



Fundació
La Marató de TV3
21º SIMPOSIUM
Enfermedades del corazón



PAPEL DE LA CONEXINA 43 EN LA CICATRIZACIÓN MIOCÁRDICA, EN EL REMODELADO ADVERSO DEL VENTRÍCULO IZQUIERDO Y EN LA INSUFICIENCIA CARDÍACA

Antonio Rodríguez Sinovas

Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron

1. Resumen

Introducción

La conexina 43 (Cx43) es una proteína esencial en el acoplamiento eléctrico cardíaco, pero también en la propagación del daño celular que se produce durante un episodio de isquemia-reperfusión, así como en la cardioprotección por preconditionamiento isquémico. Además, la Cx43 tiene un papel importante en el proceso de cicatrización que se da en otros tejidos, como la piel o la córnea, aunque su papel en la cicatrización cardíaca es desconocido. Algunos resultados previos, obtenidos en tejido óseo, sugirieron que podría existir una relación entre la Cx43 y la lisil oxidasa (LOX), el primer enzima que cataliza la formación de los enlaces covalentes entre las fibras de colágeno (*crosslinks*).

Objetivos

1. Estudiar el papel de la Cx43 en la cicatrización miocárdica, el remodelado del ventrículo izquierdo y en el desarrollo de insuficiencia cardíaca en modelos murinos de dos tipos: uno de sobrecarga de presión tras tratamiento crónico con angiotensina II (AngII) y otro de remodelado postinfarto de miocardio.
2. Analizar la participación de LOX en los efectos observados, y la relación que pueda existir entre ambas proteínas.
3. Caracterizar los mecanismos involucrados.

Métodos y resultados

Para analizar el papel de la Cx43 en el desarrollo de fibrosis miocárdica, hemos utilizado ratones Cx43^{fl/fl} (expresión normal de Cx43) y un modelo de deficiencia inducible de Cx43, el Cx43^{Cre-ER(T)/fl} (contenido de Cx43 de un 50%), tratado con vehículo o 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT) para inducir la delección global del alelo de Cx43 que se encuentra flanqueado por las secuencias PLox.

Algunos de los animales fueron infundidos, simultáneamente y durante 14 días, con solución salina o AngII (1.000 ng/kg/min, como inductor de hipertrofia y fibrosis), usando bombas osmóticas implantadas subcutáneamente. El tratamiento con AngII indujo una respuesta hipertrófica similar en todos los grupos, independientemente del nivel de expresión de Cx43. El contenido de colágeno miocárdico, analizado mediante tinción de rojo picosirius, fue bajo en todos los grupos tratados con suero fisiológico

(n = 8-9/grupo), pero aumentó de forma significativa en todos los infundidos con AngII (n = 8-10/grupo, p < 0,05). Sin embargo, los animales con deficiencia parcial de Cx43 (ratones Cx43^{Cre-ER(T)/fl} tratados con vehículo) presentaron una respuesta fibrótica exagerada que se revirtió en los ratones tratados con 4-OHT, que abole la expresión de Cx43. La respuesta fibrótica exagerada observada en ratones Cx43^{Cre-ER(T)/fl}, parcialmente deficientes, se asoció con un aumento en la activación de p38 MAPK, y no fue evidente en ratones heterocigotos Cx43^{+/-}, con una deficiencia parcial similar, lo que sugiere que este efecto es independiente de los niveles de expresión de Cx43. Por el contrario, la normalización en la deposición de colágeno observada en ratones Cx43^{Cre-ER(T)/fl} tratados con 4-OHT, tras infusión de AngII, se correlacionó con un aumento en la actividad de la metaloproteinasa 9 (MMP9), en la expresión de los marcadores de inflamación IL-6 y NOX2, y con un mayor contenido de macrófagos, así como con una capacidad de diferenciación de los fibroblastos reducida.

