Cytosolic and mitochondrial Ca²⁺ signals in patch clamped mammalian ventricular myocytes. *J Physiol.* 507 pp. 379-403. 1998.
16. S.A. Thayer, R.J. Miller. Regulation of the intracellular free calcium concentration in single rat dorsal root ganglion neurons in vitro. *J Physiol.* 425 pp. 85-115. 1990.
17. R. Rizzuto, A.W. Simpson, M. Brini, T. Pozzan. Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature.* 358pp. 325-7.1992.
18. V.K. Sharma, V. Ramesh, C. Franzini-Armstrong, S.S. Sheu. Transport of Ca²⁺ from sarcoplasmic reticulum to mitochondria in rat ventricular myocytes. *J Bioenerg Biomembr.* 32 pp. 97-104. 2000.
19. G. Szalai, G Csordas, B.M. Hantash, A.P. Thomas, G. Hajnoczky. Calcium signal transmission between ryanodine receptors and mitochondria. *J Biol Chem.* 275pp. 15305-15313.2000.
20. D.M. Bers. Altered cardiac myocyte Ca²⁺ regulation in heart failure. *Physiology (Bethesda).* 21 pp.380-7. 2006.
21. R. Ventura-Clapier, A. Garnier, V. Veksler. Energy Metabolism In Heart Failure. *J Physiol.* 15 pp.1-13.2004.
22. J.S. Ingwall, R.G. Weiss. Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. *Circ Res.* 23;95(2) pp. 135-45. 2004.
23. S. Neubauer, M. Horn, M. Cramer, K. Harre, et. al. Myocardial phosphocreatine-to-atp ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation.*7;96 pp. 2190-6. 1997.
24. C.E. Flarsheim, I.L. Grupp, M.A. Matlib, Mitochondrial dysfunction accompanies diastolic dysfunction in diabetic rat heart. *Am J Physiol.* 271 pp. 192-202. 1996.
25. J. Fauconnier, J.T. Lanner, S.J. Zhang, P. Tavi, et. al. Insulin and inositol 1,4,5-trisphosphate trigger abnormal cytosolic Ca²⁺ transients and reveal mitochondrial Ca²⁺ handling defects in cardiomyocytes of ob/ob mice. *diabetes*. 54 pp. 2375-81. 2005.
26. B. J. Martin, H. H. Valdivia, R. Bünger, et.al. Pyruvate augments calcium transients and cell shortening in rat ventricular myocytes. *Am J. Physiol.* 274 pp. H8-17. 1998.

Correspondencia:

Dr. Gerardo de Jesús García Rivas

Email: gdejesus@itesm.mx