



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**ROL DE LOS HEMICANALES DE CONEXINA 43 ASOCIADO A DAÑO  
MIOCÁRDICO EN LA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO  
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA**

**AUTOR: ESTEBAN FUENTES BOBADILLA  
PROFESOR GUÍA: BQ Dr. DANIEL GONZÁLEZ REINOSO**

**TALCA-CHILE  
2021**

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2022



*A mi familia y a quienes estuvieron presente en mi desarrollo profesional,  
brindándome contención y apoyo cuando más lo necesitaba.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, por ser parte incondicional de mi desarrollo, otorgándome todas las herramientas necesarias para lograr mis sueños. Gracias por llenar mi trayectoria de consejos, alegría y momentos que no se borrarán de mi memoria.

A mi familia y seres queridos, por brindarme su cariño y respaldo en las diferentes áreas de mi vida, mostrando interés y preocupación por mi bienestar.

A mi profesor guía, BQ Dr. Daniel González Reinoso por la oportunidad de desarrollar mi memoria bajo su orientación, conocimientos y preocupación.

A Dios, sobre todo.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
1. RESUMEN.....	7
2. INTRODUCCIÓN .....	8
3. OBJETIVOS.....	10
3.1 Objetivo general.....	10
3.2 Objetivos específicos.....	10
4. METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA .....	11
5. MARCO TEÓRICO.....	12
5.1 Distrofinopatías.....	12
5.1.1 Distrofina.....	13
5.1.2 Distrofia muscular de Duchenne.....	14
5.2 Miocardiopatía en la enfermedad de Duchenne .....	17
5.3 Uniones celulares .....	21
5.3.1 Uniones gap .....	22
5.3.2 Conexinas .....	24
5.3.3 Estructura de las conexinas .....	26
5.3.4 Biosíntesis, acoplamiento y degradación de las conexinas .....	27
5.3.5 Enfermedades asociadas a conexinas humanas .....	29
5.4 Hemicanales.....	31
5.5 Principales conexinas expresadas en el miocardio .....	36
5.6 Generalidades de la conexina 43 .....	37

5.7 Hemicanales de conexina 43 .....	40
5.7.1 Hemicanales de conexina 43 en la miocardiopatía de Duchenne .....	41
5.8 Remodelación de la Cx43 en la DMD asociada a la fosforilación .....	44
5.8.1 Fosforilación de conexina 43 y su implicancia en la DMD .....	46
5.9 Acetilación en la remodelación de Cx43 en Duchenne .....	47
5.10 S – nitrosilación en la conexina 43 .....	49
5.10.1 Óxido nítrico .....	50
5.10.2 S – nitrosilación .....	50
5.10.3 S – nitrosilación de conexina 43 asociado a la enfermedad de Duchenne .....	51
5.11 Implicancia del estrés oxidativo asociado a conexina 43 en la DMD .....	53
5.11.1 Especies reactivas del oxígeno y estrés oxidativo .....	55
5.11.2 Familia de las NADPH oxidasas .....	58
5.11.2.1 NOX 2 .....	59
5.11.2.2 NOX 4.....	62
6. CONCLUSIONES .....	66
7. REFERENCIAS.....	67

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1: Interacción del complejo distrofina-glicoproteína .....	14
Figura 2: Hiperlordosis en paciente con DMD .....	16
Tabla 1: Desarrollo cronológico de las distintas clasificaciones para las miocardiopatías, adoptadas en los últimos 60 años .....	18
Figura 3: Disposición de los hemicanales de conexina en la unión gap .....	23
Figura 4: Posibles composiciones de los canales de conexinas .....	25
Figura 5: Estructura representativa de una conexina .....	27
Tabla 2: Principales enfermedades asociadas a mutaciones en conexinas humanas .....	30
Figura 6: Mecanismo de apertura de un hemicanal de conexina.....	33
Tabla 3: Regulación de la actividad de algunos HCs de conexina .....	34
Tabla 4: Patrones de expresión de conexinas en el corazón.....	37
Tabla 5: Distribución tisular y celular de conexina 43 .....	38
Figura 7: Lateralización de la conexina 43 .....	43
Figura 8: Modificaciones postraduccionales alteradas implicadas en la lateralización de la conexina 43.....	53
Figura 9: Formación y descripción de algunas especies reactivas del oxígeno .....	57
Figura 10: Estructura de la NADPH oxidasa 2 .....	60
Figura 11: Estructura de la NADPH oxidasa 4 .....	63
Figura 12: Principales mecanismos implicados en el daño celular asociado a hemicanales de Cx43 en la DMD.....	65



## 1. RESUMEN

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad con un fuerte componente genético ligado al cromosoma X, en donde la mutación del gen de la distrofina produce ausencia de dicha proteína, la cual es fundamental para estabilizar y amortiguar la contracción muscular y que, como consecuencia de su ausencia, desencadena alteraciones musculares, respiratorias y cardíacas progresivas que ocasionan la muerte prematura de quien padece esta enfermedad. La etiología de esta distrofinopatía no se encuentra definida por completo, por lo cual, la búsqueda del origen y cura ha sido objeto de muchos estudios. Gran parte de los individuos con DMD desarrollan miocardiopatía dilatada, y el origen de esto se ha ligado directamente al desequilibrio oxidativo y a la participación alterada de la proteína conexina 43 (Cx43) en el tejido cardíaco. En el corazón con DMD, la Cx43 modifica su ubicación, pasando desde los discos intercalares a las membranas laterales de los cardiomiocitos para formar hemicanales (HCs). En este proceso participan múltiples modificaciones postraduccionales como la fosforilación, acetilación y s-nitrosilación, además de una importante participación del estrés oxidativo. Estas modificaciones en conjunto alteran la funcionalidad y expresión de la Cx43 en el corazón, originando alteraciones cardíacas como arritmia ventricular, insuficiencia cardíaca, miocardiopatía hipertrófica, entre otras. Por lo tanto, con el presente trabajo se busca presentar un análisis de la evidencia existente del rol que cumplen los HCs de Cx43 en la distrofia muscular de Duchenne, haciendo énfasis en los últimos 10 años.

**Palabras claves:** Distrofia muscular de Duchenne, Conexina 43, hemicanales, mdx, miocardiopatía.

## 2. INTRODUCCIÓN

La distrofia muscular de Duchenne es una distrofinopatía con afección neuromuscular, la cual presenta un origen genético autosómico recesivo ligado al cromosoma X, afectando a 1 de cada 3.500 a 6.000 varones nacidos vivos. El origen de esta enfermedad se fundamenta en la disrupción del complejo distrofina-glicoproteína, siendo la distrofina una proteína importante en el tejido muscular estriado y cardíaco ya que ayuda a realizar una correcta contracción muscular. Cuando esta proteína presenta una alteración genética y funcional podemos evidenciar en la sintomatología clínica de los pacientes una debilidad muscular, alteraciones en la marcha, pérdida de masa muscular, desarrollo neuromuscular tardío y alteraciones a nivel respiratorio y cardíaco. En fases más avanzadas de esta enfermedad producto del daño muscular progresivo, la mayoría de estos pacientes llega a necesitar de una silla de ruedas para efectuar su traslado e incluso de soporte ventilatorio, lo cual da a entender la gravedad e importancia de esta patología.

Es reconocido el impacto negativo que tiene la enfermedad de Duchenne sobre el corazón, afectando principalmente el tejido cardíaco en aspectos estructurales y funcionales. La miocardiopatía que desarrollan estos pacientes es una causa importante de morbilidad y mortalidad, bajo la cual se esconden, como en cualquier miocardiopatía, mecanismos bastante complejos de pérdida de función y patología cardíaca que no logran ser dilucidados por completo. De igual manera, se ha tratado de identificar las posibles causales de daño miocárdico en la DMD, encontrando asociaciones genéticas, metabólicas, enzimáticas y otras, que a pesar de ser muy estudiadas no han sido suficientes para describir el origen exacto de la enfermedad. En la búsqueda de factores que influyen en la fisiopatología de Duchenne, se menciona la participación de la Cx43 en el miocardio, y como ésta, al sufrir ciertos trastornos puede desarrollar mecanismos de daño cardíaco.

En condiciones normales la Cx43 forma HCs que pueden interactuar con HCs de células adyacentes y formar una unión gap (GJ) que permite el transporte de señales eléctricas, iones y moléculas pequeñas de hasta 1000 Daltons, como el AMPc, GMPc,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{IP}_3$ . Alteraciones en la localización celular y apertura desregulada del HC de Cx43 por medio de mecanismos de modificación postraducciona, generan daño en el tejido cardíaco, lo cual se ve potenciado por muchos factores, como, por ejemplo, el estrés oxidativo.

A través de esta revisión bibliográfica se busca recopilar información que permita conocer de mejor manera la relación que existe entre la Cx43 y la distrofia muscular de Duchenne, incorporando los principales agentes de daño en esta enfermedad.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general:**

Evidenciar a través de una revisión bibliográfica de la literatura reciente, el rol de la conexina 43 en la cardiopatía presente en la distrofia muscular de Duchenne.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

- 1.- Definir los aspectos generales de la enfermedad de Duchenne.
- 2.- Describir el daño miocárdico presente en la enfermedad de Duchenne.
- 3.- Describir las características estructurales y funcionales de la conexina 43.
- 4.- Relacionar alteraciones estructurales y funcionales de la conexina 43 en la miocardiopatía presente en la enfermedad de Duchenne, de acuerdo con la literatura reciente.
- 5.- Relacionar el impacto del estrés oxidativo con la funcionalidad de la conexina 43 en la miocardiopatía presente en la enfermedad de Duchenne, de acuerdo con la literatura reciente.

#### **4. METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA**

Se realizó una revisión bibliográfica enfocada en la información disponible sobre el rol que tiene la conexina 43 en la miocardiopatía presente en la distrofia muscular de Duchenne. Para esta revisión, se realizó una búsqueda sistemática en revistas publicadas indexadas para garantizar que las publicaciones utilizadas cumplan con altos criterios de calidad y brinden contenido confiable a nivel internacional. Las bases de datos utilizadas fueron: PubMed, Scielo, Web of Science y ScienceDirect con el propósito de recopilar información referida al tema, haciendo énfasis en lo publicado en los últimos 10 años.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 Distrofinopatías

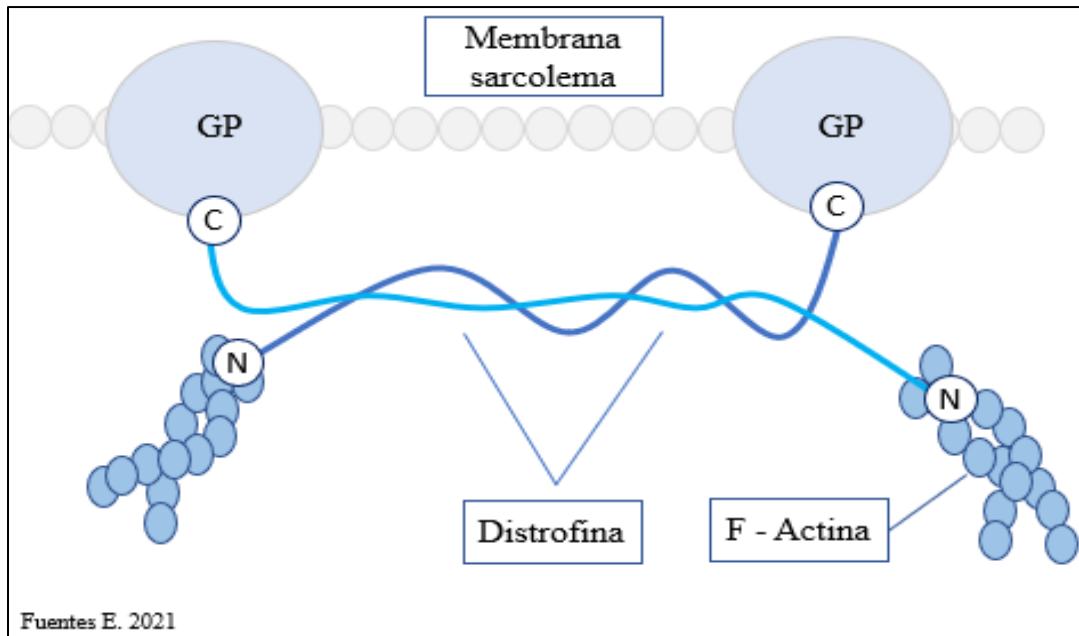
Las distrofinopatías son enfermedades neuromusculares de carácter hereditario que forman parte del grupo de las distrofias musculares y son causadas principalmente por mutaciones en el gen de la distrofina, las cuales presentan trastornos recesivos ligados al cromosoma X (1). Afectan específicamente al músculo esquelético causando una disminución del número y volumen de las fibras musculares, que se manifiesta por una reducción evidente del calibre del músculo, una sustitución de la porción atrofiada por tejido conectivo y grasa y por la ausencia total, parcial o un déficit funcional de distrofina, quien participa en la mantención de la estructura de las células musculares y además en el anclaje de las proteínas musculares citoplásmicas a la membrana celular. Dentro de ellas, se encuentran la distrofia muscular de Duchenne (DMD) y distrofia muscular de Becker (DMO) (2).

Las personas que padecen distrofinopatías pueden manifestar diferentes episodios de dolor muscular, alteraciones en la marcha, pérdida de masa muscular, desarrollo neuromuscular tardío, dificultad al respirar, tragar e incluso manifiestan miocardiopatía en una fase más avanzada (2). Estos signos y síntomas pueden variar en su grado de severidad si el paciente presenta alguna patología de base. Debido al daño muscular progresivo la mayoría de estas personas llegan a necesitar traslado mediante silla de ruedas (3).

### 5.1.1 Distrofina

El gen de la distrofina, uno de los más grandes encontrados en el ser humano, da origen a la proteína distrofina, la cual posee 3.685 aminoácidos y presenta cuatro dominios. Uno de ellos muestra homología con las regiones de la unión al extremo amino terminal de la  $\alpha$ -actina y de la  $\beta$ -espectrina (4). El siguiente dominio posee una serie de 24 repeticiones de 109 aminoácidos, los cuales constituyen una estructura helicoidal triple, dentro de la estructura mencionada se encuentra la presencia de regiones ricas en prolina, lo cual le brinda flexibilidad a la proteína, teniendo la acción de verdaderas bisagras moleculares. El tercer dominio tiene gran similitud con la región de unión al calcio de la  $\alpha$ -actina. El cuarto y último dominio, está constituido por 400 aminoácidos y posee la función de formar un complejo con las glicoproteínas de membrana (5).