Por otro lado, para analizar la respuesta fibrótica y el remodelado tras infarto de miocardio, grupos adicionales fueron sometidos a oclusión coronaria transitoria (45 min) seguida de reperfusión (14 días). Nuestros resultados demuestran que el área de la cicatriz postinfarto, determinada mediante tinción con rojo picrosirius, fue significativamente inferior tanto en los animales Cx43^{Cre-ER(T)/fl} tratados con vehículo (50% de expresión de Cx43) como en los tratados con 4-OHT (<5%), en comparación con los resultados obtenidos en animales Cx43^{fl/fl} (15,78±3,42 y 16,54±2,31% frente a 25,40±3,14 y 22,43±3,88% en ratones tratados con vehículo y 4-OHT, respectivamente, p = 0,027 para genotipo, ANOVA de dos factores). La reducción en el peso corporal y la dilatación ventricular se atenuaron de forma significativa en ambos grupos deficientes para Cx43. Este efecto protector sobre el tamaño de la cicatriz se correlacionó con una reducción en la expresión de pro-TGF α 1 en estos animales.

Adicionalmente, estos resultados se compararon con los obtenidos en animales que sobreexpresan LOX. Esta comparación parece constatar que no existe una relación clara entre Cx43 y LOX, y que los hallazgos iniciales encontrados (sobreexpresión de LOX en animales deficientes para Cx43) son debidos, probablemente, a una respuesta compensatoria.

Conclusiones

La Cx43 tiene un papel importante en el desarrollo de fibrosis y en el remodelado ventricular adverso. Una reducción en su expresión atenúa la deposición de colágeno, tanto tras sobrecarga de presión con AngII como tras infarto de miocardio. En el primer caso, los mecanismos se relacionan con una menor capacidad de diferenciación de los fibroblastos, mayor actividad de MMP9 y mayor acumulación de macrófagos en el tejido. En el segundo caso, los efectos se asocian con una menor expresión de pro-TGF β 1.

2. Resultados

1. Papel de la conexina 43 en la deposición miocárdica de colágeno, en el remodelado adverso del ventrículo izquierdo y en la insuficiencia cardíaca inducidos mediante sobrecarga de presión tras tratamiento crónico con AngII

1.a. Hipertrofia ventricular

El tratamiento con AngII durante 14 días provocó un aumento en la relación entre el peso cardíaco y el corporal (CW/BW), indicativa de hipertrofia cardíaca, de una magnitud similar en todos los grupos, independientemente de los niveles de expresión de Cx43 (100% de expresión de Cx43 en los animales Cx43^{fl/fl}, 50% en los ratones Cx43^{Cre-ER(T)/fl} y <5% en los Cx43^{Cre-ER(T)/fl} inyectados con 4OHT). La falta de influencia de la Cx43 en la respuesta hipertrófica a AngII se pudo confirmar mediante la medición del área transversal de los cardiomiocitos, así como mediante ecocardiografía. En consonancia con estos datos, la AngII provocó una inducción significativa del marcador hipertrófico ANP en todos los grupos (ANOVA de dos factores, $p < 0,001$). Se obtuvieron resultados similares en otra cepa de animales (heterocigotos Cx43^{+/-}) con una deficiencia parcial de Cx43 parecida a la de los animales Cx43^{Cre-ER(T)/fl}.

1.b. Desarrollo de fibrosis

La cantidad de colágeno intersticial miocárdico fue baja en todos los grupos experimentales que fueron tratados con solución salina, oscilando entre un 2% y 3% (figura 1). Por el contrario, el tratamiento con AngII durante 14 días provocó un aumento del contenido de colágeno en los ratones Cx43^{fl/fl} inyectados con aceite desde un $2,67 \pm 0,32\%$ a un $7,30 \pm 1,19\%$ ($p < 0,05$) (figura 1A). Ahora bien, el aumento en la

deposición de colágeno en respuesta a AngII fue significativamente superior en el grupo de animales $Cx43^{Cre-ER(T)/fl}$ tratado con aceite, que expresan un 50% del contenido normal de Cx43 (figura 1B).

