



Universitat
Autònoma
de Barcelona



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE MEDICINA
DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA, DE TERAPÈUTICA I DE
TOXICOLOGIA

EFFECTOS DE LA SUBSTITUCIÓN DE CONEXINA 43 POR CONEXINA 32 EN LA TOLERANCIA A LA ISQUEMIA Y EN LA PROTECCIÓN POR PRECONDICIONAMIENTO EN CORAZONES AISLADOS DE RATÓN

Memoria del trabajo experimental realizado por Jose Antonio Sánchez García en el Laboratorio de Cardiología Experimental del Institut de Recerca del Hospital Vall d'Hebron bajo la dirección de los Drs. Antonio Rodríguez Sinovas y David García-Dorado García y con la tutoría de la Dra. Elisabet Vila.

Mayo del 2010

Jose Antonio Sánchez García

Los Doctores Antonio Rodríguez Sinovas y David García-Dorado García certifican que el trabajo experimental con título: **“Efectos de la substitución de conexina 43 por conexina 32 en la tolerancia a la isquemia y en la protección por preconditionamiento en corazones aislados de ratón”** ha sido realizado por Jose Antonio Sánchez García bajo su dirección y con la tutoría de la Dra. Elisabet Vila. Este trabajo se presenta para obtener los 12 créditos del periodo de investigación dentro del programa de doctorado de Farmacología, impartido por el Departamento de Farmacología, de Terapéutica y de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Barcelona, Mayo del 2010

Firmado,

Autor:
Jose Antonio Sánchez García

Directores: Dr. Antonio Rodríguez Sinovas Dr. David García-Dorado Tutora: Dra. Elisabet Vila

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	página 1
RESUMEN.....	página 2
INTRODUCCIÓN.....	página 3
Papel de la conexina 43 en la fisiopatología de la isquemia-reperusión.....	página 4
1. Estructura, localización y regulación de la conexina 43.....	página 4
2. Papel de la Cx43 en el daño por isquemia-reperusión.....	página 6
3. Papel de la Cx43 en la protección por precondicionamiento.....	página 7
HIPÓTESIS.....	página 10
OBJETIVOS.....	página 10
MATERIAL Y MÉTODOS.....	página 11
1. Animales.....	página 11
2. Modelo de corazón aislado.....	página 11
2.1.- Preparación experimental.....	página 11
2.2.- Inmunohistología.....	página 13
2.3.- Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.....	página 13
2.4.- Espectroscopía de RMN de ³¹ P.....	página 13
3. Isquemia/Reperusión.....	página 14
3.1.- Cuantificación del daño por isquemia – reperusión: liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) y tamaño de infarto.....	página 14
3.2.- Protocolo experimental.....	página 15
4. Estadística.....	página 15
RESULTADOS.....	página 16
1. Expresión de Cx43 y Cx32 en ratones Cx43KI32.....	página 16
2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.....	página 16
3. Isquemia/reperusión.....	página 17
3.1.- Función del ventrículo izquierdo.....	página 17
3.2.- Cuantificación del daño por isquemia – reperusión...	página 19
4. Precondicionamiento isquémico y farmacológico.....	página 20
DISCUSIÓN.....	página 23
1. Efectos del reemplazo de Cx43 por Cx32 en el metabolismo del miocardio.....	página 23
2. Daño por isquemia – reperusión en ratones Cx43KI32.....	página 24
3. Protección por precondicionamiento en corazones aislados de ratones Cx43KI32.....	página 25
CONCLUSIONES.....	página 27
BIBLIOGRAFÍA.....	página 28

ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
ANOVA	Análisis de variancia
ATP	Adenosina trifosfato
Cx32	Conexina 32
Cx43	Conexina 43
Cx43^{+/-}	Ratones heterocigotos deficientes para Cx43
Dzx	Diazóxido
GJ	<i>Gap junctions</i>
HET	Heterocigotos
HOM	Homocigotos
IPC	Precondicionamiento isquémico
LDH	Lactato deshidrogenasa
LVEDP	Presión telediastólica del ventrículo izquierdo
LVdevP	Presión desarrollada del ventrículo izquierdo
MANOVA	ANOVA de medidas repetidas
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
mitoK_{ATP}	Canal de potasio mitocondrial dependiente de ATP
MPTP	Poros de transición mitocondrial
RMN	Resonancia magnética nuclear
PCr	Fosfocreatina
PKC	Proteína quinasa C
PP	Presión de perfusión
PVI	Presión del ventrículo izquierdo
ROS	Radicales libres de oxígeno
TTC	Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio
WT	Genotipo salvaje

RESUMEN

La conexina 43 es una proteína que juega un papel importante en la fisiopatología de la isquemia - reperfusión y en la señalización de la protección cardíaca. Para investigar si este papel está relacionado con las propiedades específicas de la isoforma, se utilizó un modelo transgénico *knock-in* de ratón en el cual la conexina 43 se reemplazó por la conexina 32.

La espectroscopía de RMN detectó una disminución del contenido de ATP y un aumento del lactato en ratones homocigotos Cx43KI32 ($p < 0,05$). Sin embargo, se observó una disminución en el tamaño de infarto en corazones homocigotos tras la isquemia/reperfusión (40min/60min) comparado con los valores del mismo en animales heterocigotos y de genotipo salvaje (13 y 31 % de reducción respectivamente, $p < 0,05$). Asimismo, el acondicionamiento isquémico y farmacológico redujo el tamaño de infarto en los ratones de genotipo salvaje (un 24,84 y 26,63 % respectivamente, $p < 0,05$), pero únicamente el acondicionamiento isquémico fue efectivo en ratones heterocigotos y las 2 estrategias fallaron en la protección de los corazones homocigotos Cx43KI32.

Estos resultados demuestran un efecto modulador de la conexina 43 en el metabolismo energético, en la tolerancia a la isquemia y en la protección por acondicionamiento, mediante mecanismos específicos de esta isoforma.

INTRODUCCIÓN

La cardiopatía isquémica es una de las principales causas de muerte e incapacidad en los países industrializados. La muerte de las células miocárdicas, secundaria a la oclusión coronaria aguda, es la responsable directa de la mayoría de las complicaciones que pueden causar la muerte de los pacientes que ingresan en el hospital con síndrome coronario agudo (1). Asimismo, es la principal responsable del remodelado ventricular izquierdo, la insuficiencia cardíaca y la inestabilidad eléctrica que afectan a los supervivientes durante los meses siguientes al episodio isquémico.

Tras una oclusión coronaria, la reinstauración del flujo coronario, o reperfusión, es una condición indispensable para prevenir la muerte de los cardiomiocitos isquémicos. Cuando esta reperfusión se realiza muy precozmente (antes de que hayan transcurrido aproximadamente 30 minutos de isquemia severa), se previene la muerte celular. Sin embargo, si se realiza más tardíamente, se salvará una parte del miocardio, tanto menor cuanto más retraso exista, produciéndose la muerte del resto de las células. Finalmente, cuando se realiza después de varias horas, la reperfusión no modifica apreciablemente el tamaño final del infarto. En la práctica clínica, la reperfusión se produce casi siempre demasiado tarde como para prevenir totalmente la muerte celular, pero dentro de un intervalo en el que sí que es capaz de reducir la muerte celular (2).

Está sólidamente demostrado que cuando la reperfusión se produce durante este intervalo, en el que se salva algo, pero no todo el miocardio isquémico, la muerte celular ocurre predominantemente durante los primeros minutos después de la restauración del flujo sanguíneo, en forma de necrosis, y por mecanismos desencadenados por la reperfusión. De esta forma, la aplicación de tratamientos en el momento de la restauración del flujo sería capaz de prevenir dicha muerte celular (3). No obstante, hasta ahora las numerosas estrategias ensayadas solo han demostrado su utilidad bajo condiciones experimentales. El desarrollo de tratamientos eficaces y clínicamente aplicables para la prevención de la muerte celular por reperfusión constituye un objetivo prioritario en la lucha para disminuir el impacto socio-sanitario de la cardiopatía isquémica. Sin embargo, el conocimiento actual

de los mecanismos celulares y moleculares responsables de esta muerte celular, aunque ha progresado en los últimos años, es todavía incompleto.

Los cardiomiocitos sometidos a isquemia severa presentan, además de despolarización mitocondrial y un nivel energético extremadamente bajo, un incremento notable de las concentraciones intracelulares de H^+ , Na^+ y Ca^{2+} (3). Durante los primeros segundos tras la reinstauración del flujo, las mitocondrias se repolarizan, la síntesis de adenosina trifosfato (ATP) se reanuda y el nivel energético se normaliza (4). Simultáneamente, el pH intracelular se corrige rápidamente, en parte debido a la entrada adicional de Na^+ mediante el intercambiador Na^+/H^+ y el cotransportador Na^+/HCO_3^- (3), entre otras vías. La sobrecarga de Na^+ se agrava por la alteración funcional de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, y tiene como consecuencia la entrada adicional de Ca^{2+} por el funcionamiento reverso del intercambiador Na^+/Ca^{2+} (5). A pesar de ello, la concentración citosólica de Ca^{2+} suele descender durante los primeros segundos de reperfusión, debido a que el Ca^{2+} es rápidamente secuestrado por el retículo sarcoplásmico. Sin embargo, la capacidad del retículo tiene un límite, y cuando éste se alcanza, se produce liberación y recaptación de Ca^{2+} y amplias oscilaciones cíclicas de la concentración citosólica de Ca^{2+} (3; 5). Estas oscilaciones, en presencia de ATP y en ausencia de acidosis, pueden dar lugar a una activación contráctil incontrolada, fenómeno que se denomina hipercontractura. La hipercontractura se manifiesta en cardiomiocitos aislados como un acortamiento excesivo, y en el tejido miocárdico da lugar a la rotura de la membrana celular, y a un patrón histológico conocido como necrosis en bandas de contracción (6). La rotura del sarcolema se ve favorecida por la hidrólisis del citoesqueleto, producida por la calpaína, una proteasa Ca^{2+} -dependiente, que es inhibida por la acidosis, y cuya actividad se manifiesta al corregirse ésta (7).

Papel de la conexina 43 en la fisiopatología de la isquemia-reperfusión

1. Estructura, localización y regulación de la conexina 43

Las conexinas son una familia de proteínas sarcolemales que cuentan con 4 dominios transmembrana y un extremo aminoterminal corto y otro carboxiterminal largo, ambos citosólicos (8). En el miocardio se expresa mayoritariamente la conexina 43 (Cx43). Seis moléculas de Cx43 oligomerizan

alrededor de un canal o poro central, formando un hemicanal o conexón. Dos hemicanales de dos células adyacentes se unen por sus zonas extracelulares formando un canal intercelular (9) (Figura 1).