Es una proteína que se localiza en la superficie intracelular del sarcolema a lo largo de toda la longitud de las miofibras y su función principal es estabilizar y amortiguar la contracción muscular al unir la actina a la capa de tejido conectivo que rodea cada fibra muscular (6). Cuando la distrofina está presente, la distribución de las fuerzas mecánicas se lleva a cabo de manera coordinada en las células musculares, lo que se conoce como sistema de fijación transversal entre miofibrillas y sarcolema (7). Sin embargo, cuando ésta no está presente, el músculo pierde el efecto protector y estabilizador otorgado por la distrofina. La conexión entre el citoesqueleto de actina y el tejido conectivo se pierde, produciendo un daño crónico en las fibras musculares durante la contracción, además de inflamación y sustitución de fibras musculares por grasa y tejido fibrótico, lo cual vuelve susceptible al músculo a un estrés mecánico y a una infiltración de calcio producto de la debilidad del sarcolema, lo que conlleva a una debilidad muscular, síntoma principal de la DMD (8).



**Figura 1: Interacción del complejo distrofina-glicoproteína.** La distrofina interactúa mediante sus extremos carboxilos terminales (C) con un complejo glicoproteico (GP) presente en la membrana del sarcolema y mediante sus extremos amino terminales (N) con la F-Actina. Fuente: Elaboración propia.

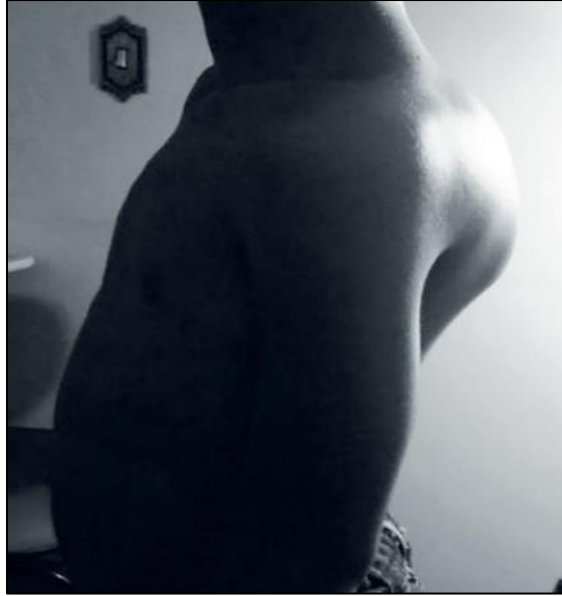
### 5.1.2 Distrofia muscular de Duchenne

La DMD es una enfermedad neuromuscular que se caracteriza por la mutación en el gen de la distrofina la cual presenta herencia recesiva ligada al cromosoma X, localizando su defecto en el brazo corto del cromosoma X locus 21 (Xp21) (1). Esta mutación provoca una ausencia de distrofina, proteína presente en el interior de la membrana de las células musculares. Los cambios histológicos se manifiestan desde el nacimiento, pero la sintomatología en estos pacientes se evidencia de los 3 a los 5 años (7).



La DMD afecta a 1 de cada 3.500 a 6.000 varones nacidos vivos y provoca la muerte en la segunda o tercera década de vida (7). En mujeres es menos común la manifestación de la enfermedad, sin embargo, se ha reportado en un estudio que aproximadamente el 8% de las portadoras de DMD manifiestan síntomas de debilidad muscular y miocardiopatía (9). El impacto de la DMD no está bien estimado en la población chilena, sin embargo, se manejan algunos datos estadísticos publicados en una revisión sistemática del año 2014, que indica que, para Chile, la tasa de prevalencia de DMD en cohorte de varones menores de 30 años, fue de 11,51 por cada 100.000 habitantes. Cabe destacar que la mayoría de los pacientes (85%) que tienen esta enfermedad se atienden en los centros de Teletón, siendo estos los que manejan más información estadística sobre esta población (10).

Esta enfermedad condiciona el desarrollo psicomotor del niño, viéndose afectado en 3 principales áreas. En el área respiratoria presentan importantes complicaciones dentro de las que se destacan la fatiga de los músculos respiratorios, hipoventilación nocturna, atelectasia, neumonía e insuficiencia respiratoria, las cuales cuando no son tratadas, los niños con DMD pueden llegar a manifestar una disnea grave, ingresos hospitalarios prologados e inclusive la muerte causada por un paro respiratorio o arritmias cardíacas inducidas por la respiración (11, 12). En el área cardiovascular la deficiencia de distrofina en el músculo cardíaco en estos pacientes puede manifestarse en una miocardiopatía. Cuando esta enfermedad progresa, el miocardio no cumple con las demandas fisiológicas y se desarrolla una insuficiencia cardíaca (11). Por otra parte, en el área musculoesquelética los pacientes con DMD comienzan a manifestar sus síntomas a muy temprana edad, dentro de ellos está la debilidad muscular progresiva a nivel axial, debido a que los músculos proximales contienen fibras grandes que soportan más peso y se ven afectadas antes que las fibras de los músculos distales, manifestándose con el signo de Gowers. Además, se ve afectada en gran manera su marcha debido a que tienen la tendencia de caminar en puntillas perdiendo esta función aproximadamente entre los 12 a los 14 años lo cual les hace necesitar una silla de ruedas para su traslado, facilitando la aparición de complicaciones ortopédicas graves como la escoliosis, además de contracturas, hiperlordosis y acortamiento de la musculatura impactando de manera negativa en su funcionalidad y tono muscular (13).



**Figura 2: Hiperlordosis en paciente con DMD.** Se aprecia la hiperlordosis y disminución del tono muscular en un paciente con DMD. Tomado de Viñet, L. 2018. (14)

El diagnóstico de esta enfermedad debe realizarse a muy temprana edad, para que de esta forma se realice una intervención precoz en el paciente. Ante una posible sospecha de DMD el primer análisis que se realiza en la clínica es la determinación de los niveles séricos de la enzima creatinfosfoquinasa (CPK) la cual aumenta de 10-100 veces sobre su valor normal desde el momento del nacimiento. La DMD es el primer diagnóstico que se debe considerar en un niño menor a 5 años con una CPK que está en un rango muy elevado (15). Dentro del proceso diagnóstico una de las técnicas usadas es la biopsia muscular, proceso altamente invasivo, la cual a través de microscopía evidencia la pérdida de la integridad de la fibra muscular, con necrosis, fagocitosis y regeneración asociada a fibrosis y reemplazo por tejido adiposo (3). Mediante técnicas de inmunohistoquímica se comprueba la deficiencia de distrofina y las alteraciones presentes en las estructuras celulares de los tejidos implicados (13).

El manejo terapéutico de la DMD es multidisciplinario y se basa principalmente en la sintomatología del paciente. El tratamiento tiene como objetivo mejorar la funcionalidad y la calidad de vida de ellos, tratando las complicaciones causadas por esta enfermedad y evitando su progresión. Dentro de los tratamientos más comunes en la DMD, está el tratamiento farmacológico en el cual son utilizados los corticosteroides, específicamente la Prednisona que tiene un efecto antiinflamatorio y aumenta la fuerza del músculo y el Deflazacort el cual favorece la regeneración muscular (16). Ambos han demostrado ser efectivos deteniendo la progresión de la enfermedad y prolongando la esperanza de vida de estos pacientes hasta la tercera o cuarta década. Sin embargo, gran parte de quienes padecen la DMD no toleran el uso crónico de corticoides debido a la aparición de efectos adversos, mientras que otros no responden a esta terapia de manera satisfactoria (3). Las cardiomiopatías distróficas se pueden tratar mediante el uso de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos y glucocorticoides, los cuales retrasan la insuficiencia cardíaca. Otra droga que ha sido investigada como beneficiosa en cardiomiopatía distrófica, especialmente en DMD, es la apocinina, la cual es un agente desacoplante de las NADPH oxidasas. Al inhibirse la función de estas enzimas, se logra disminuir la producción de ROS, y por ende, logra prevenir la apoptosis en células cardíacas, revirtiendo así, la remodelación ventricular (17).

## **5.2 Miocardiopatía en la enfermedad de Duchenne**

La miocardiopatía es una enfermedad del tejido muscular cardíaco, el cual manifiesta diferentes alteraciones que dan como resultado una disminución considerable de la función normal del corazón en varios parámetros (18). Inicialmente las miocardiopatías eran asociadas a patología inflamatoria, pero que luego, con el paso del tiempo se logró asociar esta enfermedad con múltiples desordenes de causa desconocida o con enfermedades sistémicas que gatillaban la aparición de daño en el músculo cardíaco. Actualmente se ha logrado identificar y responsabilizar a una gran cantidad de agentes etiológicos genéticos, pero aún, a pesar de muchos estudios y una intensa investigación no se ha logrado comprender la totalidad de factores que participan en el desarrollo de la miocardiopatía (19).

Ya que es imposible negar la importancia de la patología del miocardio como causa de deterioro y muerte asociada a la enfermedad del corazón, fue necesario en el proceso desarrollar una clasificación de las miocardiopatías, con el fin ordenar y entender el desarrollo fisiopatológico de estas, buscando de esta manera optimizar el enfoque clínico en el tratamiento paliativo de estas (19). En esta labor de crear una clasificación ha sido considerable el esfuerzo investigativo de múltiples organizaciones como la American Heart Association y la European Society of Cardiology, que, a pesar de sus numerosos y contundentes avances, dejan algunas áreas de incertidumbre y discrepancias que pueden ser cuestionadas. Más recientemente surgió la clasificación de MOGE(S), la cual considera en mayor medida los descubrimientos en genética molecular y constituye un sistema descriptivo de nomenclatura y notación enfocado al diagnóstico clínico, aplicando un conocimiento más amplio de las bases fisiopatológicas y genéticas de las miocardiopatías existentes. A pesar de lo anterior una de las clasificaciones más usadas son las dictadas por organizaciones de gran peso internacional como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la World Heart Federation (WHF) (18, 19).

**Tabla 1:** Desarrollo cronológico de las distintas clasificaciones para las miocardiopatías, adoptadas en los últimos 60 años. Tomado y adaptado de Estigarribia, J. 2019. (19)

<b>Año</b>	<b>Definición / Clasificación</b>
1956	Las enfermedades del miocardio se clasifican en dos: miocarditis (enfermedad inflamatoria) o miocardosis (todas las otras patologías degenerativas asociadas).
1957	Se propone el termino miocardiopatía para la enfermedad del músculo cardíaco, enfatizando en la causa infecciosa de la miocarditis.
1961	Se definen las miocardiopatías y se clasifican en congestiva, constrictiva y obstructiva.
1980	Se les da nueva definición a las miocardiopatías enfatizando en su origen desconocido y se dividen las enfermedades relacionadas en dos grupos, uno es el de las “ <i>enfermedades específicas del músculo cardíaco</i> ” con origen conocido

	y no ligado a miocardiopatía y por otro lado el de las <i>“miocardiopatías inclasificables o latentes”</i> .
1995	La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la International Society and Federation of Cardiology (ISFC), definen las miocardiopatías como <i>“enfermedades del miocardio asociadas con disfunción”</i> y cambian la definición de <i>“enfermedades específicas del músculo cardíaco”</i> por el de <i>“miocardiopatías específicas”</i> para las afectaciones del miocardio conocidas.
1998	La ISFC cambia su nombre a World Heart Federation (WHF)
2006	La American Heart Association (AHA) crea su propia definición de las miocardiopatías y las clasifica en primarias y secundarias según sea el contexto clínico de la misma. Considera por primera vez los avances y descubrimientos genéticos y moleculares.
2008	La European Society of Cardiology (ESC) define a las miocardiopatías como <i>“desordenes del miocardio en los cuales el músculo cardíaco es estructural y funcionalmente anormal”</i> . Además, divide las miocardiopatías en dilatada, hipertrófica, restrictiva, arritmogénica e inclasificadas y las divide también en familiar y no familiar.
2013	La nosología WHF – MOGE(S) ofrece una nomenclatura y notación descriptiva en base al fenotipo y genotipo con la finalidad de realizar un diagnóstico clínico y realizar investigación.

Ya comprendiendo a grandes rasgos los conceptos y el desarrollo del conocimiento que se tiene hasta hoy sobre las miocardiopatías, es imposible evitar la asociación que tiene la aparición de estas en la distrofia muscular de Duchenne, de hecho, más del 90% de los pacientes con esta enfermedad desarrollan miocardiopatía la cual se ve acompañada de arritmias ventriculares graves, insuficiencia cardíaca y finalmente la muerte, de hecho se estima que un 40% de los pacientes con DMD mueren a causa de la insuficiencia cardíaca (20, 21). Es importante considerar, que, de las clasificaciones de miocardiopatías antes mencionadas, la que desarrolla en mayor medida el individuo con DMD (25 a 90% de los casos) es la miocardiopatía dilatada, que se caracteriza por la dilatación (en la mayoría de los

casos severa y acompañada de hipertrofia) y disfunción contráctil principalmente del ventrículo izquierdo o bien de ambos (22). En la miocardiopatía dilatada, desarrollada por estos pacientes, se destaca la sustitución evidente del tejido cardíaco normal por tejido graso y fibroso, lo que altera el funcionamiento adecuado del corazón, manifestándose en alteraciones medibles en los exámenes clásicos que evalúan la función del corazón como el electrocardiograma (ECG), lo que es útil en el diagnóstico de estos pacientes. En el electrocardiograma de pacientes con DMD las principales alteraciones electrocardiográficas que se encuentran son la taquicardia sinusal, acortamiento del intervalo PR, derivaciones precordiales izquierdas y otras, que en su conjunto sugieren una sobrecarga ventricular (23). Sumado a lo anterior, la cardiografía eco-Doppler sirve para evaluar la anatomía y funcionalidad del sistema cardiovascular en estos pacientes, permitiendo diagnosticar precozmente la disfunción ventricular izquierda, proporcionando así información para aplicar tratamiento paliativo en los pacientes. En si las anomalías más comunes en el ecocardiograma son los trastornos de contractilidad del tejido muscular del corazón. En conjunto las anomalías electrocardiográficas y ecocardiográficas son ocasionadas por un proceso degenerativo que incluye fibrosis y sustitución del tejido cardíaco normal por tejido graso, que en etapas finales de la enfermedad puede llevar hasta la muerte (24).

Si bien no se ha logrado identificar el mecanismo puntual que origina la miocardiopatía en la enfermedad de Duchenne, se han descrito algunos predictores genéticos asociados al gran y amplio gen de la distrofina, dentro de los cuales tenemos que el exón 12 y mutaciones del 14 al 17 podrían considerarse factores de riesgo para desarrollar la patología, mientras que, por otro lado, mutaciones en los exones 51 y 52 son considerados factores protectores. Además de los ya mencionados, se ha encontrado alteraciones en los exones 31 y 42 los que se encuentran ligados a la forma de inicio de la miocardiopatía (24).