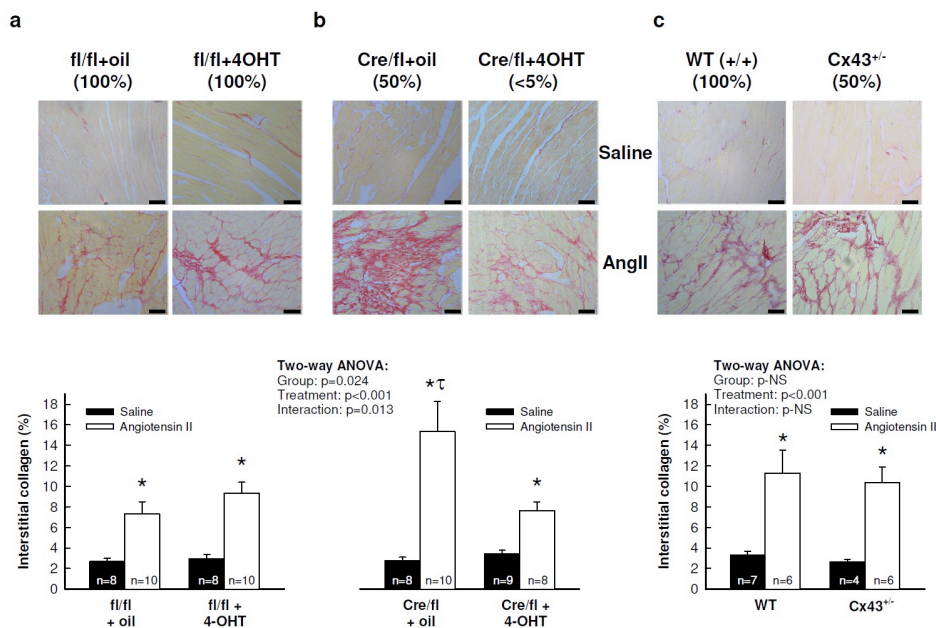


Figure 2

Figura 1. Fibrosis cardíaca inducida mediante tratamiento crónico con AngII en ratones $Cx43^{fl/fl}$, $Cx43^{Cre-ER(T)/fl}$ y $Cx43^{+/-}$. * ($p < 0,05$) indica diferencias significativas frente a las del grupo tratado con solución salina correspondiente. * ($p < 0,05$) indica diferencias significativas frente a los grupos restantes tratados con AngII.

Para evaluar si el aumento marcado en el contenido de colágeno en respuesta a AngII que se observó en los ratones $Cx43^{Cre-ER(T)/fl}$ + aceite podría explicarse por la deficiencia parcial de Cx43 que presentan, se repitió este experimento en otro modelo con una deficiencia similar de la proteína (ratones $Cx43^{+/-}$). Inesperadamente, el tratamiento con AngII no aumentó la deposición de colágeno en ratones $Cx43^{+/-}$ por encima de los niveles encontrados en animales de fenotipo salvaje (WT) (figura 1C). Este hecho puede sugerir que los hallazgos obtenidos en ratones $Cx43^{Cre-ER(T)/fl}$ + aceite no están, en realidad, relacionados directamente con la reducción en el nivel de expresión Cx43.

Los efectos de la AngII sobre la deposición de colágeno observados en ratones $Cx43^{fl/fl}$ inyectados con aceite no se modificaron cuando los animales de este genotipo se trataron con 4-OHT (figura 1A). Por el contrario, el marcado incremento en los niveles de colágeno observado en los ratones $Cx43^{Cre-ER(T)/fl}$, con deficiencia moderada de Cx43, se revirtió cuando la delección de Cx43 fue casi completa ($Cx43^{Cre-ER(T)/fl}$ tratados con 4-

OHT) (figura 1B), y se alcanzaron unos valores de colágeno cercanos a los encontrados en ratones Cx43^{fl/fl} después de AngII (figura 1A).