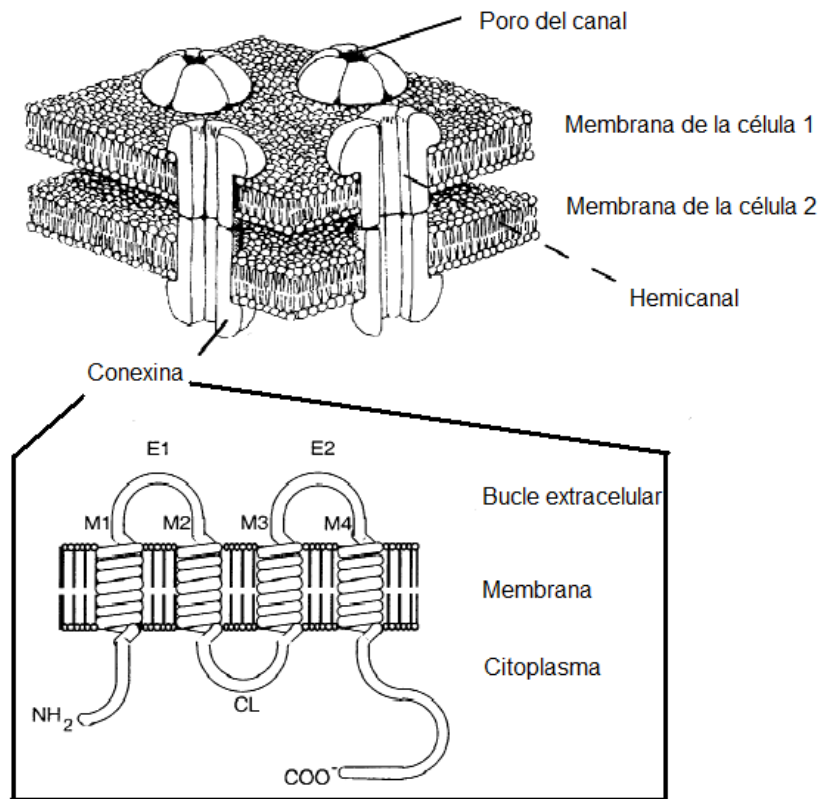


Figura 1.- Estructura general de una *Gap junction*, sus canales intercelulares y hemicanales de conexina, así como de una molécula de conexina. Modificado de (9).

Las *gap junctions* (GJ) son agregados de estos canales intercelulares que ponen en contacto el citoplasma de dos células adyacentes, permitiendo, de esta manera, la existencia de acoplamiento eléctrico y metabólico. Por tanto, las GJ juegan un papel esencial en la función cardíaca, ya que gracias a ellas se produce el flujo de iones entre cardiomiocitos adyacentes, que permite la existencia de una contracción cardíaca sincronizada (10).

Los canales de las GJ no son conductos rígidos e inespecíficos, sino que están regulados de forma muy precisa. La Cx43 ofrece varios lugares de fosforilación sobre los que actúan distintos juegos de quinasas y fosfatasa. Esto conlleva que la fosforilación sea uno de los mecanismos más importantes

para regular la probabilidad de apertura, la síntesis, el transporte o la degradación de la Cx43 (11). La mayoría de conexinas se localizan en los discos intercalares del extremo terminal de los cardiomiocitos, participando en la formación de las GJ. Asimismo, las GJ se pueden situar, aunque en menor número, en el lateral del sarcolema, propagando la actividad eléctrica en dirección transversal. Existen también hemicanales en el lateral de las células que no están conectados con otro hemicanal de la célula adyacente, de modo que conectan el espacio intracelular con el extracelular (12).

2. Papel de la Cx43 en el daño por isquemia - reperfusión

La Cx43 juega un papel importante, aunque no completamente entendido, en la fisiopatología de la isquemia - reperfusión. Por un lado, la alteración de su expresión o distribución, puede entorpecer la propagación del impulso eléctrico y favorecer la aparición de arritmias (13). Por otro lado, se ha observado en varios estudios que la comunicación intercelular por medio de las GJ participa en la propagación de la muerte celular en la isquemia - reperfusión.

Los primeros indicios de que las GJ podían jugar un papel en la progresión del daño por isquemia - reperfusión en el miocardio provienen de simulaciones por ordenador, que demostraron que para poder explicar la geometría del infarto de miocardio, era necesario la presencia de cierto tipo de interacción entre células (14). De hecho, los miocitos muertos e hipercontraídos que están presentes en el área de miocardio infartada no se encuentran distribuidos de forma aleatoria, sino que están conectados formando agrupaciones (14; 15). Estudios posteriores sugirieron que esta interacción podría ser, al menos en parte, química y mediada a través de las GJ. Así, el heptanol, un bloqueante de las GJ, fue capaz de prevenir la progresión de la hipercontractura entre cardiomiocitos adyacentes. Además, cuando se administró en el momento de la reperfusión, redujo la liberación de LDH en corazones aislados de rata y el tamaño de infarto en corazones porcinos *in situ* (16). Este efecto se ha podido relacionar con un enlentecimiento de la recuperación de la conductividad de las GJ durante la reperfusión, y es compartido por otros bloqueantes de las GJ con estructuras químicas muy diversas, como el ácido 18 α -glicirretínico, el halotano o el ácido palmitoleico

(17). El mecanismo de la propagación de la hipercontractura y de la muerte celular a través de los GJ no es el paso directo de Ca^{2+} a través de los mismos, sino el paso de sodio y su posterior intercambio por Ca^{2+} gracias al funcionamiento en modo reverso del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (18).

Más recientemente se ha propuesto que las GJ podrían actuar también sincronizando el daño celular durante la isquemia. En contra de lo que se aceptaba anteriormente, existen evidencias de que las GJ permanecen, al menos en parte, abiertas durante la isquemia prolongada (19). En esta línea, se ha descrito que el pretratamiento con heptanol antes de la isquemia reduce el tamaño de infarto en corazones aislados de conejo (20). Además, estudios realizados en ratones heterocigotos deficientes para Cx43 (Cx43^{+/-}), que presentan aproximadamente un 50% del contenido normal de Cx43, sometidos a una oclusión coronaria sin reperfusión, han demostrado una disminución del tamaño de infarto (21).

En cualquier caso, el papel de la comunicación intercelular en la propagación de la muerte celular a través de las GJ puede ser complejo, habiéndose descrito que, además de propagar el daño por isquemia - reperfusión, pueden tener, dependiendo de las condiciones, un efecto beneficioso diluyendo los cambios citosólicos producidos por diferentes maniobras (22).

Por otro lado, hasta hace poco tiempo, se creía que los hemicanales de Cx43 permanecían cerrados para evitar la muerte celular. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que estos hemicanales están estrechamente regulados, y que se abren durante la inhibición metabólica (23). Por ello se ha propuesto que los hemicanales de Cx43 podrían participar en la sobrecarga de Ca^{2+} y en la formación del edema celular que se produce durante la isquemia (24).

3. Papel de la Cx43 en la protección por preconditionamiento

El preconditionamiento isquémico (IPC) es un fenómeno que ha sido observado en numerosos modelos experimentales. Es una maniobra encaminada a conseguir un efecto protector frente a un episodio isquémico prolongado mediante la aplicación previa de episodios breves de isquemia-reperfusión (25). Las vías de señalización del IPC no son del todo conocidas,

pero engloban diferentes tipos de quinasas, incluyendo PKC ϵ y MPK38 (26). De forma importante, diferentes tratamientos farmacológicos que actúan activando la compleja cascada de señalización del IPC también han demostrado ser cardioprotectores, en lo que ha venido a denominarse preconditionamiento farmacológico (27). Interesantemente, algunas de las quinasas que actúan en el IPC, también son capaces de fosforilar la Cx43 (28).

Estudios recientes han propuesto que la Cx43 podría desempeñar un papel en la protección inducida por el IPC (25). Esta hipótesis se basó, inicialmente, en el hecho de que, en modelos experimentales, el IPC preservaba, durante la isquemia permanente posterior, los niveles de fosforilación de la Cx43 respecto a lo que ocurría en corazones control (29). Sin embargo, la demostración clara de que la Cx43 juega un papel en la protección por IPC proviene de estudios en ratones Cx43^{+/-}, ya que dichos animales no pueden ser preconditionados (30). No obstante, los mecanismos por los que la Cx43 juega un papel en esta protección no se conocen. Algunos autores han sugerido que el IPC reduciría la comunicación a través de las GJ, lo cual limitaría la propagación del daño por isquemia - reperfusión (31). Sin embargo, estudios en cardiomiocitos aislados de ratones Cx43^{+/-}, que no vuelven a formar GJ tras el aislamiento, parecen indicar que este papel es independiente de la comunicación intercelular (32).

Estudios más recientes han demostrado la presencia de Cx43 en las mitocondrias de cardiomiocitos de ventrículo izquierdo de ratones, ratas, cerdos y humanos (33). Este orgánulo intracelular juega un papel especialmente importante tanto en el daño por isquemia - reperfusión, como en la protección por IPC, en concreto, mediante la producción de radicales libres de oxígeno (ROS). Los ROS se producen, en parte, por el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa durante la isquemia - reperfusión y están involucrados en el daño miocárdico (34). Sin embargo, pequeñas cantidades de ROS mitocondriales parecen actuar como mediadores de la protección por IPC (35).

En este contexto, la localización de la Cx43 en la mitocondria es particularmente importante. Así, se ha asociado la deficiencia de Cx43 en cardiomiocitos de ratones Cx43^{+/-} con una producción disminuida de ROS en respuesta al preconditionamiento farmacológico con diazóxido (36) (Dzx), una sustancia que ejerce su efecto protector induciendo la síntesis de ROS al

actuar sobre los canales de potasio mitocondriales dependientes de ATP (mitoK_{ATP}). Además, la protección inducida por Dz_x se pierde en cardiomiocitos de ratones Cx43^{+/-} (36) (al igual que ocurría en el IPC), así como tras inhibir la translocación de la Cx43 a la mitocondria, sin alterar el contenido total de Cx43, en corazones aislados de rata (37).