Es importante tener en conocimiento que el daño miocárdico que tienen las personas afectadas por la enfermedad de Duchenne se encuentra potenciado y asociado a muchos otros factores, dentro de los cuales ha llamado mucho la atención la expresión y función anormal de algunas enzimas que generan estrés oxidativo dañino para el tejido, ya que la elevada

producción de especies reactivas del oxígeno desencadena daño a proteínas, lípidos y otras macromoléculas presentes en el tejido cardíaco (25). Gracias al mecanismo de daño antes mencionado y su asociación con la proteína conexina 43 que forma uniones comunicantes en el corazón, se ha logrado generar múltiples hipótesis sobre como estos dos mecanismos en conjunto generan daño en el miocardio de pacientes con DMD (17). Sin ir más allá, se ha hecho evidente que el estrés cardíaco induce estrés oxidativo e hiperactividad de la proteína quinasa II dependiente de calcio calmodulina y del receptor 2 de rianodina, lo que desencadena arritmias ventriculares y desequilibrio en la homeostasis del calcio, lo que a la larga afecta los potenciales de membrana de las células del músculo cardíaco (21).

### **5.3 Uniones celulares.**

La comunicación entre las células de los organismos pluricelulares es un proceso fundamental para mantener una adecuada organización y funcionalidad de diversos tejidos y órganos. Las interacciones o uniones celulares actúan como verdaderos puentes entre una célula y otra adyacente y la matriz extracelular, constituyéndose como una vía de señalización directa de diversas moléculas, segundos mensajeros, iones y otros (26).

A grandes rasgos las funciones de las uniones celulares podrían resumirse en tres, la primera de ellas correspondería a la adhesión o anclaje entre células o entre estas mismas y la matriz extracelular, lo cual podemos ejemplificar o evidenciar en las uniones adherentes de la epidermis; la segunda función sería de oclusión y aislamiento de diferentes ambientes celulares, lo que se puede evidenciar en las uniones estrechas del intestino; y finalmente, la tercera función es la de comunicación o nexos, ejemplificado por las uniones comunicantes entre las células cardíacas de vertebrados (27). En resumen, de lo anterior podríamos clasificar las uniones celulares en tres grupos claramente constituidos, los cuales serían las uniones de oclusión, uniones de anclaje y las uniones comunicantes (28).

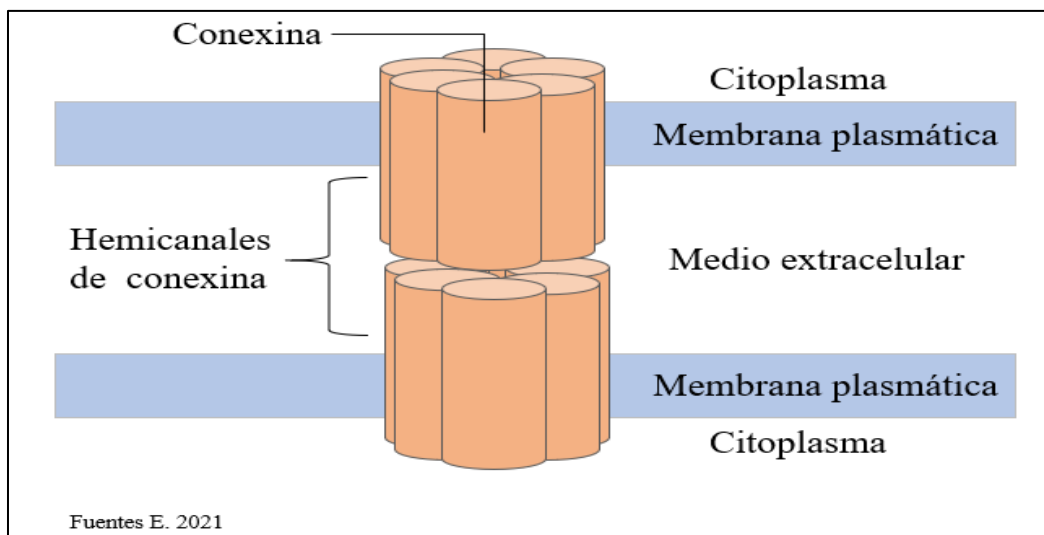
### 5.3.1 Uniones gap

De acuerdo con lo recientemente mencionado, centraremos nuestra atención de manera especial en las uniones comunicantes, también conocidas como uniones GAP. Estas uniones son fundamentales para todos los animales multicelulares, los cuales necesitan de un enorme grado de coordinación entre las células para mantener el funcionamiento correcto del organismo vivo (29). Las uniones GAP son por proteínas integrales de membrana las cuales facilitan el intercambio de iones y metabolitos con un peso molecular bajo, todo esto gracias a la formación de dos HCs alineados frente a frente entre las células adyacentes, lo que permite que el citoplasma de una célula se comuniquen directamente con el de la otra. La existencia de estas conexiones es vital en el funcionamiento fisiológico animal, participando desde la propagación de una señal eléctrica, hasta la coordinación de la señalización celular por medio de segundos mensajeros (30).

Las uniones gap se han descrito inicialmente como poros inespecíficos entre células adyacentes, por los cuales se permite el flujo de moléculas de hasta 1 Kilodalton (kDa) de masa molecular (30). Sin embargo, el desarrollo de múltiples estudios ligados a la estructura, regulación, ensamblaje y expresión ha demostrado que estos antes llamados poros, poseen procesos bastante más selectivos de lo que se pensaba, considerando no solo el aspecto físico de las moléculas, sino que también factores estéricos, de carga y otros (29). A pesar de esto, los mecanismos físicos por los cuales se establece el corte de selectividad de estos canales no se encuentran bien definido, a causa de que existen alrededor de 20 isoformas de conexinas entre las cuales varían las propiedades de permeabilidad. Sin embargo, si se conoce que las propiedades de la permeabilidad están reguladas por modificaciones postraduccionales reversibles como la fosforilación y por interacciones proteína-proteína, que permiten, bajo ciertas circunstancias el paso de iones y moléculas como el ATP, ADP,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{AMP}_c$ ,  $\text{IP}_3$ , glutamato y glutatión (30). En resumen, el grado penetración de diversas moléculas ha servido experimentalmente para definir el rol fisiológico, e incluso la implicancia fisiopatológica de las isoformas de conexinas (29).



Finalmente, es necesario resaltar que los HCs constituidos por diferentes isoformas de conexinas poseen funciones propias y que no pueden ser remplazados por el funcionamiento de cualquier otra isoforma. Por ejemplo, el remplazo de la conexina 43 por la conexina 31 probado en un estudio realizado por Zheng-Fischhöfer en 2006 (31), generó HCs que condujeron a defectos funcionales y anatómicos en la morfogénesis cardíaca en ratones. Sumado a lo anterior, un estudio realizado por Winterhager en el 2007 (32), mostró que la sustitución de la conexina 43 por conexina 26 desencadenaba en ratones, disfunciones en los órganos reproductores y una conducción ventricular más lenta en el corazón. En resumen, los HCs poseen funciones vitales en determinados tejidos y no pueden ser remplazados por HCs constituidos por otras conexinas.



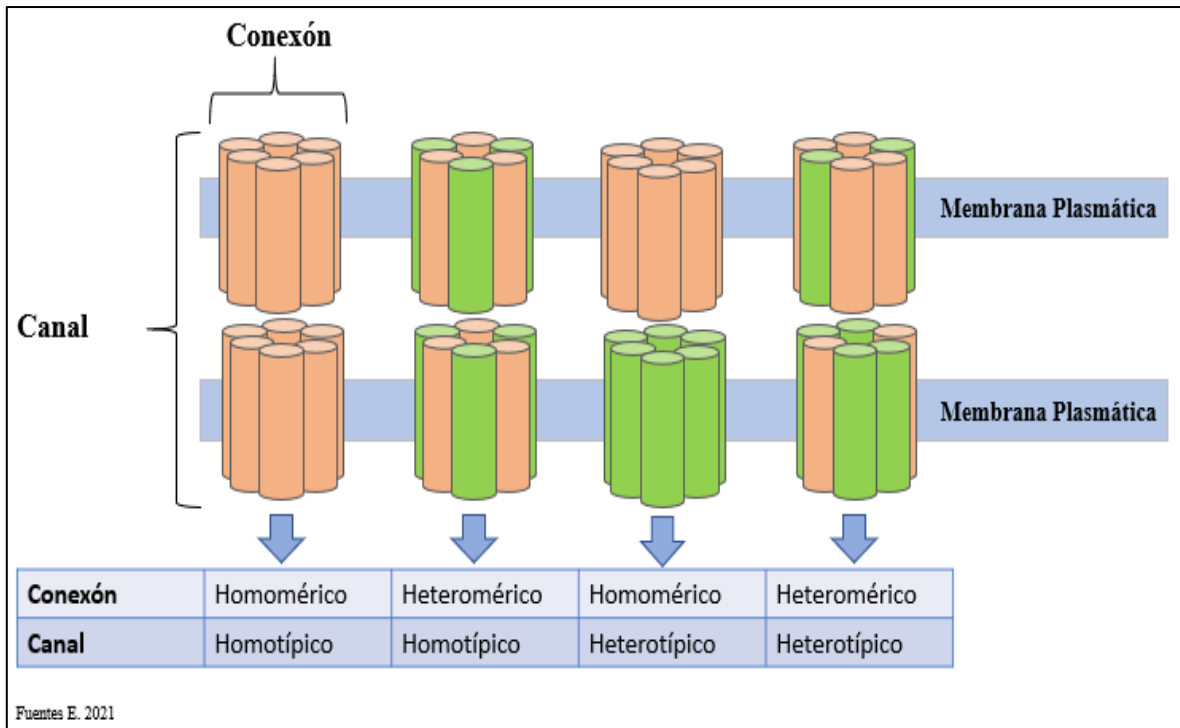
**Figura 3: Disposición de los hemicanales de conexina en la unión gap.** Dos HCs de conexina se alinean uno frente al otro para formar la unión gap que comunica los citoplasmas de dos células adyacentes. Fuente: Elaboración propia.

### 5.3.2 Conexinas

Las conexinas son proteínas de dominio transmembrana presentes en las uniones gap y que participan en la formación de los HCs que permiten la comunicación entre dos células adyacentes. El nombre de las diversas isoformas de conexinas viene dado por el peso molecular que tengan, por ejemplo, la conexina 43 posee un peso molecular aproximado de 43 kDa (30). Estas proteínas están presentes en muchos tejidos celulares de organismos vertebrados, mientras que en organismos invertebrados las uniones gap están constituidas por innexinas. Sin embargo, algunos vertebrados y otros organismos marinos llamados cordados poseen homólogos de las innexinas, llamados pannexinas (33).

La existencia de conexinas en los seres humanos es fundamental. Según Nielsen en el año 2012 (30), en el ser humano se reconoce la presencia de 21 conexinas, mientras que Beyer en el año 2018 (33), indica la presencia de tan solo 20. Si bien la expresión de estas diversas isoformas proteicas es bastante universal en los tejidos humanos, es necesario mencionar que no se encuentran presentes en algunos tejidos, en su mayoría móviles, como los eritrocitos, espermatozoides maduros y músculo esquelético diferenciado (30).

Un aspecto interesante de considerar es que las células pueden coexpresar más de una isoforma de conexina para constituir un canal. En el caso de los HCs heteroméricos, se expresa más de una isoforma de conexina, mientras que un canal constituido por solo una isoforma de conexina recibe el nombre de homomérico. Así también, cuando las conexinas idénticas forman HCs célula-célula se denominan homotípicas, mientras que las conexiones entre células por canales de diferentes composiciones de conexinas se les denomina heterotípicos (30).



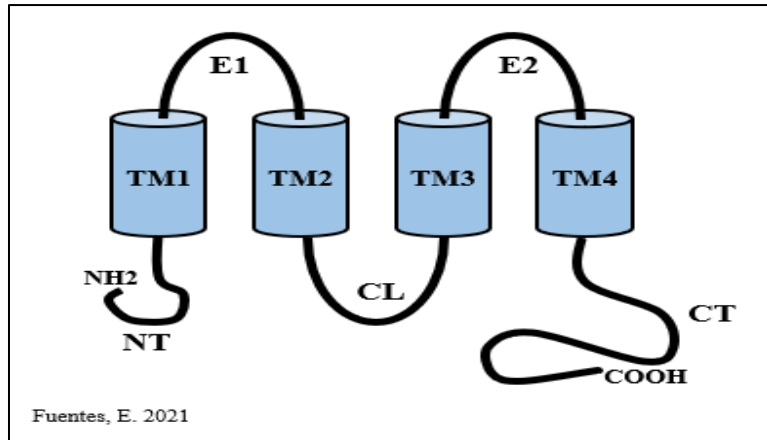
**Figura 4: Posibles composiciones de los canales de conexinas.** Se visualizan las posibles composiciones de los canales de unión gap. Las conexiones homoméricas formadas por un solo tipo de conexina, mientras que las conexiones heteroméricas poseen más de un tipo de conexina. Por otro lado, las conexiones célula-célula con la misma composición de conexinas se les denomina homotípicas y a las conexiones con diferente composición de conexinas se les denomina heterotípicas.

Las conexinas pueden formar las uniones gap y constituir el acoplamiento de múltiples células, sin embargo, también pueden realizar algunas funciones de no acoplamiento manifestadas en la membrana plasmática, estableciendo una estructura llamada hemicanal (HC), la cual no se acopla a otra célula contigua (34). Al abrirse los HCs pueden ejercer diversos efectos fisiológicos que incluyen desde la señalización paracrina hasta la regulación de la apoptosis celular. Sumado a lo anterior, también las conexinas desempeñan funciones a nivel nuclear y mitocondrial, incluso asociándose a otras proteínas para llevar a cabo estas diversas funciones, esto demuestra la amplia gama de funciones en las que pueden llegar a participar las conexinas (30).