1.c. Análisis de los mecanismos involucrados

1.c.1. Sobreexpresión paradójica de los ARNm que codifican para proteínas implicadas en la síntesis y degradación del colágeno en ratones deficientes para Cx43

Hemos analizado la expresión de ARNm que codifican para proteínas involucradas en la síntesis (COL1A1, TGF β 1, P4HA1), maduración (LOX) y degradación (TIMP1, TIMP2) del colágeno, tanto en animales de fenotipo salvaje (Cx43^{fl/fl}) como deficientes para Cx43, e infundidos con solución salina o AngII. Así, los corazones de animales tratados con solución salina, tanto de ratones Cx43^{fl/fl} como de animales Cx43^{Cre-ER(T)/fl} tratados con aceite (50% de expresión de Cx43) presentaron niveles similares de todos los ARNm estudiados. Por el contrario, los corazones de animales Cx43^{Cre-ER(T)/fl} inyectados con 4-OHT presentaron una inducción marcada de COL1A1, TGF β 1, LOX y TIMP1.

El tratamiento con AngII aumentó la expresión de estos cuatro ARNm en ratones Cx43^{fl/fl} y en animales Cx43^{Cre-ER(T)/fl} inyectados con aceite, pero no en los ratones con una marcada deficiencia de Cx43 (Cx43^{Cre-ER(T)/fl}+4-OHT). En este último grupo, los niveles de ARNm de COL1A1, TGF β 1 y LOX, aunque todavía elevados, fueron significativamente más bajos que en los ratones infundidos con solución salina.

1.c.2. El aumento en la deposición de colágeno en respuesta a AngII en corazones parcialmente deficientes para Cx43 (Cx43^{Cre-ER(T)/fl} + aceite) se correlaciona con un aumento en la activación de p38 MAPK

La deposición aumentada de colágeno inducida tras el tratamiento con AngII en los ratones Cx43^{Cre-ER(T)/fl} inyectados con aceite (50% de expresión de Cx43) se asoció con un incremento en la activación de p38 MAPK. Esta fosforilación aumentada de p38 MAPK no se observó en los ratones Cx43^{+/-} tratados con AngII, que no mostraron ese incremento en la deposición de colágeno (figura 1C).

1.c.3. La normalización del contenido de colágeno en corazones de ratones Cx43^{Cre-ER(T)/fl} inyectados con 4-OHT y tratados con AngII se asocia con una mayor actividad de metaloproteinasa 9 (MMP9)

Mediante zimografía en gelatina de muestras de miocardio de ratones pudimos demostrar una actividad aumentada de MMP9 en animales con ausencia casi total de

Cx43 (Cx43^{Cre-ER(T)/fl} + 4-OHT), en comparación con el resto de grupos, tanto tras tratamiento con solución salina como con AngII. No se observaron diferencias significativas para la actividad de MMP2.

1.c.4. La delección de Cx43 en los ratones Cx43^{Cre-ER(T)/fl} inyectados con 4-OHT se asocia con aumento en la expresión de marcadores de inflamación

La delección de Cx43 tras tratamiento con 4-OHT en ratones Cx43^{Cre-ER(T)/fl} provocó un gran incremento en los niveles miocárdicos de ARNm de IL-6 y NOX2, tanto en animales infundidos con solución salina como con AngII. Además, mediante tinción inmunohistoquímica de secciones cardíacas, se demostró que estos corazones presentaban un incremento en la expresión del marcador de macrófagos LAMP-2/Mac-3 y de MMP9, tanto tras infusión de solución salina como de AngII.

1.c.5. Estudios en fibroblastos aislados

Los fibroblastos cardíacos aislados de animales con deficiencia marcada de Cx43 (Cx43^{Cre-ER(T)/fl} + 4-OHT) presentaron un fenotipo anormal, que incluía tamaño reducido y núcleos altamente refringentes. Además, estas células mostraron una reducción en la expresión de α -SMA y SM22 α , dos marcadores de diferenciación celular.