Así pues, la Cx43 parece jugar un papel importante en la señalización del preconditionamiento mediada por ROS. Realzando la importancia de la Cx43 mitocondrial, estudios recientes han demostrado que modula el influjo de K⁺ mitocondrial bajo diferentes condiciones (38). Sin embargo, no se conoce si otras funciones de la Cx43, diferentes de la comunicación intercelular, juegan un papel importante en la función cardíaca en condiciones fisiológicas, en parte porque la ablación genética completa de la Cx43 es incompatible con la vida (39). Tampoco se sabe si estas posibles funciones son específicas de la Cx43 o son compartidas con otras isoformas de conexina. Además, los estudios realizados para investigar el papel de la Cx43 en el daño por isquemia – reperusión se han hecho, en su mayoría, con fármacos muy poco selectivos para Cx43 y con numerosos efectos indeseables. Para investigar estas cuestiones, se hace necesaria la utilización de un modelo transgénico de deficiencia de Cx43, pero en el que los animales sean viables. Por dicho motivo, se ha desarrollado un modelo de ratón transgénico “knock-in” en el que el gen que codifica para la Cx43 ha sido substituido por el de la Conexina 32 (Cx32) (40). Esta isoforma de conexina tiene propiedades bioquímicas y biofísicas diferentes a las de la Cx43 (41), incluyendo una menor conductibilidad y permeabilidad al K⁺ y otras moléculas.

HIPÓTESIS

La sustitución de la Cx43 por una conexina con menor permeabilidad y conductancia, como es la Cx32, en un modelo murino, provocaría una disminución del daño miocárdico por isquemia – reperfusión, al quedar limitada la propagación del daño celular, así como modificaría la protección por preconditionamiento.

OBJETIVOS

1. Averiguar el efecto de la sustitución de la Cx43 por Cx32 en la tolerancia miocárdica a la isquemia-reperfusión.
2. Estudiar la susceptibilidad a la protección miocárdica por preconditionamiento isquémico y farmacológico cuando se sustituye la Cx43 por Cx32.
3. Caracterizar las consecuencias metabólicas del reemplazo de Cx43 por Cx32 a nivel cardíaco.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales

El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Institut de Recerca del Hospital Vall d'Hebron y se desarrolló de acuerdo a la legislación Europea. Se utilizaron ratones transgénicos Cx43KI32 obtenidos del *European Mouse Mutant Archive* (EMMA). Estos animales, en los que la región codificante del gen de la Cx43 se encuentra sustituido por el de la Cx32, fueron desarrollados por Plum et al (40) usando la técnica del doble reemplazamiento. La confirmación de la sustitución genética de la Cx43 en estos mutantes se realizó mediante el análisis de PCR a partir del DNA extraído de las colas de los ratones.

Los ratones homocigotos (HOM) que expresan únicamente la Cx32 no son fértiles, por lo que para el desarrollo de la colonia se utilizaron los mutantes heterocigotos (HET), que sí son fértiles y coexpresan los alelos de la Cx43 y la Cx32. El genotipo salvaje (WT) es el que expresa la Cx43 en los dos alelos.

Los ratones transgénicos correspondientes al modelo knock-in Cx43KI32 fueron criados y mantenidos con agua y alimentos *ad libitum* en las salas de mantenimiento de ratones del estabulario del Institut de Recerca del Hospital Vall d'Hebron, sin requerir condiciones ambientales diferentes a las establecidas como estándar en el estabulario.

2. Modelo de corazón aislado

2.1.- Preparación experimental

Se utilizó el modelo de corazón aislado de Langendorff de ratón, en el que los corazones se perfunden retrógradamente mediante un tampón fisiológico oxigenado a través de la aorta.

Los ratones WT y los mutantes HET y HOM de entre 14 y 16 semanas de edad y ambos sexos, fueron sometidos a toracotomía bajo anestesia con pentobarbital sódico (1,5 g/KG, intraperitoneal). Los corazones fueron extraídos rápidamente y perfundidos en un sistema Langendorff con una solución de Krebs (en mmol/l: NaCl 118, KCl 4,7, MgSO₄ 1,2, CaCl₂ 1,8, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1,2 y glucosa 11), oxigenada (95% O₂ : 5% CO₂), con un pH de 7,4 y mantenida a 37°C. El flujo de perfusión fue constante e inicialmente se ajustó

para producir una presión de perfusión (PP) de 80-90 mmHg (en condiciones normóxicas). La presión del ventrículo izquierdo (PVI) se monitorizó con un balón de látex lleno de agua y conectado a un transductor de presión. Las señales registradas (PP y PVI) se amplificaron (*Powerlab* (ADInstruments)) y se almacenaron en soporte informático mediante el programa *Chart 5.2* (ADInstruments, Australia). El balón se introdujo en el ventrículo izquierdo y se infló para obtener una presión telediastólica del ventrículo izquierdo (LVEDP) de entre 6 y 8 mmHg. La presión desarrollada del ventrículo izquierdo (LVdevP) fue calculada como la diferencia entre el pico sistólico de la PVI y la LVEDP.

Los corazones se estimularon de manera continua usando pulsos rectangulares de 2,5 ms de duración y 4V de amplitud, a 133 ms de longitud de ciclo de base (450 latidos por minuto) mediante un estimulador programable. Para ello, se insertaron dos electrodos en el ápex cardíaco (Figura 2).

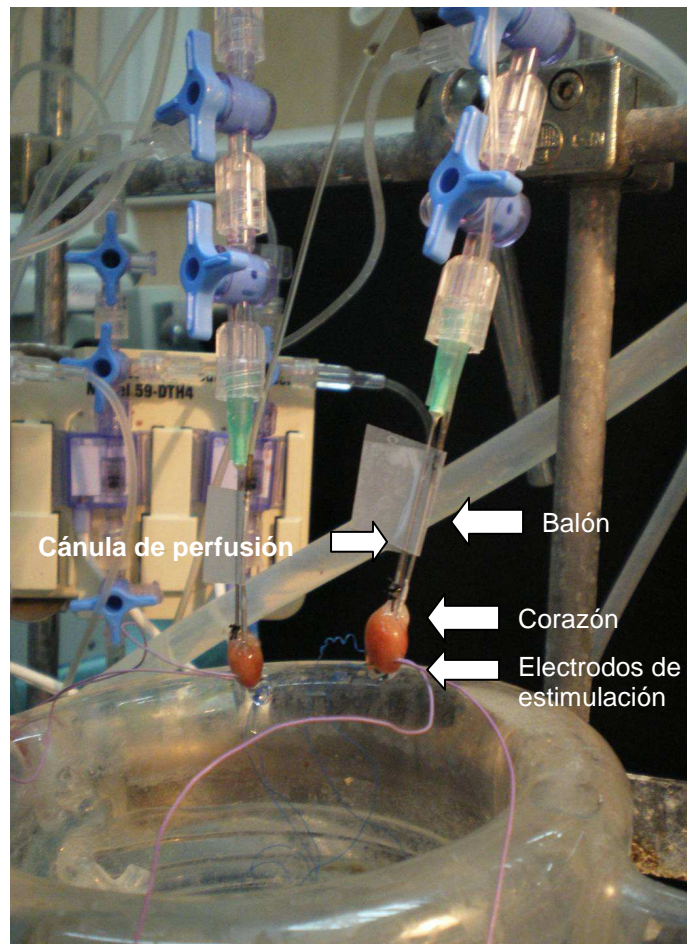


Figura 2.- Fotografía del sistema Langendorff, donde se observan 2 corazones de ratón canulados a través de la aorta, con el balón introducido en el ventrículo izquierdo y los electrodos de estimulación en el ápex.

2.2.- Inmunohistología

Un corazón normóxico de un ratón WT y otro de uno HOM fueron congelados en isopentano a -80°C . Tras la congelación, se prepararon criosecciones de $6\mu\text{m}$ que se fijaron en paraformaldehído, se permeabilizaron en 0,5% de Triton X-100, y, tras el bloqueo de las uniones inespecíficas, se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo de conejo anti-Cx43 (nº 71-0700; Zymed, Alemania; dilución 1:50) o el anticuerpo de conejo anti-Cx32 (nº C3595, Sigma, USA; dilución 1:250), ambos conteniendo también el anticuerpo de ratón anti- α -fodrin (nº AA-6, Biomol-LP, UK; dilución 1:100) para delimitar los bordes de las células. Posteriormente, las secciones se lavaron y se incubaron durante 1 hora con los anticuerpos secundarios de conejo Alexa Fluor 594 y de ratón Alexa Fluor 488 (Molecular Probes; dilución 1:200). Como control negativo, algunas muestras no se incubaron con anticuerpos primarios. La presencia y distribución de la Cx43 o la Cx32 se analizó por microscopía confocal (Olympus FluoView-1000).

2.3.- Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

La espectroscopía de RMN de ^1H de extractos de corazón (n=6 ratones de cada genotipo) se realizó tal y como se ha descrito previamente (42). De manera resumida, se obtuvieron espectros de extractos tisulares a 9,4T, en un equipo de resonancia magnética nuclear (Bruker Avance 400, Alemania). Las áreas de picos de interés se midieron por deconvolución y se compararon con las del estándar TSP (ácido 3-(trimetilsilil)-tetrauteropropiónico).

2.4.- Espectroscopía de RMN de ^{31}P

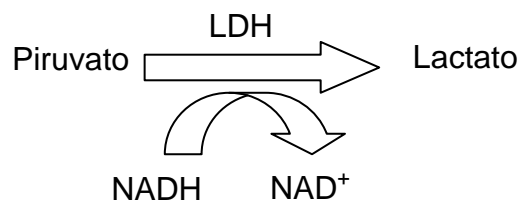
La cinética de la fosfocreatina (PCr) y del ATP fue determinada en corazones aislados perfundidos retrógradamente a través de la aorta con una solución de krebs oxigenada y sin fosfatos a 37°C (n=6). La espectroscopía de los corazones de ratones WT y HOM se realizó bajo condiciones normóxicas, tal y como se ha descrito previamente en un sistema de perfusión Langendorff (43). Los espectros consistieron en la acumulación de 1500 adquisiciones con un retraso de 0,6 s entre pulsos, con una duración total de 16 minutos. Las áreas de los picos de PCr y ATP se determinaron integrándolas con un software proporcionado por el fabricante.

3. Isquemia/reperfusión

Tras 50 minutos de perfusión normóxica, todos los corazones fueron sometidos a 40 minutos de isquemia seguidos de 60 minutos de reperfusión. Durante la isquemia, los corazones se sumergieron en una solución de Krebs hipóxica a 37°C (en mmol/l: NaCl 118, KCl 4,7, MgSO₄ 1,2, CaCl₂ 1,8, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1,2 y sacarosa 11, pH 7,4, burbujeado con 95%N₂ : 5% O₂).