### 5.3.3 Estructura de las conexinas

Las conexinas son proteínas de dominio transmembrana, el conjunto de seis de ellas establece la unión gap. Sin embargo, es de gran importancia conocer la estructura de una conexina vista de manera individual. Las conexinas poseen dos bucles extracelulares denominados E1 y E2, que contienen 31 y 34 aminoácidos respectivamente, conectados por enlaces disulfuros intramoleculares, los cuales brindan continuidad a la estructura, conectando en pares los dominios. Estos bucles extracelulares E1 y E2 poseen en todas las conexinas tres residuos de cisteína conservados, lo que concuerda con los enlaces disulfuros ya mencionados (35). Un bucle une al dominio TM1 con el dominio TM2, mientras que el segundo bucle extracelular conecta el dominio TM3 con el TM4. Por otro lado, en la cara citoplasmática de la membrana se presenta el bucle intracelular o bien bucle citoplasmático, específicamente entre los dominios TM2 y TM3 (30). El esquema topológico de esta estructura fue confirmada al estudiar la conformación básica de conexinas como la 43, 32 y 26 por muchos investigadores y hasta la fecha no se ha descubierto estructuras de conexinas que hagan excepción a estos modelos (35).

El grado de conservación en las secuencias de cada conexina es bastante alto, sobre todo en los cuatro dominios transmembrana, bucles extracelulares y el extremo N-terminal. Mientras que, por otro lado, el segmento de las conexinas que presenta mayor grado de variabilidad en cuanto a su secuencia y tamaño es el bucle extracelular, tanto como el largo y estado modificado postraducciona del dominio C-terminal (35).



**Figura 5: Estructura representativa de una conexina.** Las conexinas conservan alto grado de homología entre sus isoformas, manifestando cuatro dominios transmembrana (TM), dos bucles extracelulares (E1 y E2), un bucle citoplasmático (CL), un extremo N-terminal (NT) y uno C-terminal (CT).

### 5.3.4 Biosíntesis, acoplamiento y degradación de las conexinas

Como proteínas integrales, mediante el ARNm las conexinas comienzan su síntesis a nivel del retículo endoplasmático rugoso (RER), para luego transportarse hasta el aparato de Golgi, transporte que será mediado por COP II, un complejo proteico de cubierta vesicular, que se encarga del transporte de moléculas desde el RER hasta el Golgi, lo cual dependerá de la acción de la GTPasa Sar1, sin embargo, es importante resaltar que la GTPasa involucrada en este proceso dependerá exclusivamente de la isoforma de conexina implicada (30). Una vez en el aparato de Golgi se realizará el plegado y oligomerización de la proteína (36).

Posteriormente, a través la red del trans-Golgi, que consiste en un complejo sistema de estructuras tubulares y cisternas, luego de realizarse el ensamblaje de las proteínas conexinas, se procede a realizar el transporte de estas hacia la membrana plasmática utilizando el citoesqueleto celular. Una vez en ese lugar, se propaga en la región de las uniones gap por una vía dependiente de microtúbulos, dineína,  $\beta$ -catenina y N-Cadherina (37). El transporte

de las conexinas hasta la membrana celular en la mayoría de los casos es dependiente de los microtúbulos, como lo es el caso de la conexina 43 (38). Sin embargo, hay algunas conexinas que no dependen de microtúbulos para su transporte como la conexina 26, 30 y 31 (39-41).

Las conexinas tienen una vida corta dentro de la célula, siendo esta de tan solo una a cinco horas y su degradación ocurre gracias a la acción de mecanismos lisosomales y proteasomales, en donde juega un rol importante la ubiquitinación y fosforilación para llevar a cabo la internalización de las placas de unión gap y degradación de conexinas (42). La dirección de internalización y degradación realizada por los lisosomas se logra mediante la monoubiquitinación, mientras que, por otro lado, la poliubiquitinación se dirige a la degradación proteasomal, aunque este último mecanismo también puede ser independiente de ubiquitina. La importancia y rol proteasomal fue descubierto gracias al uso de inhibidores proteosómicos que causaban el aumento de contenido de conexina 43 en 6 veces (43). Se conoce que la ubiquitinación, endocitosis y degradación es realizada en respuesta a EGF, ésteres de forbol, TNF alfa y otros, los cuales han sido descubiertos en su mayoría mediante el estudio de la conexina 43. El proteosoma solo degrada las proteínas no plegadas y su rol en la degradación de las conexinas aún no es muy claro (30, 44). Finalmente, complementando a los mecanismos ya mencionados, es importante señalar que la autofagia es fundamental en la degradación de las conexinas en donde se forma una estructura de doble membrana visible por microscopía electrónica convencional, este mecanismo va de la mano con el mecanismo de degradación lisosomal, ya que el material que se desea degradar primero es secuestrado por una membrana de aislamiento, que formará una vesícula de doble membrana (autofagosoma), que luego se fusiona con el lisosoma y degrada el contenido, esto es fundamental en la supervivencia celular (42).

### **5.3.5 Enfermedades asociadas a conexinas humanas**

La mutación genética de tan solo un gen de conexina puede influir en múltiples canales, lo que se asocia a la gran variedad de enfermedades que se pueden expresar. Sobre todo, al considerar que son secuencias específicas del dominio E2 las que permiten la compatibilidad en el acoplamiento entre conexinas, por lo que hace suponer que si mutasen estas secuencias específicas, pudiera afectar la compatibilidad de la conexina con muchas otras que antes eran compatibles (45). Lo anteriormente señalado, se ve potenciado por el hecho de que la función específica que desempeña una determinada conexina no puede ser remplazada por otra isoforma, aún más, el remplazo o sustitución de una conexina puede llevar al desarrollo de una determinada enfermedad (31).

Las mutaciones en los genes de conexina humana se han relacionado fuertemente con enfermedades, a las cuales se le denominan conexinopatías (45). Existe una amplia gama de enfermedades asociadas a las conexinas, dentro de las que podemos encontrar la sordera sindrómica o no sindrómica asociada a conexina 26 y 30, la enfermedad de Charcot Marie Tooth asociada a conexina 32, displasia y cardiopatías asociadas a conexina 43 e incluso cataratas ligadas a la conexina 46 y 50. Sin embargo, a pesar de que existe la asociación evidente del rol que juegan las conexinas en estas patologías, los mecanismos moleculares no se encuentran bien identificados en la patogénesis de estas enfermedades (46).

**Tabla 2:** Principales enfermedades asociadas a mutaciones en conexinas humanas.

Fuente: Elaboración propia Fuentes, E. 2021.

<b>Proteína alterada</b>	<b>Enfermedad asociada</b>	<b>Referencia</b>
Conexina 26	-Sordera sindrómica o no sindrómica. -Hiperqueratosis palmoplantar. -Síndrome de Vohwinkel. -Síndrome de Bart-Pumphrey.	(46-49)
Conexina 30	-Sordera autosómica dominante. -Sordera autosómica recesiva.	(45)
Conexina 32	-Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth. -Atrofia muscular progresiva y pérdida sensorial variable.	(50, 51)
Conexina 40	-Fibrilación auricular.	(45)
Conexina 43	-Displasia oculodentodigital. -Distrofia muscular de Duchenne. -Displasia craneometafisaria. -Fibrilación auricular.	(45, 52-54)
Conexina 46 y 50	-Cataratas.	(55, 56)
Conexina 47	-Leucodistrofia hipomielinizante. -Paraplejia espástica. -Linfedema autosómico recesivo. -Enfermedad similar a Pelizaeus-Merzbacher 1.	(45, 57)



## 5.4 Hemicanales

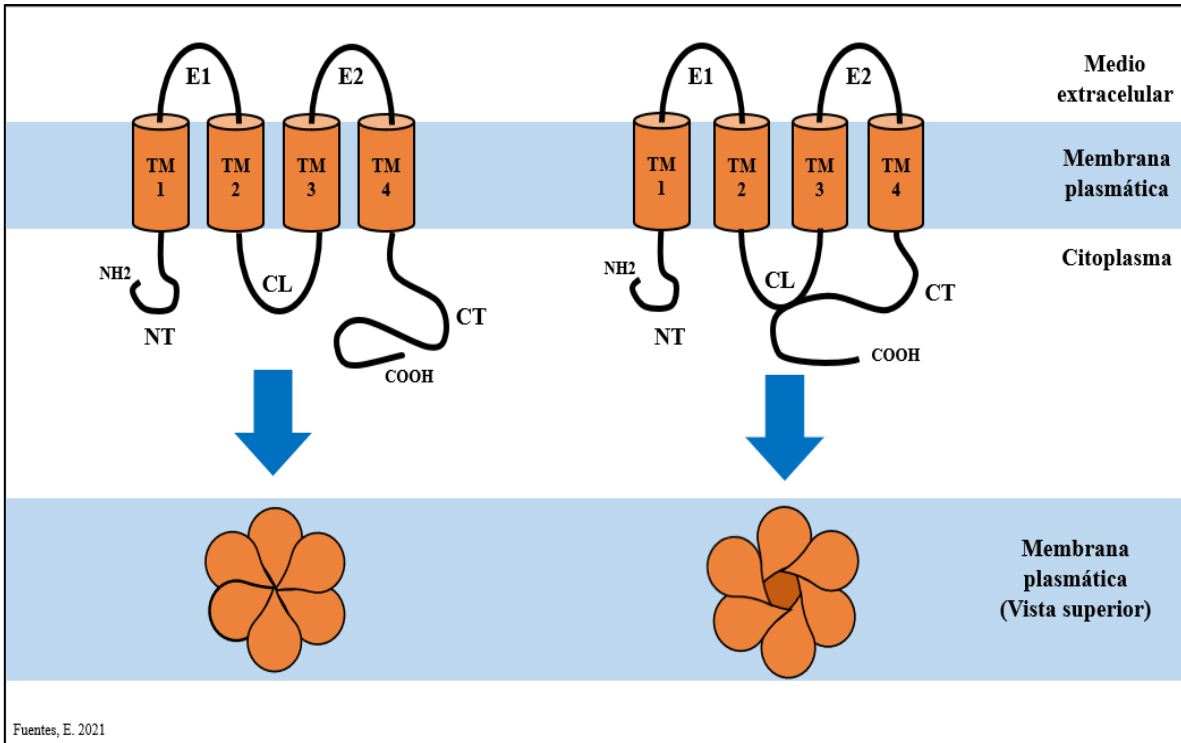
Desde ya varias décadas se ha investigado el rol y función que desempeñan las uniones gap en los diferentes tejidos celulares, sin embargo, la atención sobre los HCs y las funciones que pueden cumplir es un enfoque mucho más reciente. A partir de la década del año 1990 se logró comprender que los que los HC poseen funciones al abrirse, sin la necesidad de que estuviesen formando un canal gap, lo que da lugar a una forma directa de comunicación con el medio extracelular, ampliando de esta manera el concepto funcional que se poseía de las conexinas (58). Existen numerosas publicaciones acerca de los HC, sin embargo, la mayoría de estas se centran en el rol de los HC al constituir uniones gap. Con el avance del tiempo se ha demostrado una expresión normal de los HCs, como, por ejemplo, se ha reportado que los astrocitos y las células endoteliales no forman uniones gap, sino que las conexinas en los pies terminales astrocíticos pueden funcionar solamente como HC, similar a lo que sucede con la Cx43 en la microglía (59).

Los HC pueden ser definidos de manera simple como la mitad de un canal gap, o bien una estructura hexamérica compuesta por proteínas conexinas o pannexinas, las cuales no se unen a un HC ubicado en una célula contigua. De cierta forma, los HC representan las subunidades funcionales de las uniones gap, los cuales, luego de ser transportados a su destino en la membrana, permanecen sin aparear. Es importante mencionar que gran parte del conocimiento que se tiene sobre los HCs ha sido gracias a estudios iniciales en astrocitos (60-62).

Aunque la gran mayoría de HC se acoplan para funcionar como uniones gap también se han publicado artículos que defienden la funcionalidad de los HC sin la necesidad de formar GJ. Se establece que bajo condiciones fisiológicas los HC permaneces cerrados y solo se abren bajo factores de estrés o señales específicas. De hecho, la apertura del HC se encuentra ligado a la pérdida de gradientes iónicos y de metabolitos de pequeño tamaño, aumento de la osmolaridad celular y al movimiento de calcio (63). A pesar de esto, la apertura de HC

regulada por señales puntuales también ha sido asociado a mecanismos de supervivencia celular y a la liberación de permeantes que permiten realizar funciones biológicas y fisiológicas normales. Dentro de estos permeantes se encuentra el ATP, el cual al ser liberado participa en la señalización purinérgica, interactuando con el receptor P2Y2, P2Y7 y P2X1, fomentando los procesos inflamatorios, fibróticos y arrítmicos, lo cual caracteriza la fisiopatología cardíaca (36). También se libera la prostaglandina E2 (PGE2), NAD<sup>+</sup> y el glutamato, los cuales al salir por los HCs pueden originar respuestas fisiológicas específicas (36). También se ha visto la participación de los HCs en la supervivencia de osteoblastos, remodelación ósea e incluso en la regulación de genes asociados a la cicatrización de heridas en fibroblastos gingivales (64). Sin embargo, la liberación de permeantes de manera descontrolada o desregulada acelera la muerte celular en diversos eventos patológicos (65). A pesar de la evidencia que pretende otorgar un rol fisiológico a los HCs, la asociación es más orientada a la participación de estos en eventos patológicos, por ende, no está claro si los HC poseen alguna función fisiológica (66).

A diferencia de las GJ los HC se encuentran normalmente cerrados, excepto en las mitocondrias, en donde el fuerte campo eléctrico del potencial de membrana mitocondrial mantiene abierto a los HC. La apertura y cierre de los HC se encuentra fuertemente regulada, la apertura de estos es mediada por mecanismos de estrés celular como la hipoxia/reoxigenación y el estrés metabólico, además de estímulos de naturaleza eléctrica (como cambios en el potencial de membrana) o química (como cambios en la concentración de calcio intra o extracelular) (67). Sumado a lo anterior, la concentración de calcio intracelular moderada promueve la apertura de los HCs a través de señalización dependiente de calmodulina, pero en elevadas concentraciones inhibe la apertura al interrumpir la interacción de la cola C-terminal con el bucle citoplasmático (66). En el proceso de apertura y cierre de los HC es importante comprender que la interacción CT-CL influye poderosamente en la función de las GJ y HC. En el caso de las GJ se sabe que la ausencia de interacción de CT y CL origina su conformación abierta, mientras que en el caso de los HC la conformación será cerrada. Tras la interacción de CT con CL, las GJ se cierran, mientras que los HC se abren (66).



**Figura 6: Mecanismo de apertura de un hemicanal de conexina.** En el lado izquierdo de la figura se aprecia un HC cerrado producto de la ausencia de interacción entre CT y CL. Al lado derecho de la imagen el HC se encuentra abierto gracias a la interacción entre CT y CL.