1.d. Comparación entre los resultados obtenidos en animales Cx43^{Cre-ER(T)/fl} con lo que ocurre en ratones con sobreexpresión de LOX

La sobreexpresión de LOX humana en un modelo transgénico en ratón acelera el remodelado cardíaco y agrava la disfunción e hipertrofia inducidas mediante tratamiento crónico con AngII. En estos animales, y al contrario de lo que ocurría en los animales deficientes para Cx43 tratados con 4-OHT, se observó una mayor respuesta fibrótica, aunque sí compartieron el aumento en el infiltrado inflamatorio miocárdico, y una expresión exacerbada de marcadores proinflamatorios. Estos resultados no avalan una relación clara entre Cx43 y LOX.

2. Papel de la conexina 43 en la cicatrización miocárdica, en el remodelado adverso del ventrículo izquierdo y en la insuficiencia cardíaca tras infarto de miocardio

2.a. Tamaño del área de la cicatriz postinfarto

El área de la cicatriz postinfarto, determinada mediante tinción de rojo picrosirius, realizada a los 14 días de la oclusión coronaria transitoria (45 min), se redujo de manera significativa en los ratones con deficiencia de Cx43 (Cx43^{Cre-ER(T)/fl}). Esto fue así tanto en los animales tratados con aceite (50% de expresión Cx43) como en los inyectados con 4-OHT (<5% de expresión Cx43), en comparación con los resultados obtenidos en los animales Cx43^{fl/fl}, que tienen niveles normales de Cx43 (16,10±2,16% para ambos grupos de animales deficientes para Cx43 vs. 23,91±2,44% para ambos grupos Cx43^{fl/fl}, p = 0,022, prueba *t* de Student) (figura 2).

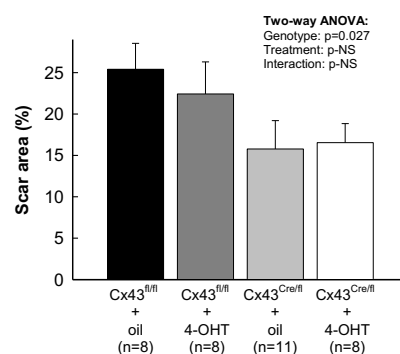


Figura 2. Tamaño del infarto, respecto al área total, determinado mediante tinción de rojo picrosirius, en secciones cardíacas obtenidas de los 4 grupos experimentales.

2.b. Cambios en la expresión de marcadores de cicatrización mediante *Western blot*

Mediante ANOVA de dos factores se observó un aumento significativo en la expresión de NF-κB, pro-TGFβ1 y de la forma activa de TGFβ1, junto con un aumento muy ligero en SMAD2/3, en los animales que habían sufrido una oclusión coronaria 14 días antes. Sin embargo, en los animales deficientes para Cx43 (tanto los tratados con 4-OHT como con aceite), el incremento en pro-TGFβ1 fue inferior y, de hecho, no alcanzó significación estadística respecto a sus grupos control correspondientes.

2.c. Comparación entre los resultados obtenidos en animales Cx43^{Cre-ER(T)/fl} con lo que ocurre en ratones con sobreexpresión de LOX

La sobreexpresión de LOX no modificó el tamaño de la cicatriz postinfarto, determinado como área de fibrosis en el área en riesgo mediante tinción de rojo picrosirius. Tampoco afectó a la deposición de colágeno en zonas remotas del corazón (6,57±0,85 frente a 7,38±0,45% en WT y TgLOX, respectivamente, p-NS). Estos datos nuevamente cuestionan una relación clara entre Cx43 y LOX.

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

Nuestro estudio demuestra que la deficiencia de conexina 43 (Cx43) provoca una reducción en la deposición de colágeno, es decir, en el desarrollo de fibrosis, durante el remodelado ventricular adverso.