3.1.- Cuantificación del daño por isquemia – reperfusión: liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) y tamaño de infarto

La cantidad de LDH liberada se determinó en muestras del efluente coronario, recogidas a diferentes tiempos durante la reperfusión, mediante espectrofotometría, tal y como se ha descrito anteriormente (17). La liberación de LDH es una medida cuantitativa de la muerte celular, ya que cuando las células se lisan, todo su contenido citoplasmático, incluyendo este enzima, es arrastrado por el efluente coronario. Este ensayo se basa en la siguiente reacción:



Para realizar esta reacción, las muestras (40 µl) del efluente coronario se diluyeron en tampón fosfato (160 µl) (en mM: K₂HPO₄·3H₂O 61,4, K₂HPO₄ 58,6) a pH 7,4 y 37°C, en presencia de NADH (310 µM) y de piruvato sódico (1 mM). La caída durante 5 minutos del valor de absorbancia a 320 nm se determinó en un espectrofotómetro de placa *SpectralIII* (SLT-Labinstruments, Austria). La concentración de LDH se calculó usando el coeficiente de absorptividad molar del NADH y se normalizó en función del peso seco del corazón, obtenido tras la deshidratación de los ventrículos a 100°C (24 horas).

Para calcular el **tamaño de infarto**, los corazones se cortaron al final de la reperfusión en secciones transversales que se incubaron en cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) (16; 17). El TTC actúa como aceptor de hidrógenos y es reducido por diversas moléculas (entre ellas el NAD⁺ y NADP⁺) que se encuentran en las células viables dando lugar a un pigmento insoluble rojo (44).

Así pues, las zonas donde hay muerte celular no se tiñen con TTC, de modo que, tras realizar fotografías de las secciones, se determinó el área infartada y se calculó el tamaño de infarto por planimetría con el programa informático *Image-Pro Plus 4.5* (Media Cybernetics, Olympus optical, Alemania).

3.2.- Protocolo experimental

La resistencia al daño por isquemia - reperfusión se evaluó en 55 corazones aislados de ratón (22 WT, 16 HET y 17 HOM) sometidos a 40 minutos de isquemia global seguida de reperfusión. El tamaño de infarto se calculó en todas las preparaciones al final de la reperfusión. La liberación de LDH y la recuperación funcional se determinó en 24 corazones (n=8 / grupo).

El efecto del reemplazo de Cx43 por Cx32 en la protección por preconditionamiento se estudió en 85 corazones (n=9-11 / grupo) no sometidos a ninguna intervención (control), o sometidos a IPC (4 ciclos de 3,5 minutos de isquemia y 5 minutos de reperfusión) o preconditionamiento farmacológico con DzX (Sigma Aldrich, Alemania) (50 μ M durante 10 minutos) antes de la isquemia-reperfusión. Además, se añadió un grupo adicional de 9 corazones de ratones HOM, a los que se pretrató con cariporide (Sigma) 7 μ M durante 10 minutos antes de la isquemia. Este grupo se usó como control positivo de cardioprotección en este genotipo, ya que es un agente protector que actúa de manera independiente de las GJ. El cariporide es un inhibidor del intercambiador Na^+/H^+ , de manera que, administrado antes de la isquemia, reduce la entrada de Na^+ en los cardiomiocitos isquémicos (45).

4. Estadística

Los datos están expresados como media \pm SEM. Las diferencias en el tamaño de infarto, la cantidad de LDH liberada acumulada durante los primeros 30 minutos de la reperfusión, la hipercontractura máxima y el tiempo de inicio del rigor se evaluaron mediante análisis de variancia (ANOVA) y Tukey. Las diferencias en la evolución de la liberación de LDH y PVI se analizaron con un ANOVA de medidas repetidas (MANOVA) seguidas del post-test Dunnett. Para evaluar los efectos del preconditionamiento en los diferentes genotipos, se utilizó un ANOVA de 2 vías. Se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Expresión de Cx43 y Cx32 en ratones Cx43KI32

Las imágenes de microscopía confocal mostraron una expresión abundante de Cx43 en corazones de ratones WT y de Cx32 en corazones de ratones HOM. No se observaron diferencias en cuanto a la distribución de ambas conexinas, estando las dos localizadas mayoritariamente en los discos intercalares (Figura 3). No se detectó ninguna señal cuando se analizaron las muestras control, es decir, sin incubación con anticuerpo primario.

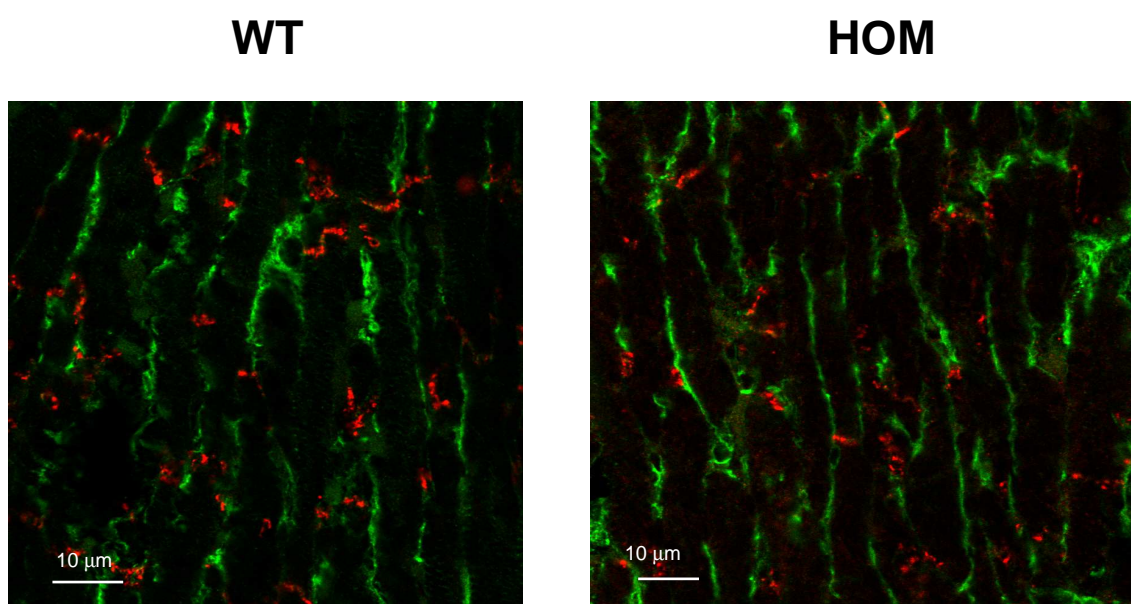


Figura 3.- Imágenes de microscopía confocal donde se observa en rojo la expresión de Cx43 (izquierda) o de Cx32 (derecha) en secciones de corazón obtenidas de ratones WT y transgénicos HOM, respectivamente. Los límites celulares se identificaron mediante la tinción con un anticuerpo dirigido contra α -fodrina (en verde).

2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

La tabla 1 muestra las concentraciones intracelulares de distintos metabolitos en corazones de ratones WT y HOM. Los corazones HOM presentaron un contenido de lactato significativamente mayor que los corazones de ratones WT, sugiriendo una glicólisis aumentada, así como una disminución de nucleótidos de ATP, indicando un metabolismo energético reducido. Estos datos fueron confirmados mediante la espectroscopía de RMN

de ^{31}P en corazones perfundidos en el sistema Langendorff, donde se observó una reducción de la relación PCr/ATP en los corazones de ratones HOM.

Tabla 1.- Concentración de los metabolitos intracelulares seleccionados (en $\mu\text{mols}/10 \mu\text{mols}$ de creatina) determinados en extractos de corazón (n=5-6), y la relación PCr/ATP, obtenida de corazones aislados de ratón

	WT (n=4-6)	HOM (n=4-6)
	Cx43/Cx43	Cx32/Cx32
Creatina total ($\mu\text{mols}/\text{mg}$ proteína)	0,94 \pm 0,08	0,81 \pm 0,07
Lactato	3,23 \pm 0,51	6,47 \pm 1,59*
Alanina	1,19 \pm 0,16	1,37 \pm 0,28
Glutamato	3,02 \pm 0,17	2,76 \pm 0,36
Succinato	0,97 \pm 0,35	1,15 \pm 0,48
Glutamina	2,63 \pm 0,08	2,77 \pm 0,19
Taurina	27,17 \pm 1,06	31,60 \pm 2,93
Glucosa	0,10 \pm 0,06	0,38 \pm 0,12
Formato	1,12 \pm 0,26	1,00 \pm 0,27
ATP	1,28 \pm 0,21	0,67 \pm 0,19*
ADP	0,74 \pm 0,11	2,22 \pm 0,37*
Relación PCr/ATP	1,29 \pm 0,05	0,77 \pm 0,12*

* ($p < 0,05$) indica diferencias significativas entre animales WT y HOM

3. Isquemia/reperfusión

3.1.- Función del ventrículo izquierdo

La aparición del rigor isquémico, detectado como un aumento brusco de la LVEDP, se observó entre los 3 y 4 minutos posteriores a la interrupción de la perfusión, sin diferencias entre grupos (Figura 4). Durante la reperfusión, los corazones de ratones WT mostraron un nuevo y marcado aumento de la LVEDP, reflejando la aparición de hipercontractura (Figura 5A). Sin embargo, la hipercontractura máxima fue significativamente inferior en los corazones de ratones HOM, aunque no en los de los HET (Figura 5B). Durante la reperfusión, la LVdevP se recuperó hasta un 10% del valor pre-isquémico, sin diferencias

entre grupos, aunque se observó una tendencia a que la recuperación sucediese antes en los animales homocigotos (Figura 5C).