**Tabla 3:** Regulación de la actividad de algunos HCs de conexina. Tomado y adaptado de Chandrasekhar, A. 2012. (65)

<b>Estímulo</b>	<b>Efecto sobre hemicanales</b>
Estimulación mecánica	Aumenta la expresión de la superficie y abre los HCs de Cx43
pH	pH menor a 6.5 cierra los canales de Cx26 y Cx46, y pH mayor a 7.6 abre canales de Cx26 y Cx46
Ca <sup>+2</sup>	Concentraciones fisiológicas e intracelulares muy elevadas cierra canales de Cx43 y Cx32
	Concentraciones extracelulares bajas o intracelulares patológicamente altas abren canales de Cx43 y Cx32
Fosforilación	Cx43 fosforilada generalmente forma canales cerrados y la desfosforilación durante la isquemia se asocia con canales abiertos
Nitrosilación	Activa la apertura de HCs de Cx43 y Cx46
Infección bacteriana	Aumenta la actividad HC de Cx43 en las células endoteliales

Uno de los mayores obstáculos para definir los HCs y su asociación con algún evento biológico radica en el hecho de que existen otras proteínas o macromoléculas de las cuales se debe descartar la participación. Esto debido a que los HCs de conexinas comparten propiedades biofísicas y reguladoras con pannexinas, receptores CALHM1 y P2X. Además, la inexistencia de inhibidores específicos para estos HCs ha complicado aún más la posibilidad de dilucidar la función de estos (68). A pesar de esto, con el tiempo se ha logrado desarrollar algunos péptidos útiles en este asunto, como el péptido L2, Gap19 y RRNY, siendo este último capaz de inhibir potentemente la apertura del HC de Cx 43 en la membrana plasmática, sin inhibir las GJ. También se ha reportado el uso de Peptide5 con la capacidad de inhibir los HCs sin actuar sobre las GJ, cuando es usado en bajas concentraciones (66, 67).

Los HCs posibilitan el paso libre de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , lo cual puede ocasionar inflamación celular y facultar el ingreso de  $\text{Ca}^{+2}$  lo que puede originar sobrecarga de este promoviendo el escape de varias moléculas, como ATP, glutamato, lactato,  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{IP}_3$ ,  $\text{PGE}_2$  y glutatión (69, 70). También, los HCs permiten la entrada de moléculas, siempre que exista una fuerza impulsora química o electroquímica. Sin embargo, la mayor importancia radica en la salida de moléculas, ya que se estima según un estudio realizado por Esseltine y Laird en el año 2016 que la salida de moléculas desde HC abiertos ronda en varias decenas de miles (71). Esta salida de moléculas no solo se ha asociado a los estímulos previamente mencionados, sino que también se ha reportado la participación de mutaciones que otorgan ganancia de función a los HC, teniendo como ejemplo mutaciones en Cx43 que inducen un aumento en la fuga de moléculas (66, 72).

Si bien se ha descrito la participación de los HCs mayoritariamente ligada a la liberación de moléculas, es pertinente mencionar que existen estudios que han demostrado la participación de los HCs en la adhesión celular, sin la necesidad de formar GJ. Siempre se ha asociado a las cadherinas con la adhesión celular inicial, sin embargo, se ha reportado que el acoplamiento de HCs de conexina dirige y estabiliza el contacto celular desde el principio, observándose que las células con altos niveles de expresión de Cx se unen buscando la adhesión con aquellas células con niveles de Cx más bajos. Esta capacidad mencionada no se correlacionó con la formación de uniones gap (73).

Finalmente, es importante mencionar que la apertura anómala de HC se ha asociado fuertemente a la ocurrencia o desarrollo de múltiples enfermedades como la enfermedad inflamatoria crónica, en donde la apertura del HC genera un gradiente masivo de señalización que juega un papel clave en el edema celular, extensión de la lesión y respuestas inmunitarias innatas como adaptativas. También se ha reportado la participación de HCs impulsando la progresión del cáncer de mama mediante regulación inflamatoria (74). Además de otras enfermedades dérmicas, renales y cardíacas (75, 76). En sí, las múltiples señales patológicas desencadenan la apertura de los HCs, lo que ocasiona que se eleven hasta niveles patológicos algunos estimuladores inflamatorios extracelulares, dentro de los cuales destaca el ATP, la

aparición de ondas de calcio y cambios en la composición iónica citoplasmática que lleva a la apoptosis o a la pérdida de la capacidad de la célula para osmorregular, ocasionando daño a múltiples tejidos asociados a la expresión de HCs (36).

## **5.5 Principales conexinas expresadas en miocardio**

Es de conocimiento que las conexinas (Cx) se expresan en diferente grado según sea el tejido implicado. Sin embargo, a nivel del corazón son solo algunas conexinas las que tienen mayor grado de expresión, dentro de las cuales se puede destacar a 5, que son la Cx30.2, Cx37, Cx40, Cx43 y Cx45, de las cuales, cada una muestra expresión regional y específica del tipo celular y el conocimiento que se tiene de estas ha sido gracias a estudios realizados en ratones (77). Por otro lado, Coopen en el año 2003 (78), indica solo tres como las principales conexinas ligadas a los cardiomiocitos, refiriéndose a las conexinas 40, 43 y 45, cuya expresión está regulada por el desarrollo.

De las últimas isoformas mencionadas, la conexina 40 se encuentra expresada en los miocitos auriculares, nodo auriculoventricular, haz de His y también en el sistema de conducción ventricular. La conexina 45 se expresa especialmente en el nódulo sinoauricular y en el nódulo auriculoventricular. Finalmente, la conexina 43 es la que se expresa en mayor medida en miocitos auriculares y ventriculares, por lo que la mayoría de estudios y análisis centran su atención en esta última proteína transmembrana (37).

La conexina 45 es la primera isoforma en expresarse durante el desarrollo, acompañando a las primeras contracciones cardíacas y exhibiendo una expresión ubicua en el tejido implicado. Otras isoformas de conexinas se expresan más tarde en el desarrollo, como conexina 40 y 43 que al aumentar sus niveles de expresión, tienen como consecuencia la disminución de los niveles de conexina 45, siendo esta última expresada en muy bajos niveles

con respecto a las otras conexinas cardíacas, lo que justifica la dificultad para estudiar y determinar la ubicación y expresión de esta conexina (79).

**Tabla 4:** Patrones de expresión de conexinas en el corazón.

Fuente: Elaboración propia Fuentes, E. 2021.

<b>Tejido Cardíaco</b>	<b>Isoformas de conexinas expresadas</b>
Nodo sinoauricular	Cx 45, Cx30.2
Atrio derecho	Cx43, Cx40, Cx 45
Nodo atrioventricular	Cx45, Cx30.2
Ventrículo derecho	Cx43, Cx45
Atrio izquierdo	Cx43, Cx40, Cx45
Rama superior del haz	Cx40, Cx45, Cx30.2
Rama inferior del haz	Cx43, Cx40, Cx45, Cx30.2
Ventrículo izquierdo	Cx43, Cx45
Fibras de Purkinje	Cx43, Cx40, Cx45, Cx30.2

## 5.6 Generalidades de la conexina 43

De las 21 isoformas de conexina, la conexina 43 es una de las más expresadas y estudiadas (80), de hecho, sin ir más allá, es considerada la principal proteína conexina en los miocardiocitos ventriculares y al igual en que las otras isoformas, seis proteínas conexinas 43 se reúnen y ensamblan para formar HCs situados en el sarcolema, los cuales se unirán a los HCs opuestos para formar las uniones gap, las que permitirán el paso de pequeñas moléculas, así como también el paso de señales eléctricas entre las células contiguas (81).

A pesar de que el centro de atención asociado a la conexina 43 está en el corazón, es necesario resaltar que la presencia de esta en los tejidos es de amplia distribución, encontrándose en los queratinocitos de la cavidad oral, en las fibras musculares del colon, en las células  $\beta$  del páncreas, en los astrocitos del cerebro, en los osteoblastos del hueso e incluso en las células miometriales del útero (35).

**Tabla 5:** Distribución tisular y celular de conexina 43. Tomado y adaptado de Laird, D. 2006. (35).

<b>Tejido</b>	<b>Tipo de célula</b>
Cardíaco	Cardiomiocitos
Cavidad oral	Queratinocitos
Estómago	Células epiteliales
Páncreas	Células $\beta$ endocrinas
Piel	Queratinocitos
Glándula tiroideas	Células epiteliales tiroideas
Cerebro	Astrocitos
Ovario	Células de la granulosa
Útero	Células miometriales
Pulmón	Células epiteliales alveolares
Hueso	Osteoblastos
Riñón	Células vasculares y glomerulares
Médula ósea	Células estromales
Bazo	Células dendríticas foliculares

Esta conexina posee 20 isoformas en ratones y 21 en humanos. Como proteína integral de membrana lleva a cabo su síntesis en el retículo endoplásmico rugoso para luego trasladarse al Golgi para ser plegada y oligomerizada y así dar forma a los HCs que serán trasladados mediante vía secretora a la membrana plasmática, sin embargo, la forma o mecanismos por los cuales las proteínas recién oligomerizadas recién traducidas llegan a su ubicación final,



aún se encuentra siendo estudiado, a pesar de esto, se conoce que la propagación de la Cx 43 en la membrana se realiza gracias a una vía dependiente de microtúbulos como la dineína, N-cadherina y  $\beta$ -catenina (36, 37). Ya en su ubicación en la membrana plasmática, esta conexina posee la estructura común ya descrita anteriormente de las demás conexinas, teniendo cuatro segmentos transmembrana que manifiestan una conformación  $\alpha$ -helicoidal, que terminan con dominios N y C terminales a nivel citoplasmático. Posee también dos bucles extracelulares denominado E1 y E2, los que contienen 31 y 34 aminoácidos respectivamente, estos se conectan covalentemente por tres enlaces disulfuros y una composición altamente conservada, la cual es vital en la formación de las uniones gap (30, 36, 82).

La Cx43 posee una vida media bastante corta, de entre 1 y 2 horas, lo que da luces del constante recambio que posee esta proteína en los diferentes tejidos, dicho proceso de reciclaje se realiza de la misma manera que con las otras isoformas de conexinas, mediante degradación por proteosomas y lisosomas luego de un evento endocítico (36).

La apertura o activación de los HCs de Cx43 requiere de una fuerte despolarización y es dependiente de múltiples factores como el pH, voltaje, concentración de calcio, fosforilación, estado redox y otros, los que en su conjunto permitirán el paso de moléculas de hasta 1 kDa, esto gracias a la variación del tamaño del poro desde 1.8 nm a 2.5 nm (30, 36). Sin ir más allá, en base a la conexina 43 fue planteado uno de los modelos de regulación del cierre de los poros, denominado modelo de bola y cadena, en el cual inicialmente la puerta constituida por la cola citoplasmática de la estructura de la conexina se encuentra alejada del poro, pero que, bajo un estímulo adecuado, gira hacia la apertura del poro uniéndose a un receptor para llevar a cabo el cierre (36).

Complementando lo anteriormente descrito, es importante mencionar que la activación de la conexina 43 por fosforilación está regulada por múltiples proteínas quinasas como la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPk), la proteína quinasa C (PKC), la caseína

quinasa 1, proteína quinasa A (PKA) y Src. Además, es de utilidad mencionar que, la fosforilación se realiza en la serina 368 en las regiones COOH-terminales de la Cx43, lo que se ha visto involucrado en la rotación, tráfico, degradación, montaje y desmontaje de los canales gap (37).

## **5.7 Hemicanales de conexina 43**

Los HCs de Cx43 se enmarcan bajo los mismos conceptos definidos en el capítulo sobre HCs, de hecho los HCs de Cx 43 son los más estudiados y expresados en los diferentes tejidos, por ende, gran parte de la información que se maneja sobre los HCs proviene de estudios realizados en dicha conexina (65). Sin ir más allá, es considerada la principal conexina en astrocitos y cardiomiocitos (83).

La Cx43 se asocia fuertemente a la liberación de muchas moléculas de pequeño tamaño, sin embargo, una de las más estudiadas y documentadas es el ATP. Existen múltiples modelos celulares sometidos a diferentes condiciones que han permitido demostrar el rol que juegan los HCs de Cx43 en la liberación de ATP. Algunos reportes han indicado que la activación del receptor purinérgico aumenta la liberación del ATP por los HCs de Cx43 en células de glioma C6, células HeLa y U373 (84), lo cual se ha visto confirmado por un estudio electrofisiológico realizado por Kang, J (85). Sumado a esto, se ha demostrado que los HCs de Cx43 se abren para liberar ATP en respuesta al estrés mecánico, esto observado en la línea celular MLO-Y4 (86). La inhibición de los canales de Cx43 mediante bloqueadores específicos ha sido útil para confirmar su participación en la liberación de ATP (65).

Los HCs de Cx43 se han visto ligados a mecanismos cardioprotectores, de hecho, se ha visto que en ratones con ausencia de la Cx43 la tolerancia a procesos isquémicos es menor tras realizarse el preconditionamiento isquémico. La fosforilación en algunos residuos de la Cx parece participar en la cardioprotección, en lo cual juegan un papel proteínas quinasas

como PKC y Src (65, 87). También se ha reportado regulación del volumen celular y protección mitocondrial asociado a estos HCs, sin embargo, como en la mayoría de los estudios realizados bajo modelos isquémicos, se necesita mayor evidencia para poder definir si el balance está inclinado hacia la protección o muerte y daño celular (65, 88-90).

La regulación de los HCs de Cx43 está dado por muchos mecanismos dentro de los cuales destacan tres. El primero es el pH, en donde se ha visto que los HCs de la conexina en cuestión se abren frente a condiciones alcalinas extracelulares, induciendo la entrada de calcio como consecuencia. Por el contrario, la baja de pH en el medio intracelular también conduce a la apertura de los HCs de Cx43 (36, 69). Un segundo mecanismo es la concentración de calcio. La concentración del calcio intracelular en procesos isquémicos se ve aumentada, llevando a la muerte de la célula. Este aumento se encuentra de la mano con la previa liberación de ATP durante la isquemia en miocitos cardíacos, lo cual a su vez se ve potenciado por la participación de HCs. Sin embargo, a pesar de que el aumento de calcio intracelular produce la apertura de estos canales, se ha visto que el aumento excesivo en los niveles de calcio provoca el cierre de estos (65, 91). Finalmente, el tercer mecanismo destacado, es la fosforilación. La Cx43 es una proteína con múltiples dominios que pueden ser fosforilados, sobre todo en su extremo C-terminal. Se ha visto durante procesos de isquemia con inhibición metabólica que, a diferencia de las GJ, los HCs al ser desfosforilados permanecen abiertos, lo cual se ha evidenciado por estudios que evalúan la permeabilidad de estos canales utilizando colorantes (63, 65).

