

CANALES MITOCONDRIALES DE POTASIO SENSIBLES A ATP Y CARDIOPROTECCIÓN*

Gerardo de Jesús García-Rivas

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 identificó 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 corre-

ABSTRACT

Ischemic preconditioning (IPC) is an effective strategy for reducing heart damage triggered by ischemia reperfusion. IPC consists of exposing heart to a single or multiple brief periods of ischemia before the occurrence of a 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 these type of channels are present in both the sarcolemmal and the inner mitochondrial membrane of heart cells, the evidence reviewed here suggest that the mitochondrial channels and not the sarcolemma channels, contribute to the cardioprotection. The pharmacological modulation of these channels is emphasized.

KEY WORDS: Cardioprotection, mitochondrial potassium channels, diazoxide, reperfusion injury.

*Recibido: 13 de septiembre de 2005 Aceptado: 7 de febrero de 2006

Departamento de Bioquímica. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Juan Badiano 1. Sección XVI, C.P. 14080 México D.F. Teléfono 5573-2911 ext. 1465. Fax 5573-0926. Correo E. ailthamones@yahoo.com

lacionaba 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 10pS 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 CARDIO-PROTECCIÓN

La adaptación del corazón a la hipoxia crónica como estrategia de cardioprotección, resultó de una serie de estu-

dios 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 ($K_{0.5} = 0.4 \mu M$) que sobre los de sarcolemma ($855 \mu M$). 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-hidrodecanoato (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 sarcolemma 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 compliquen 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 sarcolemma. Existe un grupo de abridores de canales de K_{ATP} (e.g. cromacalim, levocromacalim, EMD60480, EMD 57970, 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

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	√	×
BMS-191095	√	×
Cromacalima	√	√
EMD60480, EMD57970	√	√
Pinacidil	√	√
KRN2391	√	√
Sulfato de minoxidil	√	√
Sildenafil	√	√
Isoflurano	√	√
Apricalima	√	√
MCC-134	×	√
Levosimendan	√	√
Bloqueadores de canales de K		
5-Hidroxicanoato (5-HD)	√	c
MCC-134	√	×
Glibenclamida, glipizida, glisoxepida	√	√
Glimepirida	d	√
HMR1098 (1883)	e	√

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; (×) 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).

los bloqueadores, la glibenclamida actúa sobre ambos y 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 las 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 cé-

lulas 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 esas condiciones, i.e. [ADP]=1mM 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

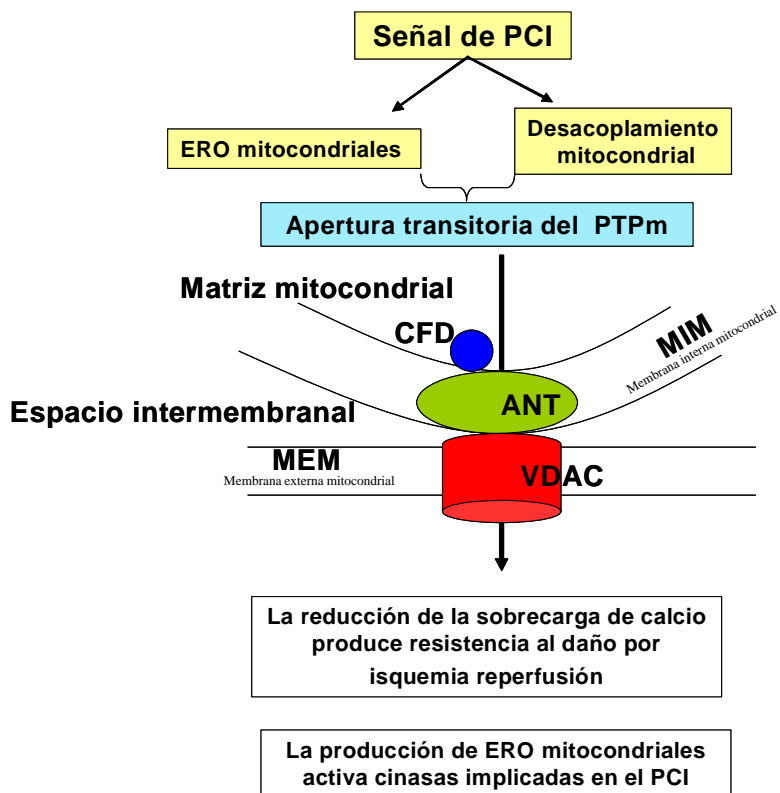


Figura 1. Esquema hipotético en el que un estado transitorio de baja conductancia del PTPm, puede producir PCI. La estructura del PTPm incluye al canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), el translocador de adenín nucleótidos (ANT) y la ciclofilina D (CFD). El PCI y los abridores de canales $mitK_{ATP}$ 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 la referencia 18).

daño irreversible a las células cardiacas 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 (PTPm), es un megacanal de gran conductancia (~120 pS) que tiene múltiples estados de subconductancia y un diáme-

tro de poro de ~2nm (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 del 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 1.

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 al 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 (translocador de adenín nucleótidos), 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 el 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) (Fig. 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-reperusión en el corazón. Sin embargo, falta comprender con mayor detalle los mecanismos que producen su efecto protector durante la reperusión 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.

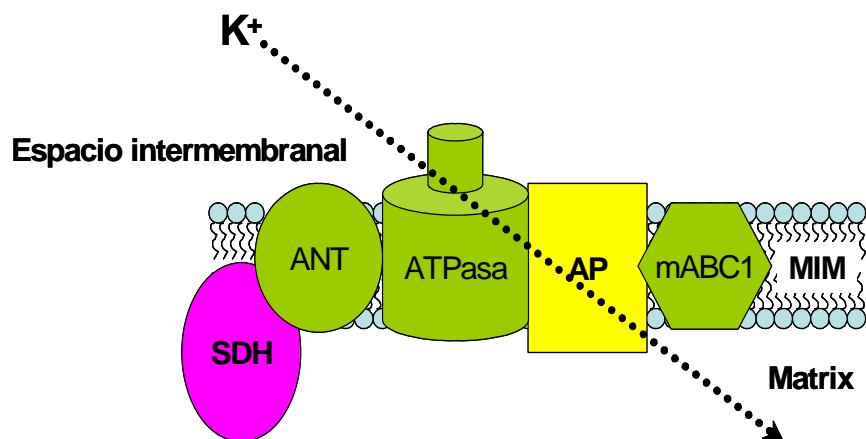


Figura 2. Representación esquemática del supercomplejo mitocondrial que presenta actividad de canal mitK_{ATP} . El complejo contiene al menos cinco proteínas: la proteína mABC1 (por su nombre en inglés ATP-binding cassette protein 1), el translocador de adenín nucleótidos (ANT), la ATP sintetasa (ATPasa),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

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, Kupersmidt 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* 55:583-6.
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, Krofta 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 B A, 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-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 361:445-51.
11. D'hahan 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* 272:3477-88.
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, Gono 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 D C, 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* 101:11880-5.