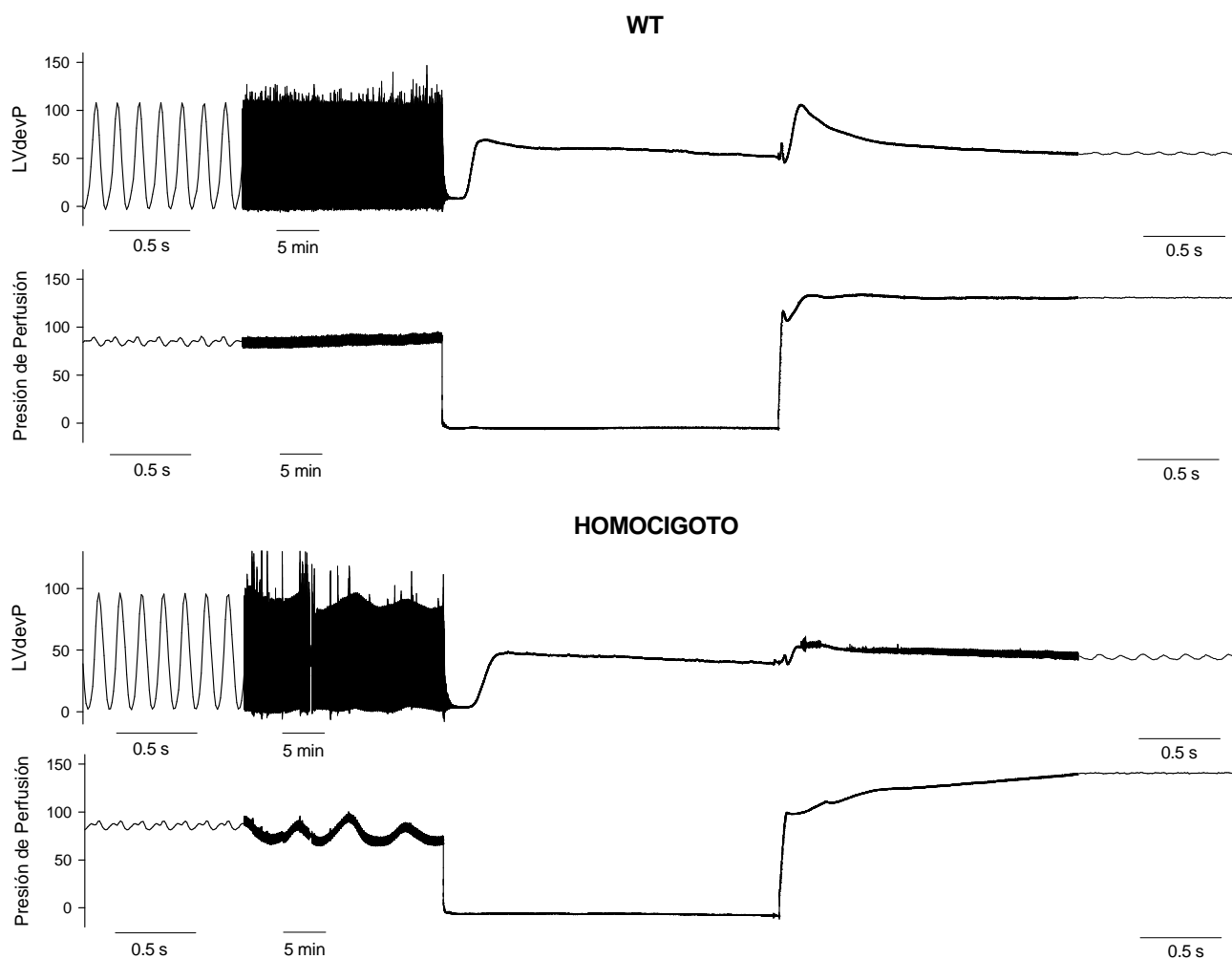
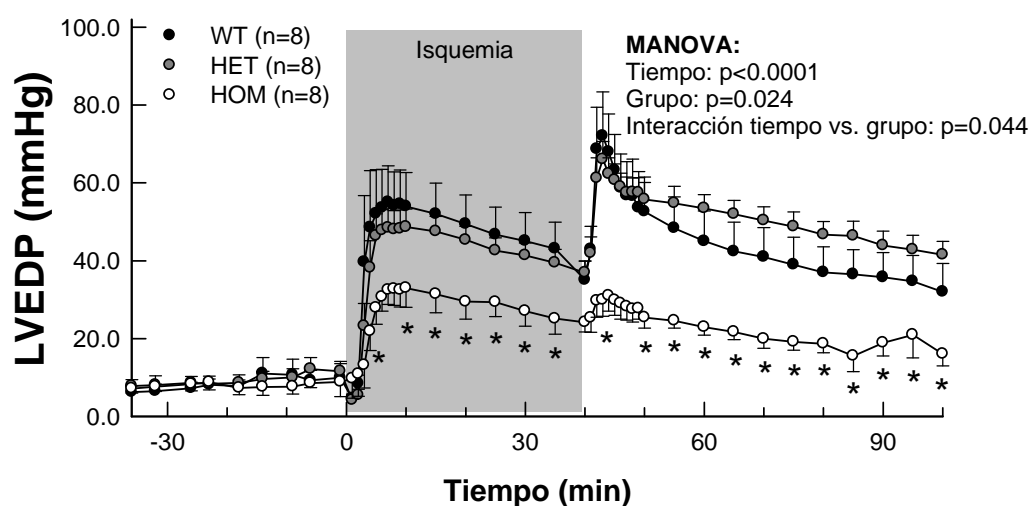
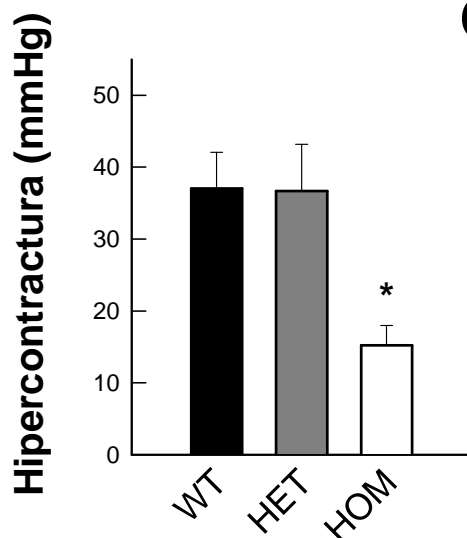


Figura 4.- Registro representativo mostrando los cambios en la presión del ventrículo izquierdo y en la presión de perfusión durante la isquemia –reperusión en un corazón de ratón WT (arriba) y HOM (abajo). Se observa el inicio del rigor como un aumento de la LVEDP al comienzo de la isquemia, y la hipercontractura como un nuevo aumento de la LVEDP al inicio de la reperusión, coincidente con un aumento de la PP.

A



B



C

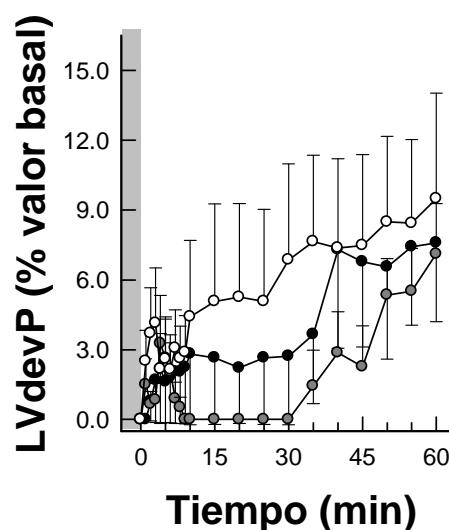


Figura 5.- (A) Cambios en la presión telediastólica de ventrículo izquierdo (LVEDP) observados en corazones aislados de ratones WT, HET y HOM sometidos a ischemia – reperfusion. (B) Hipercontractura máxima, calculada como la diferencia máxima entre el pico de la LVEDP al inicio de la reperfusion y su valor al final de la ischemia en corazones de los 3 genotipos. (C) Recuperación funcional, expresada como porcentaje respecto al valor basal de LVdevP en corazones aislados de los 3 grupos. * ($p < 0,05$) indica diferencia significativa respecto a los resultados obtenidos en animales WT.

3.2.- Cuantificación del daño por ischemia - reperfusion

La cantidad de LDH liberada durante la reperfusion y el tamaño del infarto fueron significativamente menores en los corazones de ratones HOM, que en los corazones HET y WT (Figura 6). No se observaron diferencias entre sexos en cuanto a la LDH ni al tamaño de infarto en ningún genotipo.

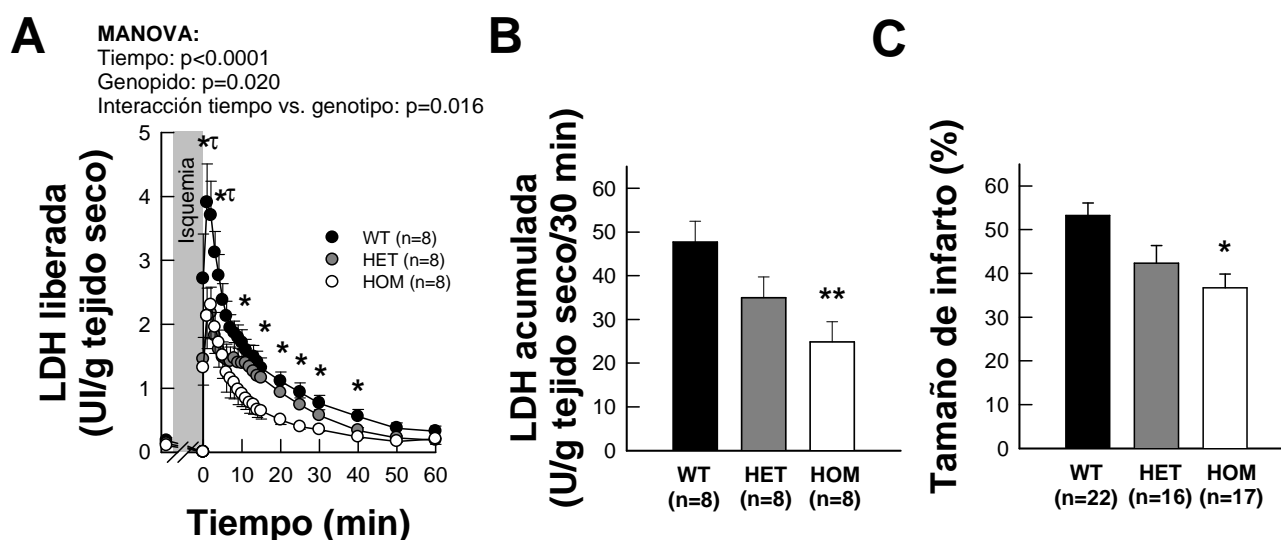


Figura 6.- (A) Liberación de LDH durante la reperfusión en corazones aislados de ratones WT, HET y HOM sometidos a isquemia – reperfusión. (B) Liberación acumulada de LDH durante los primeros 30 minutos de la reperfusión. (C) Tamaño de infarto obtenido por tinción con TTC. * ($p < 0,05$) y ** ($p < 0,01$) indican diferencias significativas entre los corazones WT y HOM. τ ($p < 0,05$) indica diferencia significativa entre los genotipos WT y HET.