### **5.7.1 Hemicanales de conexina 43 en la miocardiopatía de Duchenne**

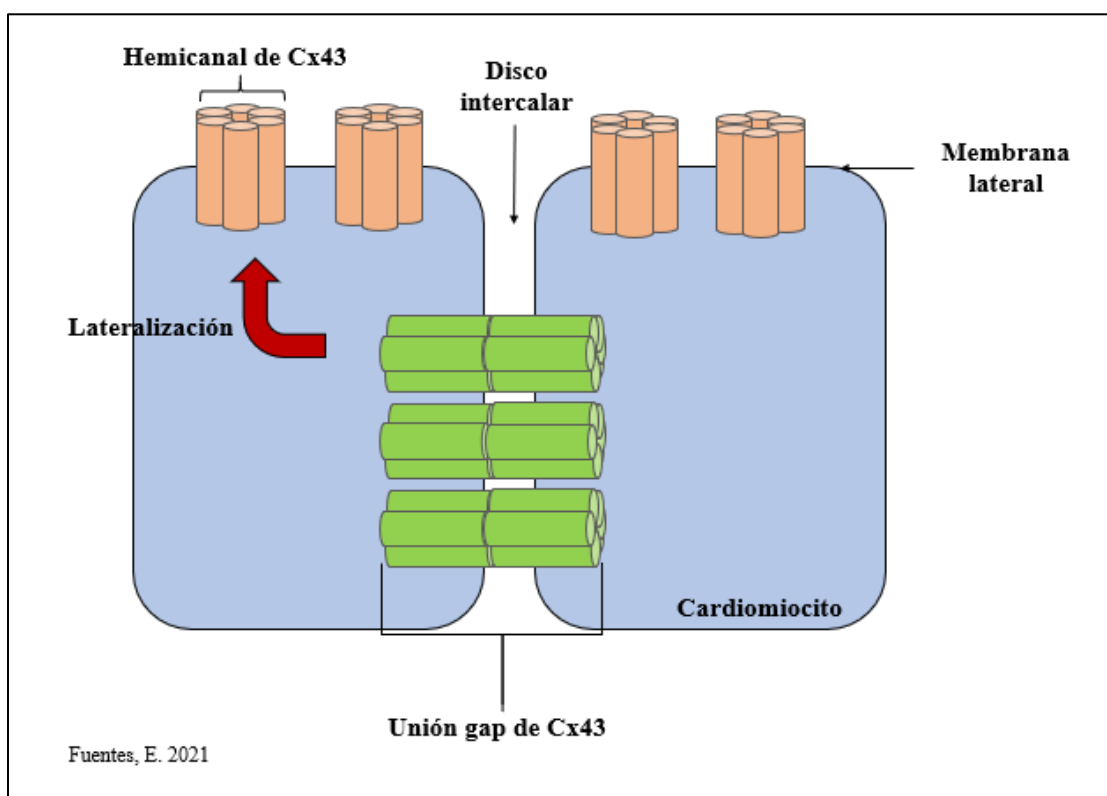
En el miocardio la conexina 43 se encuentra ubicada en los discos intercalares (DI) y es responsable, junto a otras isoformas, de mantener la conducción eléctrica, facilitando la propagación de los potenciales de acción lo que desencadena como resultado una contracción sincrónica del músculo cardíaco (92). Además, Cx43 regula los niveles de potasio en el tejido cardíaco y participa en el metabolismo energético del corazón. (93, 94).

Cuando la Cx43 modifica su ubicación, pasando desde los discos intercalares a otra ubicación de los cardiomiocitos genera eventos patológicos. Dicho desplazamiento está siendo intensamente estudiado y se ha asociado fuertemente a varias patologías cardíacas y al deterioro del miocardio en personas que padecen DMD. Este fenómeno fue apreciado y llamó la atención al ser observado por primera vez en imágenes de corazones enfermos teñidos para visualizar Cx43. Dichas imágenes, permitieron comprender que cambios en el patrón de expresión normal de Cx43 y la lateralización de esta en el miocardio, estaba directamente ligado a patologías cardíacas (37, 95).

La remodelación de la Cx43 consiste en el cambio de ubicación de la Cx43 en los cardiomiocitos, pasando de estar ubicada en los discos intercalares a la membrana lateral de estos. Este evento es denominado lateralización y se sospecha que es responsable de generar alteraciones en la conducción de señales en los corazones enfermos o lesionados. Esto se ve respaldado en el hecho de que se ha encontrado expresión anormal y lateralización de la conexina 43 en enfermedades del miocardio como la miocardiopatía hipertrófica, insuficiencia cardíaca e isquemia (37, 92, 96).

La actividad de la Cx 43 como en las membranas laterales de los cardiomiocitos es diferente a la que ofrece cuando se encuentra en los discos intercalares, puesto que, en los DI dicha conexina forma uniones gap que contribuyen al funcionamiento y comunicación adecuada de las células. Por otro lado, cuando la Cx43 se posiciona en la membrana lateral se constituye como un HC que interrumpe el gradiente de iones y contribuye a la pérdida de metabolitos esenciales, sucesos que traen como consecuencia daño a los miocitos y muerte celular (92). En el estudio realizado por Himelman, E se ha demostrado que la remodelación de la Cx43 en los cardiomiocitos juega un rol importante en el desarrollo de la patología cardíaca en la enfermedad de Duchenne y que la prevención de este acontecimiento puede mejorar la progresión de la patología en el tejido del corazón (92).

El fenómeno de remodelación de Cx43, o bien la lateralización de esta desde los DI a la membrana lateral, no posee un mecanismo único y bien definido que lo sustente. Sin embargo, se ha descrito que la fosforilación de un triplete de serina, correspondientes a la serina 325, 328 y 330, mediado por proteínas como calcio calmodulina quinasa II (CaMKII) y la caseína quinasa 1δ (CK1 δ), permiten una localización adecuada de la Cx43 en los discos intercalares, mientras que, en el caso contrario, una hipofosforilación de dicho triplete genera el fenómeno de lateralización de una manera significativa (92, 97).



**Figura 7: Lateralización de la conexina 43.** En los cardiomiocitos la Cx43 se localiza mayoritariamente en los discos intercalares formando uniones gap. En cardiomiocitos con DMD, se aprecia un desplazamiento marcado de la Cx43 desde los discos intercalares a la membrana lateral (lateralización), en donde formaran HCs.

Se ha evidenciado mediante un estudio, que la disminución de la expresión de Cx43 evita que ocurran poderosos defectos musculares en modelos mdx, lo cual se puede asociar a una disminución en la expresión de HCs en las membranas laterales de los cardiomiocitos. En resumidas cuentas, al reducir los niveles de Cx43 se previene la remodelación de esta y su actividad como HC. Esto es importante, ya que cuando se produce la remodelación e internalización de esta conexina, se fomenta el desacoplamiento eléctrico y la arritmogénesis. Por el contrario, se demostró que al inhibir la actividad de HC de Cx43 mediante el uso del péptido Gap19 se reducía considerablemente el daño cardíaco, esto gracias a disminuir los fenómenos arrítmicos, daño metabólico y consecuente apoptosis celular. Por lo tanto, se puede señalar que la inhibición de los HCs y la disminución de la expresión de la Cx43 podría desarrollarse como un tratamiento para la miocardiopatía en la enfermedad de Duchenne (92, 96). Lo anteriormente mencionado respalda lo publicado por otro autor que señalaba que la normalización de los niveles de Cx43 prevenía las alteraciones celulares y funcionales del tejido cardíaco en modelos de ratones con miocardiopatía distrófica (98).

Finalmente, es importante mencionar un interesante estudio publicado que señala que en los corazones mdx se aprecia un elevado estrés oxidativo proveniente de la actividad de las enzimas NADPH oxidasas, lo cual va de la mano con un aumento de la nitrosilación de Cx43 y la consecuente lateralización de dicha conexina, promoviendo fenómenos de arritmia y daño cardíaco. Además, se demostró que el uso de un fármaco llamado apocinina redujo las alteraciones al inhibir las NADPH oxidasas. Sin embargo, no se apreció una normalización en la ubicación de la Cx43 (17). Lo cual será desarrollado más detenidamente en capítulos posteriores.

## **5.8 Remodelación de la Cx 43 en la DMD asociada a fosforilación**

La fosforilación corresponde a la adición de un grupo fosfato a una molécula que bien puede ser una proteína. Dicho proceso es fundamental en las proteínas conexinas, de hecho todas sus isoformas son capaces de fosforilarse (99). La fosforilación en las conexinas

participa en la modificación y formación de las uniones comunicantes, en donde proteínas quinasas pertinentes cumplen un rol fundamental. Esta modificación se ha relacionado en la regulación de la comunicación por uniones gap en múltiples etapas del ciclo de la célula y del propio ciclo de vida de la conexina, como el tráfico, montaje y desmontaje, degradación, activación de HCs, entre otras (100).

La regulación de las conexinas por medio de la fosforilación predomina en las primeras etapas de su ciclo de vida, en donde participan varias quinasas, como PKC, PKA, CK1, MAPK, P34<sup>cdc2</sup> y otras, las cuales son capaces de conducir a la fosforilación de la mayoría de los residuos de serina y algunos de tirosina de la región carboxi terminal de la Cx43 (100, 101).

La constitución y localización de las uniones gap se encuentran ampliamente reguladas por los eventos del ciclo celular, a través del cual se va aumentando los niveles de fosforilación de las conexinas en determinados aminoácidos. Modificaciones en la fosforilación pueden tener efectos importantes sobre la localización subcelular de la Cx 43, afectando en consecuencia no solo la regulación de esta, sino que también otros aspectos como el crecimiento y proliferación celular (92, 100).

La Cx43 es la conexina más ampliamente expresada en mamíferos, lo que la ha constituido como un modelo de estudio para esta familia de proteínas. Esto no ha sido diferente para el estudio de la fosforilación, por el contrario, gracias al estudio de esta conexina se ha logrado determinar que la fosforilación no solo participa en el ciclo de vida, ensamblaje y localización de estas, sino que también, cumple un rol importante en el desensamblaje, internalización y degradación de estas proteínas (102). Sin ir más allá, existen estudios que han demostrado que posterior a la fase G2 del ciclo celular e ingreso a la mitosis, Cx43 mostraba una intensa pérdida de acoplamiento y dichas proteínas se encontraban extensamente fosforiladas, especialmente por la quinasa P34<sup>cdc2</sup> en los residuos S255 y S262. Un efecto similar de pérdida de ensamblaje es realizado por la PKC sobre el residuo S368 de

la proteína. El destino de estas proteínas desensambladas e internalizadas es la degradación de la Cx43 (35, 101, 102).

El fenómeno de remodelación de Cx43 se ha asociado a la enfermedad de Duchenne, puesto que, se ha encontrado que el tejido cardíaco afectado por la DMD posee niveles aumentados de isoformas de Cx43 sin fosforilación, produciendo alteraciones en la ubicación de la proteína, afectando directamente la regulación de las uniones gap y generando problemas de conducción que dañan al tejido cardíaco (92, 101).

En muchos estudios hechos en ratones mdx, los cuales poseen deficiencia de la proteína distrofina (los cuales sirven de modelo para estudiar la DMD), es utilizada una droga o medicamento llamado isoproterenol (Iso), el cual estimula receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Este fármaco, es utilizado para afectar los latidos del corazón y poder estudiar la respuesta de este órgano bajo diversas condiciones. En el caso de ratones mdx, al utilizar el Iso, la estimulación  $\beta$ -adrenérgica desencadena arritmias graves e incluso la muerte prematura, consecuencias que se ven potenciadas o facultadas por la lateralización de la Cx43 (103). Para confirmar dicho rol, es necesario disminuir la expresión de dicha conexina o bien bloquear su función mediante péptidos miméticos selectivos por Cx43 como el Gap19, o bien, por otro lado, comparar los resultados de ratones mdx frente a ratones de tipo salvaje (WT), los cuales según investigaciones no presentan efectos adversos (104). En estudios de este tipo, se ha demostrado que al bloquear o disminuir la expresión de la Cx43 se evita la arritmogénesis y la mortalidad consecuente (92).

### **5.8.1 Fosforilación de conexina 43 y su implicancia en la DMD**

En estudios sobre modelos murinos y sobre tejido humano han permitido identificar alteraciones en el mecanismo de fosforilación en la proteína Cx43. En los cardiomiocitos enfermos con DMD se ha observado una considerable disminución de la fosforilación en los



residuos de serina S325, S328 y S330. Dicha hipofosforilación genera alteraciones en la localización subcelular de la Cx43 en los cardiomiocitos, los que se desplazan desde los discos intercalares hasta las membranas laterales, en donde forman HCs que contribuyen a eventos adversos para la función cardíaca (92).

Al sustituir los residuos de serina que mostraban hipofosforilación en cardiomiocitos DMD, por algunos miméticos se ha demostrado mejorar la homeostasis del calcio, una menor producción de especies reactivas del oxígeno, disminución de la lateralización, mejorando así la conducción cardíaca. De esta manera, se ve fortalecida la relación que tiene la Cx43 con la miocardiopatía y las arritmias en pacientes con DMD (92, 96).

## **5.9 Acetilación en la remodelación de Cx43 en Duchenne**

El estrés cardíaco producido por fenómenos como la isquemia reperusión están directamente relacionados con la apertura y remodelación patológica de los HCs de Cx43. Lo cual desencadena de manera rápida y casi inmediata arritmias potencialmente mortales, a la vez, interrumpiendo la función y comunicación de los cardiomiocitos (98).

La acetilación en el extremo N-terminal de un polipéptido es una de las modificaciones postraduccionales más reconocidas en diversos organismos biológicos. Esta modificación, ocurre co-traduccionalmente cuando el emergente polipéptido aún se encuentra unido al ribosoma. En las proteínas este mecanismo participa regulando su vida media, interacciones entre proteínas, entre proteína y membrana e incluso la localización subcelular de estas, por lo cual, la acetilación se ha visto involucrada en muchos procesos fisiológicos y fisiopatológicos (105).

En los corazones distróficos existe una considerable participación de la acetilación, la cual se involucra en la disociación de las uniones GAP mediante la separación de la Cx43 de la N-cadherina y de la zónula de ocludens 1, además de la lateralización de la Cx43 en los cardiomiocitos. Sumado a lo anterior, también se han descrito estudios que señalan que la Cx43 acetilada disminuye su expresión en la membrana plasmática, manifestando una mayor acumulación a nivel nuclear (106).