En el caso del remodelado ventricular por sobrecarga de presión, tal como ocurre durante el tratamiento con angiotensina II, la deficiencia de Cx43 se asocia con una reducción en la fibrosis intersticial, un efecto que parece deberse a una mayor actividad de la metaloproteinasa 9, mayor infiltrado inflamatorio y menor capacidad de los fibroblastos para diferenciarse. Es cierto que, probablemente debido a peculiaridades del modelo animal utilizado, es necesaria una deficiencia muy marcada de Cx43 para observar este efecto beneficioso. En cualquier caso nuestros datos apoyan resultados previos obtenidos en otros tejidos, como la piel o la córnea, en los que se demostró que la reducción de los niveles o de la funcionalidad de la Cx43 (mediante cremas con péptidos inhibitorios, por ejemplo) provoca una cicatrización mejor y más rápida tras diversos tipos de lesiones.

En el caso del remodelado ventricular postinfarto, hemos demostrado que la reducción de los niveles de Cx43, en este caso tanto de forma moderada como marcada, provoca una disminución en el tamaño de la cicatriz postinfarto. Este efecto se asocia a una menor expresión de pro-TGF β 1, lo cual podría explicar, al menos en parte, estos hallazgos. Las limitaciones temporales del modelo (cuya mortalidad aumentaría en caso de un seguimiento superior a los 14 días postreperfusión) han hecho inviable averiguar qué ocurre a más largo plazo. Pero parece probable que esta menor cicatrización postinfarto puede dar lugar a una reducción en el remodelado ventricular adverso y, por lo tanto, a un menor desarrollo de insuficiencia cardíaca.

Por lo tanto, el desarrollo de fármacos capaces de disminuir la funcionalidad o la expresión de la Cx43 podría convertirse en una herramienta muy importante para reducir el desarrollo de fibrosis y la tasa de insuficiencia cardíaca asociada. Hay que considerar que las enfermedades cardiovasculares siguen siendo la principal causa de muerte a nivel global y, entre ellas, el infarto de miocardio es la primera enfermedad cardiovascular. En el caso del infarto, la mejora en los tratamientos actuales ha hecho que cada vez más pacientes sobrevivan al episodio agudo, pero lo hacen con una

función deteriorada, con desarrollo de hipertrofia y fibrosis, y aparición de insuficiencia cardíaca. Asimismo, la hipertensión es una comorbilidad muy frecuente en pacientes cardiovasculares, que acaba dando lugar a remodelado ventricular con aparición de fibrosis. Cualquier tratamiento encaminado a reducir la aparición de fibrosis, una diana huérfana actualmente, tendrá una gran repercusión sobre la calidad de vida de estos pacientes y reducirá los costes del sistema sanitario.

Sin embargo, hay que reconocer que la aplicación de terapias encaminadas a reducir la función o expresión de Cx43 no será sencilla. Una reducción en los niveles de Cx43 se ha asociado con una alta incidencia de arritmias. Esto sería una limitación importante. Para solventar este problema caben diversas posibilidades. En el caso del infarto, se podrían administrar los inhibidores o siRNA directamente, y de forma selectiva, en el área en riesgo, con catéteres intracoronarios, cosa factible, tal como hemos demostrado en otros estudios. Sería más complejo en el caso de la hipertensión, que afecta a todo el órgano. En este sentido, estudios posteriores deberán analizar si estos efectos sobre el desarrollo de fibrosis son debidos a su participación como canales en las *gap junctions* (con la consiguiente afectación de las arritmias), o a acciones independientes de las mismas, como por ejemplo como factor de regulación transcripcional. En este caso podrían idearse terapias encaminadas a actuar específicamente sobre esta función.