4. Precondicionamiento isquémico y farmacológico

Tanto el preconditionamiento isquémico como el farmacológico con Dzx produjeron cardioprotección frente al daño por isquemia – reperfusión en los corazones de ratones WT. Esta protección se tradujo en una reducción de la hipercontractura máxima (Figura 7A), de la liberación de LDH durante la reperfusión (Figura 8A), y del tamaño de infarto (Figura 8D), así como en un incremento en la recuperación funcional al final de la reperfusión (Figura 7B). Por contra, los corazones de los ratones HET fueron protegidos únicamente por IPC, pero no por el pretratamiento con Dzx (Figuras 7-8), mientras que no se consiguió protección en los corazones de ratones HOM ni mediante el preconditionamiento isquémico ni con el farmacológico (Figuras 7-8). Sin embargo, sí se consiguió una fuerte protección en los corazones de ratones HOM tratados con caripode $7\mu\text{M}$ (infarto: $40,13 \pm 2,69$ en corazones control respecto $26,35 \pm 2,79$ % en los tratados, $p = 0,002$, test de la t de Student).

El test ANOVA de 2 vías para el tamaño de infarto, la liberación de LDH, la hipercontractura, y la recuperación funcional al final de la reperfusión, mostró un efecto significativo del genotipo en el tamaño de infarto, la liberación de LDH

y la hipercontractura (indicando una reducción del daño por isquemia –reperfusión en los corazones HOM), y una interacción entre genotipo y tratamiento significativa para la liberación de LDH y el tamaño de infarto, indicando que el grado de protección por preconditionamiento depende del genotipo.

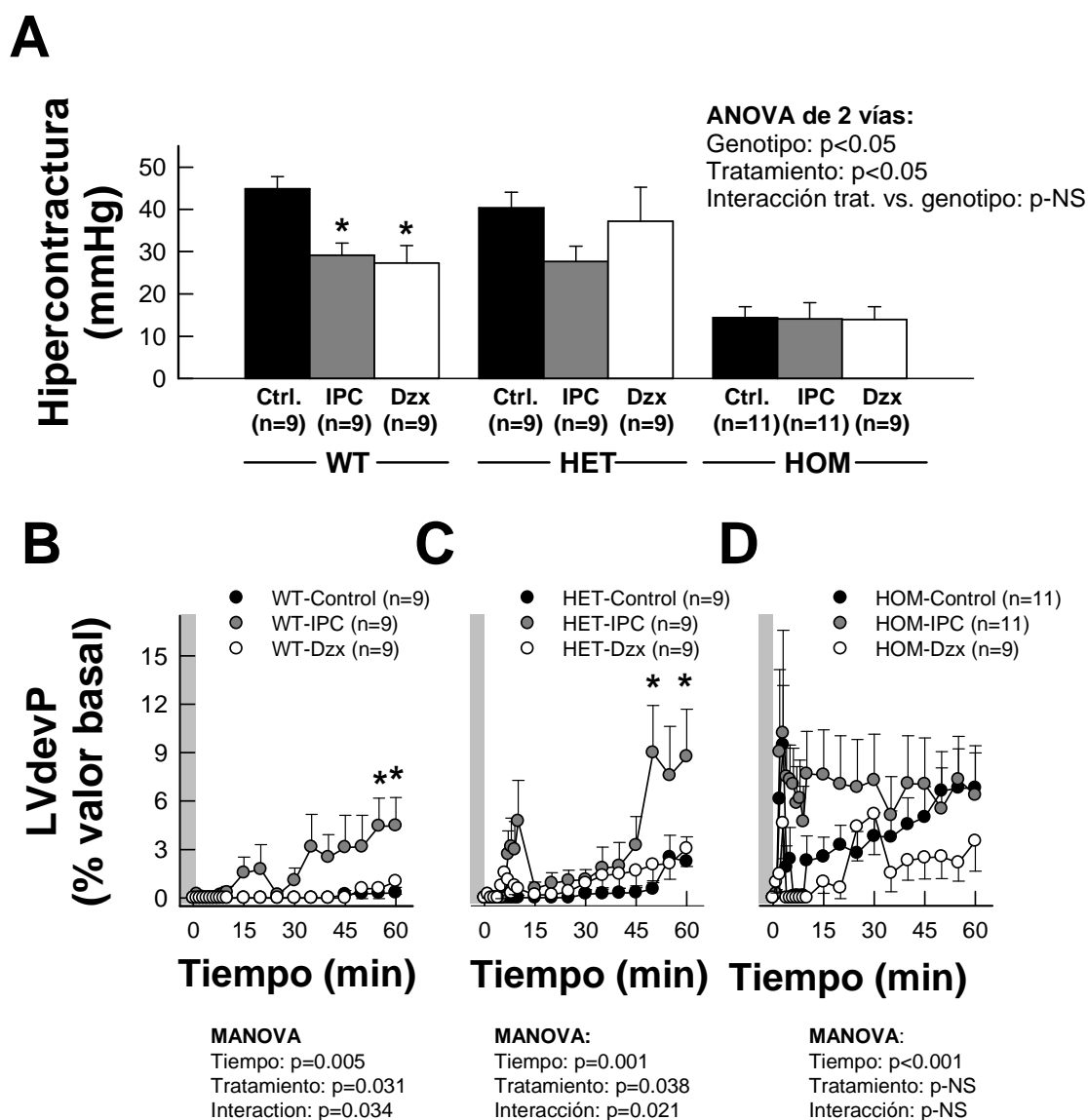


Figura 7.- (A) Hipercontractura máxima, determinada como el pico de la LVEDP durante la reperfusión, en corazones de los 3 genotipos, sin tratamiento previo a la isquemia (control), o bien tras la aplicación de preconditionamiento isquémico (IPC) o farmacológico (Dzx). (B-D) Recuperación funcional durante la reperfusión, expresada como porcentaje respecto al valor basal de la LVdevP, en corazones aislados de ratones WT (A), HET (B) y HOM (C) en los diferentes tipos de tratamientos (control, IPC y Dzx). * ($p < 0,05$) indica diferencias significativas respecto el correspondiente grupo control.

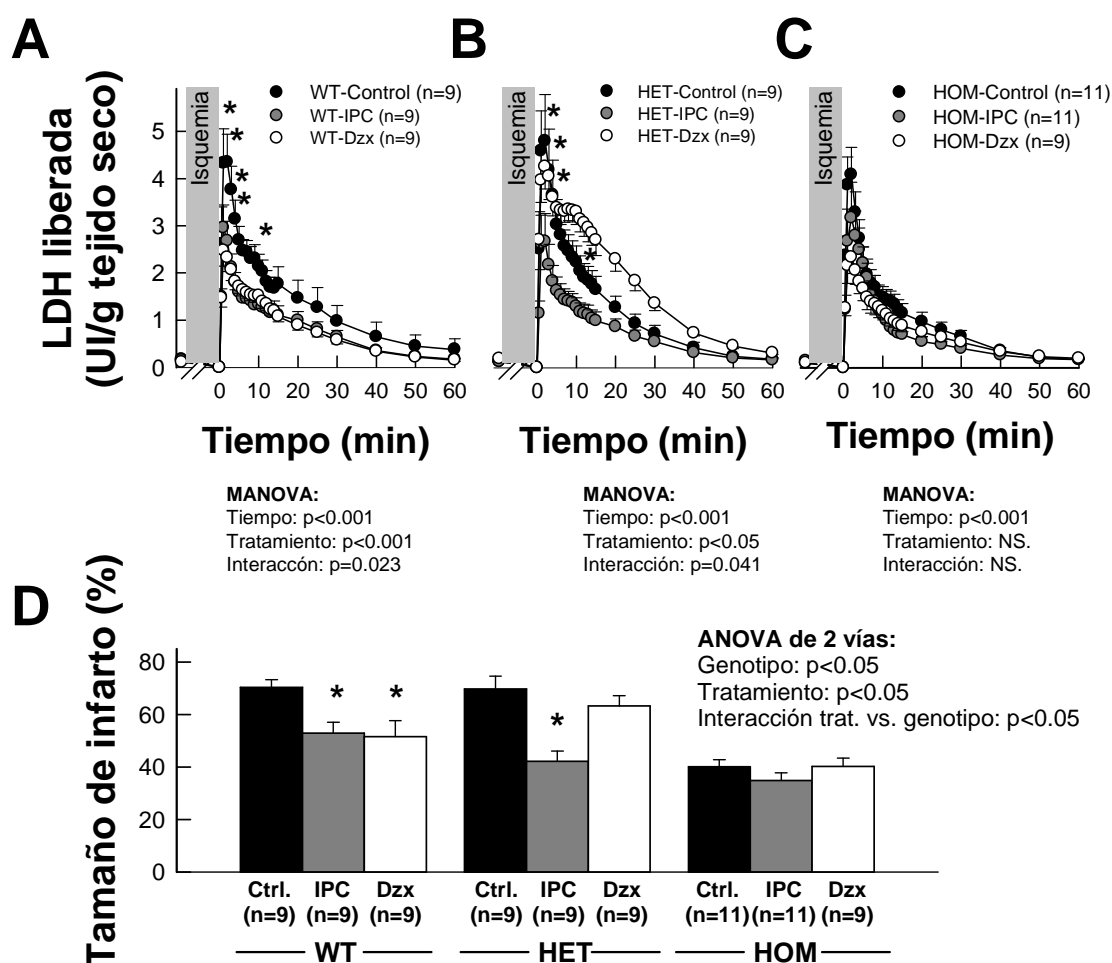


Figura 8.- Liberación de LDH durante la reperusión en corazones aislados de ratones WT (A), heterocigotos (HET) (B), y homocigotos (HOM) (C) sometidos a isquemia – reperusión en condiciones control, o bien tras la aplicación de preconditionamiento isquémico (IPC) o farmacológico (Dzx). * ($p < 0,05$) indica diferencias significativas entre los corazones del grupo control y los de preconditionamiento isquémico y farmacológico para los animales WT, y sólo frente a los del preconditionamiento isquémico para los ratones HET. (D) Tamaño de infarto, determinado mediante tinción con TTC en corazones de los 3 genotipos y tras la aplicación de los 3 tratamientos (control, IPC y Dzx). * ($p < 0,05$) indica diferencias significativas respecto el grupo control correspondiente.