En el proceso de acetilación participan enzimas como la histona acetiltransferasa (HAT), la cual transfiere un grupo acetilo desde una molécula de acetyl-CoA a un residuo de lisina de una determinada proteína para formar  $\epsilon$ -N-acetyl lisina (107). La Cx43 no es una excepción a la regla, sobre esta también se lleva a cabo la modificación postraduccional de acetilación. Sin ir más allá, se ha evidenciado un aumento considerable de los niveles de la enzima histona acetiltransferasa en corazones mdx, por lo cual, es posible asociar la sobreexpresión de la enzima a una actividad aumentada, lo que podría tener consecuencias funcionales en la expresión génica y proteica en los cardiomiocitos de personas con enfermedad de Duchenne (106).

A través de estudios se ha demostrado que uno de los principales actores en el proceso de acetilación es el estrés oxidativo, el cual induce un aumento considerable de esta modificación, lo cual ha sido confirmado al demostrarse que el uso de un antioxidante denominado N-acetyl cisteína disminuía los niveles de acetilación. Se cree que este efecto es ejercido aguas arriba en la cascada de señalización que conduce a la acetilación de las proteínas (106, 108).

La Cx43 en el corazón sano se encuentra normalmente asociada con varias proteínas como la zónula de ocludens (ZO1), cadherinas (CAD) y c-Src. Sin embargo, en el corazón distrófico se ha reportado una disminución de la comunicación de la Cx43 con las proteínas ZO1 y CAD, mientras que la asociación de la Cx43 acetilada con c-SRC permanece aparentemente normal (106, 109). Sin embargo, en corazones mdx, se ha visto que la

acetilación de c-Src puede afectar en el recambio y función de este, influyendo directamente sobre la fosforilación (110). También, es necesario mencionar que un miembro de la familia c-Src llamado c-Abl se ha encontrado acetilado en lisina, desencadenando considerables consecuencias a nivel de la localización y función intracelular (111).

Finalmente mencionar, que existen más enzimas ligadas a la regulación de la acetilación de la Cx43, como, por ejemplo, la histona desacetilasa (HDAC) y la histona acetilasa PCAF la cual ha mostrado participar activamente en la modificación postraduccional de un residuo de lisina de la Cx43. Lo cual, en conjunto a lo ya descrito genera la modificación en la ubicación subcelular de la Cx43 en los cardiomiocitos, haciendo que esta conexina acetilada se ubique preferentemente en el citoplasma y también, pero en menor medida, en cercanía al núcleo. En sí, HDAC y HAT son las principales enzimas reguladoras del proceso y su desequilibrio impulsado principalmente por estrés oxidativo, afecta la ubicación de la Cx43, influyendo en el deterioro del corazón distrófico (106).

### **5.10 S – nitrosilación en la conexina 43**

La S-nitrosilación de la Cx43 es otro mecanismo que juega un rol fundamental en la apertura y regulación de esta conexina. La ocurrencia de este fenómeno se ha asociado mediante estudios, como un factor que participa en la enfermedad de Duchenne (21).

### **5.10.1 Óxido nítrico**

El óxido nítrico (NO) es una molécula altamente reactiva, es considerado un gas que posee múltiples actividades biológicas. Esta molécula es producida a partir de la L-arginina por la acción de la enzima óxido nítrico sintasa, transformando la L-arginina en L-citrulina (112). El óxido nítrico participa en la transducción de señales en las células, principalmente a través de la S-nitrosilación de tioles de cisteína alostéricos, además de realizarlo en el sitio activo al interior de las proteínas. En sí, el óxido nítrico proporciona un mecanismo para la regulación fisiológica fundamentada en redox (113, 114).

### **5.10.2 S – nitrosilación**

La S-nitrosilación es una modificación postraduccional de proteínas, la cual se ha propuesto como un considerable mecanismo de regulación de señalización celular mediada por el óxido nítrico. Esta reacción, se basa en la adición covalente y reversible de un resto nitroxilo a grupos tioles de la cadena lateral de residuos de cisteína en los sitios activos y alostéricos de proteínas, lo que da origen a s-nitroproteínas (21, 112). Que la reacción de s-nitrosilación sea reversible, mediante la denitrosilación realizadas por proteínas como la enzima superóxido dismutasa, permite mantener un balance dinámico en los sistemas biológicos, en lo cual posee una fuerte influencia el estado redox (115). El óxido nítrico ha demostrado una gran influencia en la transducción de señales, en gran medida por medio de la S-nitrosilación (113).

La S-nitrosilación se encuentra acoplada a la síntesis endógena del óxido nítrico, mediante la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), de la cual se conocen tres isoformas: NOS endotelial, NOS neural y NOS inducible (NOSi) (112).

Al igual que en otras modificaciones postraduccionales como la fosforilación, la s-nitrosilación modula la actividad biológica de muchas proteínas en organismos vivos. Sumado a esto, participa en procesos vitales del ciclo celular, como lo es la regulación de la transcripción, reparación del ADN e incluso en la apoptosis (112).

La s-nitrosilación no está libre de desregulación como mecanismo celular, estas irregularidades han sido asociadas a numerosos cuadros patológicos como el asma, Parkinson, fibrosis quística, accidentes cerebrovasculares, aparición y multiplicación de células cancerosas, insuficiencia cardíaca e incluso en la distrofia muscular de Duchenne, por lo que comprender los mecanismos de daños asociados a la s-nitrosilación es de importancia actualmente (21, 112, 116, 117).

En el cardiomiocito la nitrosilación tiene efecto sobre proteínas encargadas de regular el calcio intracelular que participa en los fenómenos de excitación y contracción cardíaca. Proteínas tales como el receptor de rianodina ( $RyR_2$ ) que se encuentra s-nitrosilado aumentando así el flujo de calcio, también SERCA que bajo efectos de óxido nítrico aumenta la recaptación de calcio citosólico, llevando a la relajación cardiovascular y otras que al ser reguladas por la s-nitrosilación permiten controlar la función cardíaca (118, 119).

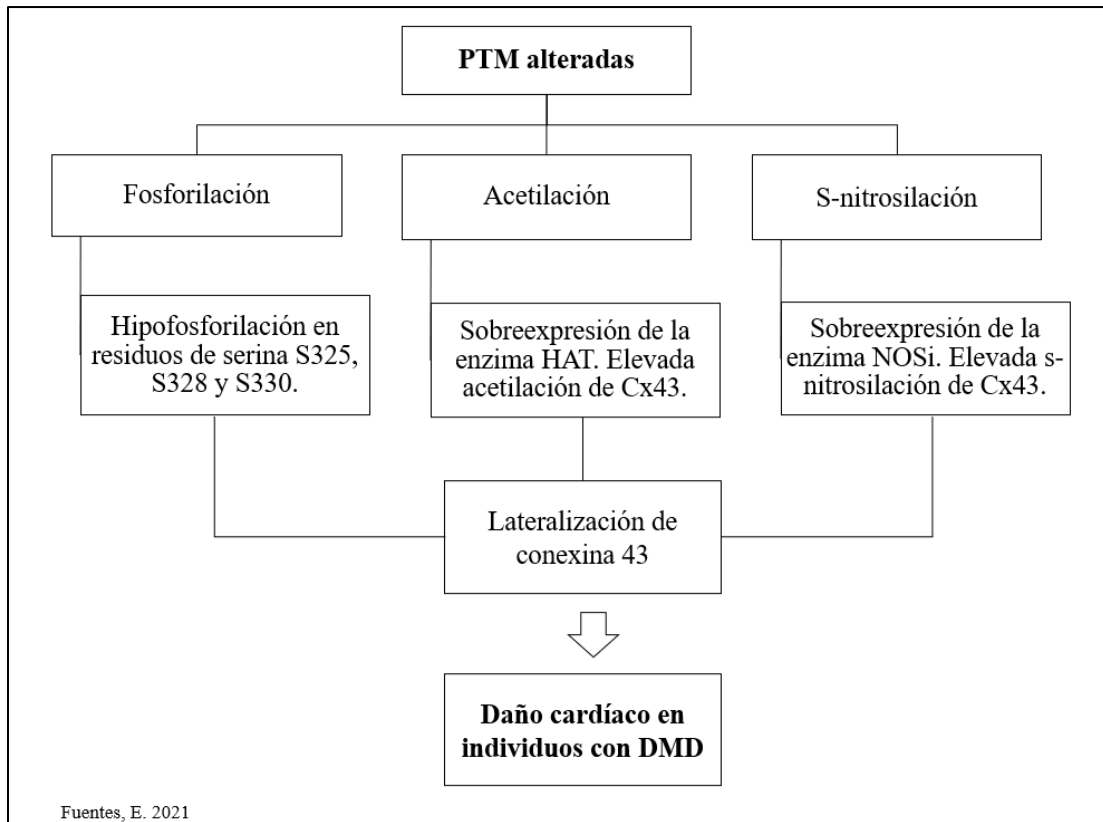
### **5.10.3 S – nitrosilación de conexina 43 asociado a la enfermedad de Duchenne**

Es clara la participación de la nitrosilación en aspectos fisiológicos, y que cuando esta reacción ocurre en niveles inadecuados puede desarrollar múltiples patologías como las previamente mencionadas. Dentro de ellas se encuentra la DMD, enfermedad con un fuerte componente patológico ligado al corazón. La s-nitrosilación de la Cx43 en las células cardíacas enfermas es foco de estudio en modelos de ratones mdx (21).

El óxido nítrico induce modificaciones postraduccionales sobre los grupos tioles en residuos de cisteína abundantes en la Cx43, la cual se encuentra lateralizada en corazones enfermos con DMD (114). Estudios referentes al tema utilizan la estimulación  $\beta$ -adrenérgica para evaluar el rol de la nitrosilación de Cx43 en ratones con enfermedad de Duchenne, puesto que, dicha estimulación promueve la producción del óxido nítrico, molécula fundamental en la s-nitrosilación (21).

En el corazón con DMD la expresión de las enzimas óxido nítrico sintasas neuronales y endoteliales se encuentra muy reducida, sin embargo, el grado de expresión de la enzima óxido nítrico sintasas inducible está muy aumentada. Al considerar que la NOS inducible posee un poder de producción de óxido nítrico de 100 a 1000 veces mayor que las isoformas neuronales y endoteliales, es de imaginarse que, a niveles de óxido nítrico mucho más altos, se produzca una mayor cantidad de reacciones de s-nitrosilación, y por ende facultar la posibilidad de que las personas con DMD manifiesten arritmias ventriculares (21). En esto de las arritmias, el equilibrio de la s-nitrosilación-redox podría jugar un rol importante, de hecho, los canales de rianodina ( $RyR_2$ ), en los corazones de ratones mdx se encuentran ampliamente nitrosilados, lo que promueve la fuga de calcio descontrolada del retículo sarcoplásmico, generando así procesos de posdespolarización retardada y arritmia. Sumado a lo anterior, es importante considerar que al aumentar los valores de calcio aproximadamente sobre los 500 Nm faculta la activación de la Cx43, que causa una despolarización de membrana y consecuente arritmia (21, 120).

La s-nitrosilación de Cx43 se lleva a cabo en el residuo 271 de cisteína y es sugerida como un mecanismo regulador de la Cx43. Sin ir más allá, se ha encontrado altos niveles de Cx43 s-nitrosilada en corazones mdx y se ha demostrado que al inhibir los altos niveles de óxido nítrico se reduce la nitrosilación de la conexina, influyendo favorablemente sobre la arritmia de corazones mdx (21, 120).



**Figura 8: Modificaciones postraduccionales alteradas implicadas en la lateralización de la Cx43.** Se describen las principales modificaciones postraduccionales (PTM) de la Cx43 implicados en la lateralización de esta y consecuente daño cardíaco en individuos con distrofia muscular de Duchenne.

### 5.11 Implicancia del estrés oxidativo asociado a conexina 43 en la DMD

El constante cambio de los tratamientos y de la terapia que se aplica en los pacientes con DMD se debe a que la etiología no se encuentra completamente definida. Son muchas las propuestas que se tienen sobre el origen de esta enfermedad, desde causas genéticas asociadas a múltiples mutaciones, alteraciones proteicas, estrés oxidativo y otras.

El estrés oxidativo es ampliamente estudiado por el efecto dañino que ejerce, y su participación como posible etiología de múltiples enfermedades cardíacas, renales, cerebrales, vasculares, entre muchas otras (121).

Existe fuerte evidencia acerca del daño que ejercen las especies reactivas del oxígeno en las proteínas y otras macromoléculas. La Cx43 no queda exenta del daño ocasionado por estas especies reactivas, las cuales generan efectos directos e indirectos en esta proteína, ocasionando alteraciones en la función y localización subcelular de esta (92). Sumado a esto, al considerar la gran expresión y rol que tiene la Cx43 en la mitocondria es comprensible que alteraciones en la expresión o función de esta conexina, generen también estrés oxidativo de manera indirecta (122).

Es de destacar que el estrés oxidativo se ha implicado recientemente en la regulación de la distribución y función de la Cx43 en el tejido cardíaco. Existe evidencia en estudios, de que en los corazones mdx, la Cx 43 se encuentra ampliamente lateralizada, producto de la presencia de un elevado estrés oxidativo en los cardiomiocitos, lo cual reduce el acoplamiento de los HCs formados por esta conexina, desencadenándose desordenes en la transmisión o propagación de impulsos eléctricos en el corazón (106).

Existen variados mecanismos por los cuales el estrés oxidativo participa en la patología cardíaca en Duchenne, uno de ellos es la oxidación de una proteína llamada calcio calmodulina quinasa II (CaMKII) la cual participa en la homeostasis del calcio. Por ende, el estrés oxidativo produce anomalías en el mecanismo normal de esta quinasa, generando alteración en los niveles de calcio, lo cual lleva al estrés cardíaco desencadenando episodios de arritmia. Todo esto se ve potenciado por el hecho de que las especies reactivas del oxígeno abren los canales de Cx43 y aumentan aún más la señalización en los cardiomiocitos, fomentando el daño del tejido del corazón en individuos con DMD. Este efecto se ve disminuido al utilizar un fármaco llamado Colchicina, el cual disminuye el estrés oxidativo y aumenta la fosforilación de conexinas hipofosforiladas (92).



Otro mecanismo, consiste en el aumento de la acetilación de la Cx 43 en cardiomiocitos con DMD producto del elevado estrés oxidativo, lo cual fue descrito anteriormente (106).