Por lo tanto, las conclusiones de este proyecto son las siguientes:

A. Respecto al remodelado tras sobrecarga de presión inducida mediante tratamiento crónico con AngII

1. La deficiencia moderada de Cx43 (50%) provoca un incremento muy marcado en la deposición de colágeno tras tratamiento con angiotensina II, que parece independiente de dicha deficiencia de Cx43, y se asocia a un aumento en la activación de p38 MAPK.
2. La deficiencia marcada de Cx43 produce una reducción en la deposición de colágeno sobre la esperada para ese genotipo tras tratamiento con angiotensina II, efecto asociado con una mayor actividad de MMP9, mayor infiltrado inflamatorio y una capacidad reducida de los fibroblastos para diferenciarse.

B. Respecto al remodelado tras infarto de miocardio

1. La deficiencia de Cx43 (tanto moderada como marcada) produce una reducción en el tamaño de la cicatriz postinfarto. Este efecto se asocia a una menor expresión de pro-TGF β 1.

4. Bibliografía científica generada

Publicaciones

Galan M, Varona S, Guadall A, Orriols M, Navas M, Aguiló S, de Diego A, Navarro MA, García-Dorado D, Rodríguez-Sinovas A, Martínez-González J, Rodríguez C.

Lysyl oxidase over-expression accelerates cardiac remodeling and aggravates angiotensin II-induced hypertrophy.

FASEB J 2017;31:3787-3799. DOI: 10.1096/fj.201601157RR.

Rodríguez-Sinovas A, Ruiz-Meana M, Denuc A, García-Dorado D.

Mitochondrial Cx43, a pivotal component of cardiac preconditioning.

BBA-Biomembranes 2018;1860:174-181. DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.06.011.

Valls-Lacalle L, Negre-Pujol C, Rodríguez C, Varona S, Valera-Cañellas A, Consegal M, Martínez-González J, Rodríguez-Sinovas A.

Opposite Effects of Moderate and Extreme Cx43 Deficiency in Conditional Cx43-Deficient Mice on Angiotensin II-Induced Cardiac Fibrosis.

Cells 2019;8:E1299. DOI: 10.3390/cells8101299.

Diez ER, Sánchez JA, Prado NJ, Ponce Zumino AZ, García-Dorado D, Miatello RM, Rodríguez-Sinovas A.

Ischemic Postconditioning Reduces Reperfusion Arrhythmias by Adenosine Receptors and Protein Kinase C Activation but Is Independent of K(ATP) Channels or Connexin 43.

Int J Mol Sci 2019;20:E5927. DOI: 10.3390/ijms20235927.

Comunicaciones en congresos

Valls-Lacalle L, Negre-Pujol C, Valera-Cañellas A, Varona S, Martínez-González J, Rodríguez C, García-Dorado D, Rodríguez-Sinovas A.

Extreme connexin 43 deficiency in mice protects against collagen deposition in angiotensin II-induced myocardial hypertrophy.

American Heart Association (AHA) Scientific Sessions 2017, Anaheim, Estados Unidos, 11-15 de noviembre de 2017.

Publicado en: *Circulation* 2017; 136(Suppl1): A16413.

Valls-Lacalle L, Pecoraro M, Varona S, Martínez-González J, Rodríguez C, García-Dorado D, Rodríguez-Sinovas A.

Human lysyl oxidase overexpression does not modify infarct size in mice.

52th Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation, Barcelona, España, 30 de mayo - 1 de junio de 2018.

Publicado en: *European Journal of Clinical Investigation* 2018; 48(Suppl.1): 122-123.

Valls-Lacalle L, Negre-Pujol C, Valera-Cañellas A, Varona S, Martínez-González J, Rodríguez C, García-Dorado D, Rodríguez-Sinovas A.

La deficiencia extrema de conexina 43 en ratón se asocia, en condiciones basales, con sobreexpresión de ARNm codificantes para proteínas involucradas en la cicatrización cardíaca.

SEC 2018 - Congreso de las Enfermedades Cardiovasculares, octubre de 2018, Sevilla, España.

Publicado en: *Revista Española de Cardiología* 2018; 71(Supl. 1): 1191.