DISCUSIÓN

Estudios previos han demostrado la presencia de Cx43 en la membrana mitocondrial interna de los cardiomiocitos, y que el reemplazo de la Cx43 por Cx32, una isoforma con una permeabilidad menor para diferentes moléculas y, en particular, para el potasio, en un modelo de ratón transgénico knock-in, provoca una alteración funcional de la mitocondria con un influjo de potasio disminuido en respuesta a pulsos de potasio o a DzX (38). El presente estudio caracteriza las consecuencias del reemplazo de Cx43 por Cx32 en el metabolismo energético, la tolerancia a la isquemia y la susceptibilidad al preconditionamiento. Se observó una disminución del contenido de ATP y un aumento del lactato en los ratones con la Cx43 cambiada por la Cx32 (HOM), cosa que refleja una alteración del metabolismo energético del miocardio en estos ratones. Sin embargo, estos cambios se asociaron con una mayor tolerancia a la isquemia en experimentos de corazón aislado y una incapacidad para ser protegidos por preconditionamiento isquémico o farmacológico con DzX. Estos resultados demuestran que la Cx43 tiene funciones importantes en el miocardio, que son propias de esta isoforma e independientes de la propagación del impulso eléctrico, y que modula la tolerancia a la isquemia y la protección por preconditionamiento.

1. Efectos del reemplazo de Cx43 por Cx32 en el metabolismo del miocardio

Los estudios de resonancia magnética nuclear mostraron una disminución del contenido de ATP en los ratones HOM Cx43KI32 respecto al de los corazones WT. Además, se observó una reducción de la relación PCr/ATP en los ratones HOM gracias a la espectroscopía de RMN de ^{31}P en corazones perfundidos en el sistema Langendorff. La disminución del contenido de ATP en los ratones HOM puede deberse a un impedimento en la síntesis de ATP o bien a un aumento en el consumo del mismo, aunque esta última posibilidad parece improbable, ya que no se observaron cambios en la frecuencia cardíaca ni en la temperatura de estos animales.

También se observó un aumento en la concentración de lactato en los corazones HOM. En condiciones aeróbicas, la glucosa se hidroliza a piruvato,

que se transforma a acetil-coencima A para entrar en el ciclo de Krebs. Por tanto, se puede explicar la acumulación de lactato por una reducción de la actividad del ciclo de Krebs. El flujo del ciclo de Krebs se puede reducir en diferentes condiciones que lleven a un impedimento en la regeneración de NAD^+ como por ejemplo la isquemia (46), la alteración del transportador malato-aspartato (47), o una disminución de la actividad del complejo I mitocondrial (48), entre otras. Estudios en mitocondrias de ratones heterocigotos deficientes en Cx43 han demostrado una menor tasa de respiración mitocondrial bajo sustratos del complejo I comparado con ratones WT (49). Además, se ha observado una alteración similar del complejo I de la cadena respiratoria en los animales HOM Cx43KI32 (datos no publicados hasta el momento).

2. Daño por isquemia – reperfusión en ratones Cx43KI32

El papel de la comunicación celular a través de las GJ en la propagación del daño por isquemia – reperfusión se ha demostrado en el miocardio y otros tejidos en diversas condiciones (50). Por tanto, la mayor tolerancia a la isquemia – reperfusión asociada al reemplazo de la Cx43 por la Cx32, una conexina con menor permeabilidad para el potasio y otros mensajeros intracelulares (41), podría explicarse por una reducción en la propagación del daño mediante las GJ. Sin embargo, experimentos realizados en cardiomiocitos aislados de ratones Cx43KI32 han demostrado que también existe una menor liberación de LDH tras una isquemia – reperfusión simulada, indicando que la mayor tolerancia a la isquemia – reperfusión de los ratones HOM es, al menos en parte, independiente de las GJ (51). Este incremento de la tolerancia podría parecer sorprendente, teniendo en cuenta el menor contenido de ATP observado en los ratones HOM en condiciones normóxicas o basales. No obstante, existen estudios previos que asocian una disminución del ciclo de Krebs y de la síntesis de ATP mediante la inhibición del complejo I con amobarbital, o alterando el transportador malato-aspartato, con un aumento en la resistencia a la isquemia – reperfusión (47).

Existen otros mecanismos que podrían explicar, al menos en parte, la mayor tolerancia a la isquemia – reperfusión de los ratones HOM Cx43KI32, además de los cambios metabólicos observados en los estudios de RMN. En

esta línea, hay estudios previos que sugieren que la apertura transitoria de los hemicanales de conexina en cardiomiocitos durante la isquemia podría contribuir a la sobrecarga de Ca^{2+} y a la aparición de edema celular (24). Así pues, un número o función distinta de los hemicanales de Cx32 respecto los de Cx43 podría contribuir a explicar la diferente tolerancia a la isquemia –reperfusión en los ratones Cx43KI32. No obstante, aunque no se dispone de datos sobre la distribución o función de los hemicanales en estos ratones, los análisis inmunohistológicos sugieren que la distribución de la Cx32 en la superficie celular es similar a la de la Cx43, mayoritariamente formando GJ en los discos intercalares de los cardiomiocitos.

3. Protección por preconditionamiento en corazones aislados de ratones Cx43KI32

El fallo en la protección por preconditionamiento en los ratones HOM podría considerarse artefactuado, y que sólo reflejase que estos animales están máximamente protegidos en ausencia de preconditionamiento. No obstante, los resultados obtenidos mediante el pretratamiento con cariporide indican que éste no es el caso, ya que los corazones de los ratones HOM fueron protegidos de manera eficaz con esta sustancia. Además, también se observó la pérdida de la protección por DzX en los ratones HET, a pesar de que el tamaño de infarto del grupo control en este genotipo fue similar al de los corazones WT.

Estudios previos han descrito la pérdida de la protección por preconditionamiento en ratones Cx43^{+/-} (30). Aunque se ha propuesto que el papel de la Cx43 en el preconditionamiento podría deberse a una disminución de la permeabilidad de las GJ durante la isquemia (31), en realidad parece ser independiente, al menos en parte, de la comunicación intercelular a través de las GJ. Esto quedó claramente demostrado en estudios realizados en cardiomiocitos aislados de ratones Cx43^{+/-}, que no vuelven a formar GJ tras el aislamiento, y que no pudieron ser protegidos ni mediante preconditionamiento isquémico ni farmacológico (32; 36). Además, la pérdida de la protección por DzX en cardiomiocitos Cx43^{+/-} se asoció con una disminución en la generación de ROS (36), sugiriendo que el papel de la Cx43 en el preconditionamiento era debido a su participación en la cascada de señalización de los ROS.

La mitocondria juega un papel crítico en la cascada de señalización por ROS durante la protección por preconditionamiento (35). Estudios recientes han demostrado la presencia de Cx43 en la membrana mitocondrial interna de cardiomiocitos de ratones, ratas, cerdos y humanos (33; 37) y su orientación con el dominio carboxiterminal hacia el espacio intermembrana (38). La inhibición de la translocación de la Cx43 a la mitocondria mediante geldamicina, sin alterar el contenido total de Cx43, inhibe la protección inducida por Dzx, pero no por IPC (37). Además, la ausencia de Cx43 provoca un enlentecimiento del flujo de K^+ hacia la matriz mitocondrial en cardiomiocitos permeabilizados de ratones HOM expuestos a pulsos de potasio, tanto en ausencia como en presencia de Dzx (38). Por tanto, la incapacidad de los corazones HOM a ser protegidos mediante IPC o Dzx, observada en este estudio, podría explicarse por las diferencias en la función mitocondrial causadas por el reemplazo de Cx43 por Cx32.

Los resultados obtenidos en ratones HET merecen ser comentados. Los corazones de este genotipo no se pudieron preconditionar con Dzx, aunque sí mediante IPC, sugiriendo que las acciones del Dzx son particularmente dependientes de Cx43. Esto coincide con los efectos de la inhibición de la translocación de la Cx43 a la mitocondria con geldamicina, que provoca una moderada disminución del contenido mitocondrial de Cx43 y la supresión de la protección por Dzx, aunque no por IPC (37). La diferencia en cuanto a la importancia de la Cx43 en estas dos formas de protección podría reflejar la existencia de vías paralelas en la señalización de la protección por preconditionamiento. De hecho, la generación de ROS mitocondriales parece ser particularmente importante para el efecto protector del Dzx. Se ha observado que la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria disminuye la producción de ROS y, por tanto, se podría especular que la reducción de la actividad del complejo I podría ser la causa de la mayor tolerancia a la isquemia – reperfusión y de la incapacidad de los ratones HOM de preconditionarse (52).

CONCLUSIÓN FINAL

El presente estudio demuestra que la Cx43 juega un papel importante, y previamente desconocido, en el metabolismo energético del miocardio, en la tolerancia a la isquemia y en la protección por preconditionamiento, que es dependiente de las propiedades biofísicas y bioquímicas específicas de esta isoforma de conexina.

CONCLUSIONES PARCIALES

1. La sustitución de Cx43 por Cx32 aumenta la tolerancia miocárdica a la isquemia-reperfusión en los ratones transgénicos Cx43KI32.
2. La Cx43 juega un papel importante en la protección miocárdica por preconditionamiento isquémico y farmacológico, que es dependiente de las propiedades biofísicas y bioquímicas de esta isoforma.
3. El reemplazo de Cx43 por Cx32 provoca una alteración del metabolismo energético del miocardio, con una disminución del contenido de ATP y un aumento del lactato en los cardiomiocitos.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Thompson PL, Fletcher EE y Katavatis V.** Enzymatic indices of myocardial necrosis: influence on short- and long-term prognosis after myocardial infarction. *Circulation* 59: 113-119, 1979.
2. **Garcia-Dorado D.** Myocardial Cell Protection in Acute Coronary Syndromes. In: *Acute Coronary Syndromes*, edited by Théroux P. Montreal, Canada: Elsevier Science (Saunders), 2004, p. 453-472.
3. **Piper HM, Abdallah Y y Schafer C.** The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovascular Res* 365-371, 2004.
4. **Halestrap AP, Clarke SJ y Javadov SA.** Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 61: 372-385, 2004.
5. **Schafer C, Ladilov Y, Inserte J, Schafer M, Haffner S, Garcia-Dorado D y Piper HM.** Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovasc Res* 51: 241-250, 2001.
6. **Garcia-Dorado D, Theroux P, Duran JM, Solares J, Alonso J, Sanz E, Munoz R, Elizaga J, Botas J y Fernandez-Aviles F.** Selective inhibition of the contractile apparatus. A new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. *Circulation* 85: 1160-1174, 1992.
7. **Inserte J, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Agullo L, Pina P y Soler-Soler J.** Ischemic preconditioning attenuates calpain-mediated degradation of structural proteins through a protein kinase A-dependent mechanism. *Cardiovasc Res* 64: 105-114, 2004.
8. **Harris AL.** Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. *Q Rev Biophys* 34: 325-472, 2001.
9. **van Veen AA, van Rijen HV y Opthof T.** Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties. *Cardiovasc Res* 51: 217-229, 2001.
10. **Jalife J, Morley GE y Vaidya D.** Connexins and impulse propagation in the mouse heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 10: 1649-1663, 1999.
11. **Solan JL y Lampe PD.** Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *Biochem J* 419: 261-272, 2009.

12. **Schulz R y Heusch G.** Connexin 43 and ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 62: 335-344, 2004.
13. **Poelzing S, Akar FG, Baron E y Rosenbaum DS.** Heterogeneous connexin43 expression produces electrophysiological heterogeneities across ventricular wall. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H2001-H2009, 2004.
14. **Garcia-Dorado D, Theroux P, Desco M, Solares J, Elizaga J, Fernandez-Aviles F, Alonso J y Soriano J.** Cell-to-cell interaction: a mechanism to explain wave-front progression of myocardial necrosis. *Am J Physiol* 256: H1266-H1273, 1989.
15. **Garcia-Dorado D y Ruiz-Meana M.** Propagation of Cell Death During Myocardial Reperfusion. *News Physiol Sci* 15: 326-330, 2000.
16. **Garcia-Dorado D, Inserte J, Ruiz-Meana M, Gonzalez MA, Solares J, Julia M, Barrabes JA y Soler-Soler J.** Gap Junction Uncoupler Heptanol Prevents Cell-to-Cell Progression of Hypercontracture and Limits Necrosis During Myocardial Reperfusion. *Circulation* 96: 3579-3586, 1997.
17. **Rodriguez-Sinovas A, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M y Soler-Soler J.** Enhanced effect of gap junction uncouplers on macroscopic electrical properties of reperfused myocardium. *J Physiol* 559: 245-257, 2004.
18. **Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Hofstaetter B, Piper HM y Soler-Soler J.** Propagation of cardiomyocyte hypercontracture by passage of Na(+) through gap junctions. *Circ Res* 85: 280-287, 1999.
19. **Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Lane S, Pina P, Inserte J, Mirabet M y Soler-Soler J.** Persistence of gap junction communication during myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H2563-H2571, 2001.
20. **Saltman AE, Aksehirli TO, Valiunas V, Gaudette GR, Matsuyama N, Brink P y Krukenkamp IB.** Gap junction uncoupling protects the heart against ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 124: 371-376, 2002.
21. **Kanno S, Kovacs A, Yamada KA y Saffitz JE.** Connexin43 as a determinant of myocardial infarct size following coronary occlusion in mice. *J Am Coll Cardiol* 41: 681-686, 2003.
22. **Yasui K, Kada K, Hojo M, Lee JK, Kamiya K, Toyama J, Opthof T y Kodama I.** Cell-to-cell interaction prevents cell death in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 48: 68-76, 2000.

23. **Rodriguez-Sinovas A, Cabestrero A, Lopez D, Torre I, Morente M, Abellan A, Miro E, Ruiz-Meana M y Garcia-Dorado D.** The modulatory effects of connexin 43 on cell death/survival beyond cell coupling. *Prog Biophys Mol Biol* 94: 219-232, 2007.
24. **Shintani-Ishida K, Uemura K y Yoshida K.** Hemichannels in cardiomyocytes open transiently during ischemia and contribute to reperfusion injury following brief ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H1714-H1720, 2007.
25. **Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Padilla F, Rodriguez-Sinovas A y Mirabet M.** Gap junction-mediated intercellular communication in ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 55: 456-465, 2002.
26. **Ping P, Song C, Zhang J, Guo Y, Cao X, Li RC, Wu W, Vondriska TM, Pass JM, Tang XL, Pierce WM y Bolli R.** Formation of protein kinase C(epsilon)-Lck signaling modules confers cardioprotection. *J Clin Invest* 109: 499-507, 2002.
27. **Gross GJ.** Role of opioids in acute and delayed preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 35: 709-718, 2003.
28. **Srisakuldee W, Jeyaraman MM, Nickel BE, Tanguy S, Jiang ZS y Kardami E.** Phosphorylation of connexin-43 at serine 262 promotes a cardiac injury-resistant state. *Cardiovasc Res* 83: 672-681, 2009.
29. **Schulz R, Gres P, Skyschally A, Duschin A, Belosjorow S, Konietzka I y Heusch G.** Ischemic preconditioning preserves connexin 43 phosphorylation during sustained ischemia in pig hearts in vivo. *FASEB J* 17: 1355-1357, 2003.
30. **Schwanke U, Konietzka I, Duschin A, Li X, Schulz R y Heusch G.** No ischemic preconditioning in heterozygous connexin43-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1740-H1742, 2002.
31. **Miura T, Ohnuma Y, Kuno A, Tanno M, Ichikawa Y, Nakamura Y, Yano T, Miki T, Sakamoto J y Shimamoto K.** Protective role of gap junctions in preconditioning against myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H214-H221, 2004.
32. **Li X, Heinzel FR, Boengler K, Schulz R y Heusch G.** Role of connexin 43 in ischemic preconditioning does not involve intercellular communication through gap junctions. *J Mol Cell Cardiol* 36: 161-163, 2004.
33. **Boengler K, Dodoni G, Rodriguez-Sinovas A, Cabestrero A, Ruiz-Meana M, Gres P, Konietzka I, Lopez-Iglesias C, Garcia-Dorado D, Di Lisa F, Heusch G**

- y **Schulz R**. Connexin 43 in cardiomyocyte mitochondria and its increase by ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 67: 234-244, 2005.
34. **Lefer DJ y Granger DN**. Oxidative stress and cardiac disease. *Am J Med* 109: 315-323, 2000.
35. **Schulz R, Boengler K, Totzeck A, Luo Y, Garcia-Dorado D y Heusch G**. Connexin 43 in ischemic pre- and postconditioning. *Heart Fail Rev* 12: 261-266, 2007.
36. **Heinzel FR, Luo Y, Li X, Boengler K, Buechert A, Garcia-Dorado D, Di Lisa F, Schulz R y Heusch G**. Impairment of Diazoxide-Induced Formation of Reactive Oxygen Species and Loss of Cardioprotection in Connexin 43 Deficient Mice. *Circ Res* 97: 583-586, 2005.
37. **Rodriguez-Sinovas A, Boengler K, Cabestrero A, Gres P, Morente M, Ruiz-Meana M, Konietzka I, Miro E, Totzeck A, Heusch G, Schulz R y Garcia-Dorado D**. Translocation of connexin 43 to the inner mitochondrial membrane of cardiomyocytes through the heat shock protein 90-dependent TOM pathway and its importance for cardioprotection. *Circ Res* 99: 93-101, 2006.
38. **Miro-Casas E, Ruiz-Meana M, Agullo E, Stahlhofen S, Rodriguez-Sinovas A, Cabestrero A, Jorge I, Torre I, Vazquez J, Boengler K, Schulz R, Heusch G y Garcia-Dorado D**. Connexin43 in cardiomyocyte mitochondria contributes to mitochondrial potassium uptake. *Cardiovasc Res* 83: 747-756, 2009.
39. **Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM y Rossant J**. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267: 1831-1834, 1995.
40. **Plum A, Hallas G, Magin T, Dombrowski F, Hagendorff A, Schumacher B, Wolpert C, Kim J, Lamers WH, Evert M, Meda P, Traub O y Willecke K**. Unique and shared functions of different connexins in mice. *Curr Biol* 10: 1083-1091, 2000.
41. **Goldberg GS, Moreno AP y Lampe PD**. Gap junctions between cells expressing connexin 43 or 32 show inverse permselectivity to adenosine and ATP. *J Biol Chem* 277: 36725-36730, 2002.
42. **Barba I, Jaimez-Auguets E, Rodriguez-Sinovas A y Garcia-Dorado D**. 1H NMR-based metabolomic identification of at-risk areas after myocardial infarction in swine. *MAGMA* 20: 265-271, 2007.

43. **Inserte J, Barba I, Hernando V y Garcia-Dorado D.** Delayed recovery of intracellular acidosis during reperfusion prevents calpain activation and determines protection in postconditioned myocardium. *Cardiovasc Res* 81: 116-122, 2009.
44. **Ferrera R, Benhabbouche S, Bopassa JC, Li B y Ovize M.** One hour reperfusion is enough to assess function and infarct size with TTC staining in Langendorff rat model. *Cardiovasc Drugs Ther* 23: 327-331, 2009.
45. **Kloner RA y Rezkalla SH.** Cardiac protection during acute myocardial infarction: where do we stand in 2004? *J Am Coll Cardiol* 44: 276-286, 2004.
46. **Schroeder MA, Atherton HJ, Ball DR, Cole MA, Heather LC, Griffin JL, Clarke K, Radda GK y Tyler DJ.** Real-time assessment of Krebs cycle metabolism using hyperpolarized ¹³C magnetic resonance spectroscopy. *FASEB J* 23: 2529-2538, 2009.
47. **Lofgren B, Povlsen JA, Rasmussen LE, Stottrup NB, Solskov L, Krarup PM, Kristiansen SB, Botker HE y Nielsen TT.** Amino acid transamination is crucial for ischaemic cardioprotection in normal and preconditioned isolated rat hearts--focus on L-glutamate. *Exp Physiol* 95: 140-152, 2010.
48. **Nishiki K, Erecinska M y Wilson DF.** Effect of Amytal on metabolism of perfused rat heart: relationship between glycolysis and oxidative phosphorylation. *Am J Physiol* 237: C221-C230, 1979.
49. **Boengler K, Ruiz-Meana M, Miro-Casas E, Cabestrero A, Rodriguez-Sinovas A, Dodoni G, kleibrink B, Garcia-Dorado D, Heusch G y Schulz R.** Connexin 43 controls mitochondrial respiration. *Circulation* 114: II-243 (Abstract), 2006.
50. **Rami A, Volkmann T y Winckler J.** Effective reduction of neuronal death by inhibiting gap junctional intercellular communication in a rodent model of global transient cerebral ischemia. *Exp Neurol* 170: 297-304, 2001.
51. **Rodriguez-Sinovas A, Sanchez JA, Gonzalez-Loyola A, Barba I, Morente M, Aguilar R, Agullo E, Miro-Casas E, Esquerda N, Ruiz-Meana M y Garcia-Dorado D.** Effects of substitution of Cx43 by Cx32 on myocardial energy metabolism, tolerance to ischemia and preconditioning protection. *J Physiol* 2010.
52. **Stewart S, Lesnefsky EJ y Chen Q.** Reversible blockade of electron transport with amobarbital at the onset of reperfusion attenuates cardiac injury. *Transl Res* 153: 224-231, 2009.