Sin embargo, uno de los estudios más recientes ha mostrado gracias al uso de apocinina una gran evidencia del rol que juega el estrés oxidativo en Cx43, asociado a la nitrosilación y a la lateralización de esta Cx. Mediante un modelo de DMD se demostró que en esta patología existe una desregulación de Cx43 que conduce a una disfunción cardíaca y apoptosis de cardiomiocitos. En resumidas palabras, al crecer la actividad de las NADPH oxidasas e implícitamente el estrés oxidativo se produce la nitrosilación de la Cx43 cardíaca lateralizada en la membrana de las células del corazón, esta nitrosilación fomenta la apertura de los HCs, contribuyendo de esta forma a la disfunción cardíaca. Sin embargo, no se ha logrado definir el mecanismo por el cual la actividad de las NADPH oxidasas, específicamente NOX2, conduce al aumento de la nitrosilación de Cx43. La mayor limitación de este estudio radicó en la falta de especificidad como inhibidor de la apocinina por las enzimas NOX (17).

### **5.11.1 Especies reactivas del oxígeno y estrés oxidativo**

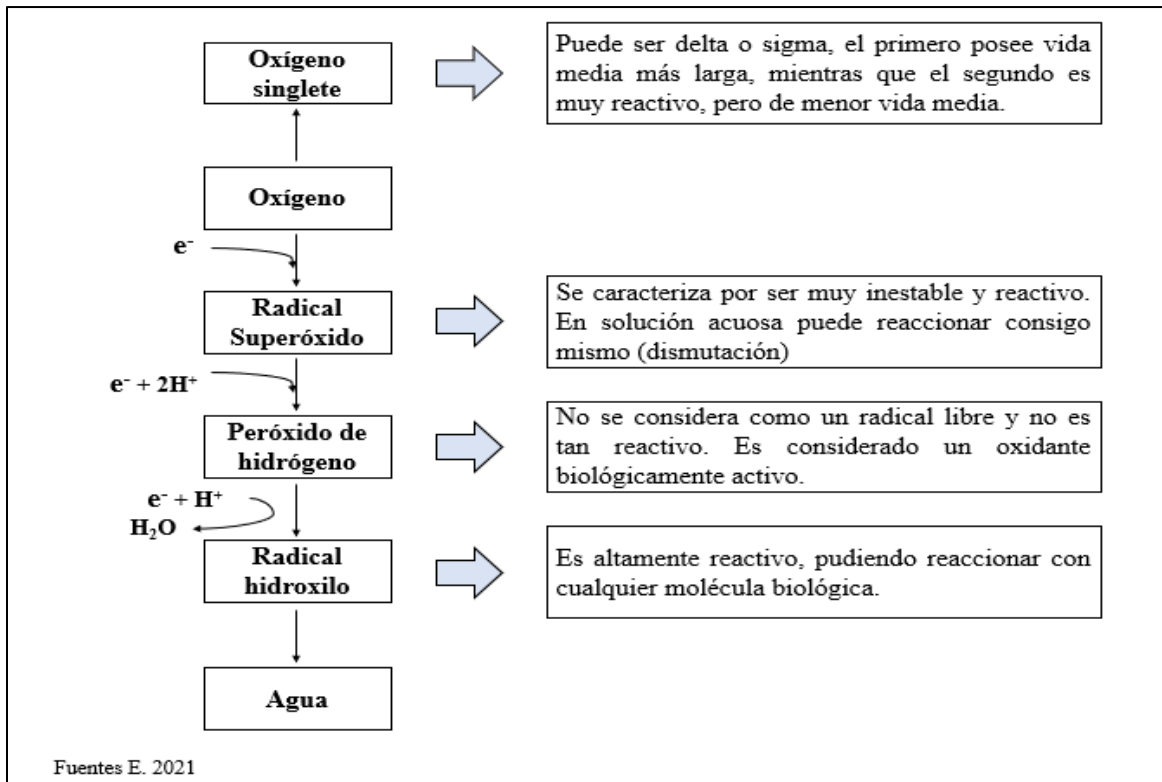
Los radicales libres son comprendidos como cualquier molécula que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital más externo, esta característica los hace muy inestables y en gran medida reactivos, extrayendo electrones de las moléculas cercanas generando la inestabilidad de estas con el fin de alcanzar su propia estabilidad electroquímica. Dentro del metabolismo propio de los organismos aeróbicos está incorporada la utilización del oxígeno molecular, el uso de este desencadena inevitablemente la producción de especies reactivas que incorporan en su estructura el oxígeno, a las cuales se les ha denominado especies reactivas del oxígeno (ROS). ROS es un término que incorpora muchos representantes dentro de los cuales se encuentra el superóxido, peróxido de hidrogeno, radical hidroxilo, oxígeno singlete, radical peroxilo, radical alcoxilo, hidroperóxido lipídico, peroxinitrito, ácido

hipocloroso y ozono, de los cuales algunos son catalogados como especies radicalarias y otro no por el hecho de no tener electrones desapareados (123, 124).

Las ROS son moléculas pequeñas que en un comienzo se consideraban como subproductos metabólicos de las mitocondrias que potenciaban el desarrollo del envejecimiento y la enfermedad. Sin embargo, con el desarrollo de la ciencia y el estudio de esta área, se ha hecho cada vez más claro que prácticamente todas las células poseen enzimas productoras de ROS, dentro de las cuales destacan las NADPH oxidasas que comprenden una familia ampliamente estudiada de la cual se desprenden siete isoformas que presentan diferentes estructuras, productos y distribución (125).

El papel que desempeñan las ROS tiene connotada importancia en procesos fisiológicos, pero a la vez se ha descrito la participación de estas en patologías ligadas al envejecimiento y deterioro de la salud producto de un estrés oxidativo sostenido en el tiempo en donde los niveles de ROS superan en creces la capacidad de las defensas antioxidantes. Se ha estudiado el rol de estas especies reactivas del oxígeno en una amplia gama de patologías como lo es el cáncer, diabetes mellitus, cirrosis, catarata senil e incluso distrofias musculares dentro de las cuales podemos encontrar las distrofinopatías sobre las que el estrés oxidativo tendrá un alto impacto potenciando la patogénesis cardiovascular (123).

El oxígeno constituye un elemento vital para los organismos que lo utilizan, tanto en el enfoque respiratorio como en múltiples procesos celulares y metabólicos. Este elemento desempeña la importante función de ser el aceptor final de electrones durante el proceso de respiración celular, sin embargo, también constituye el punto de partida, mediante el cual se puede generar especies que producen daño a nivel de diferentes tejidos orgánicos. Si bien, más del 95% del oxígeno consumido por los organismos aerobios es reducido a H<sub>2</sub>O durante el proceso de respiración mitocondrial, un pequeño porcentaje restante es transformado a especies semireducidas, conocidas como especies reactivas del oxígeno (25).



**Figura 9: Formación y descripción de algunas especies reactivas del oxígeno.** Esquematización secuencial de la formación de las especies reactivas del oxígeno con sus respectivas descripciones. Comenzando del oxígeno como base oxígeno, se realizan reacciones de reducción hasta llegar a la formación de agua.

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre la producción de radicales libres, principalmente las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, y los mecanismos de defensa antioxidantes, lo que genera una disrupción en sistemas de señalización y control a consecuencia de favorecer procesos prooxidantes y a la vez obstaculizar los mecanismos antioxidantes. Estas especies reactivas poseen la capacidad de oxidar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, desencadenando de esta forma alteraciones en las estructuras y funcionamiento de las células, lo que explica a la vez, el por qué el estrés oxidativo ha sido asociado en múltiples investigaciones a daño de diferentes tejidos y órganos, causando enfermedades cardiovasculares, respiratorias, renales, entre tantas otras (25).

### 5.11.2 Familia de las NADPH oxidasas

Existen muchas enzimas y elementos asociados a la producción de especies reactivas del oxígeno que aumentan el estrés oxidativo, como la xantina oxidasa, óxido nítrico sintasa e incluso la mitocondria, pero por sobre todas ellas, destaca por su abundancia en el corazón la familia de las NADPH oxidasas (126).

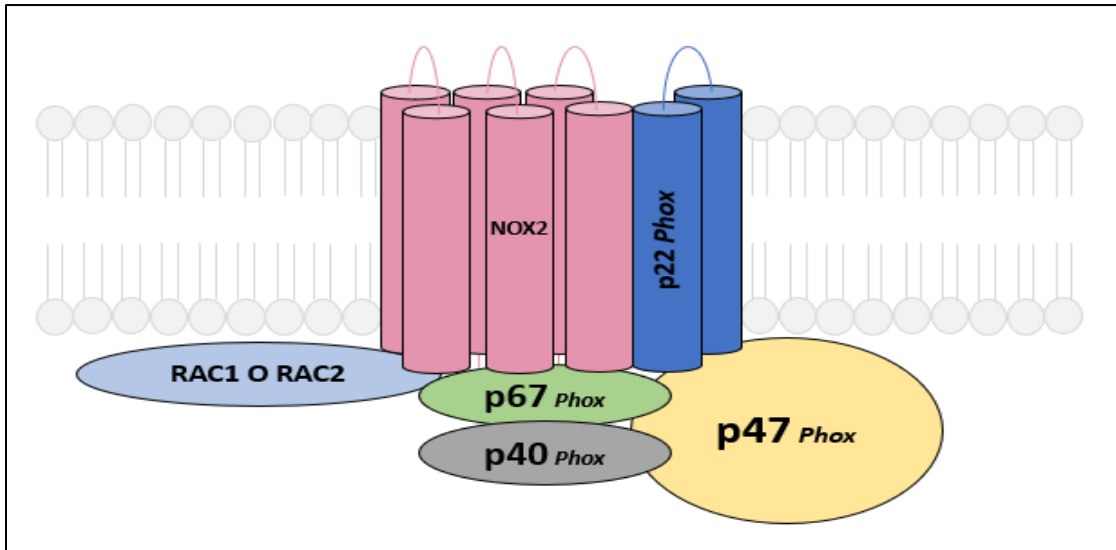
El descubrimiento de las NADPH oxidasas (NOXs) ha tenido una larga historia, en la cual, ha sido necesario con el transcurso del tiempo establecer la importancia fisiológica de cada una de las isoformas y a la vez comprender que en algunas situaciones se asocian a eventos patológicos (125).

Las NOXs comprenden un complejo enzimático multiproteico encargado de producir especies reactivas del oxígeno en diferentes células y tejidos, esta familia enzimática está constituida por siete isoformas, las cuales van desde NOX1 a NOX5 y desde DUOX1 a DUOX2 (127). Cada isoforma posee un conjunto de subunidades que regulan su expresión y que tendrán diferentes funciones, existen subunidades encargadas de efectuar la actividad propia de la enzima, formando parte del sitio catalítico, algunas tendrán función reguladora y otras se encargarán de estabilizar la NOX correspondiente. Cabe destacar que cada isoforma de la familia NOX posee una distribución en tejidos orgánicos diferentes y que a la vez cada una de ellas poseerá un número distinto de subunidades, que se denominarán con una nomenclatura distinta y realizarán funciones características en cada NOX (125).

### 5.11.2.1 NOX2

El fagocito NADPH oxidasa 2, también llamado NOX2 fue la primera isoforma de NOX en ser identificada y a la vez la más estudiada, sirviendo así, de modelo para el análisis de las isoformas que fueron descubiertas posteriormente. Esta enzima se expresa en gran cantidad en neutrófilos y macrófagos, sin embargo, también se ha evaluado la presencia de esta en cardiomiocitos, musculo esquelético, hepatocitos, células endoteliales, entre otras. A nivel cardíaco NOX2 se ha asociado principalmente al sarcolema, siendo la isoforma predominante en dicho tejido (17, 125, 128).

NOX2 es la primera enzima de la familia de las NADPH oxidasas en ser estudiado y del cual se posee más información con respecto a su estructura y función. La estructura de NOX2 está compuesta por 6 subunidades dentro de las cuales se encuentra gp91phox, una glicoproteína de 91 kDa la cual representa el núcleo catalítico de la enzima y es la encargada de realizar el transporte de electrones, por otro lado, se encuentra p22phox, la cual desempeña la función de estabilizar el complejo enzimático de NOX2, esta última subunidad logra su cometido mediante su unión con otra subunidad, la p47phox. Posterior a estos componentes se encuentra la participación de p67phox que se desempeña como activadora del complejo enzimático. Finalmente se encuentran las dos últimas subunidades, una de ellas se llama p40phox y la otra Rac, la primera de estas actúa como reguladora del complejo enzimático y la última es una proteína de unión a GPT (129).



**Figura 10: Estructura de la NADPH oxidasa 2.** La estructura de NOX2 está compuesta por múltiples proteínas. Se ilustran los componentes proteicos de la NADPH oxidasa 2. Tomado y adaptado de Zhang, Y. 2020. (126)

En los fagocitos, NOX2 se encuentra presente en los orgánulos intracelulares como también en la membrana plasmática de estos. Dentro de las principales funciones que se le ha atribuido a NOX2 se encuentra su desempeño en la respuesta inmune innata frente a patógenos y cuerpos extraños que ingresen al organismo, como también la producción y regulación de las especies reactivas del oxígeno (130).

Cuando los neutrófilos se encuentran en reposo, la enzima presenta sus subunidades disociadas y organizadas de una manera distinta que cuando se encuentra activado el fagocito, en la forma inactiva gp91phox y p22phox se encuentran ubicados en la membrana de los gránulos secundarios. Por otro lado, p47phox, p67phox y p40phox se ubican en el citosol, al igual que el complejo citosólico Rac-GDP (125).

Una vez que se realiza el proceso de fagocitosis por parte del neutrófilo o fagocito, el complejo de NOX2 genera una especie de ensamblaje que comprende la fusión del fagosoma con la membrana de los gránulos y la correspondiente asociación de las subunidades citosólicas. Se activa Rac y se transloca al fagosoma, donde se añadirá p67phox, proceso que es dependiente de GTP. Una vez concluido el proceso de ensamblaje de todo el complejo enzimático de NOX2 se desencadena la producción de especies reactivas del oxígeno, las cuales son fundamentales para ejercer la lisis y destrucción de bacterias y cuerpos extraños, siendo así la defensa del organismo una de las principales funciones de NOX2 (125).

Si bien NOX2 ha sido implicado en múltiples procesos fisiológicos, de igual manera se ha encontrado que participa en varios procesos fisiopatológicos. La producción excesiva de esta enzima genera daño por medio de las especies reactivas del oxígeno que ya han sido mencionadas anteriormente. Sin embargo, de igual manera la disminución o ausencia de la expresión de NOX2 también desencadena enfermedades dentro de las cuales destaca la enfermedad granulomatosa crónica (CGD), la cual es una inmunodeficiencia en que por mutaciones se altera la expresión de alguna de las subunidades como p22phox, p47phox y p67phox, lo que conduce a una deficiente o ausente NOX2 que desencadena finalmente en una respuesta oxidante microbicida deteriorada, generando así infecciones recurrentes en estos pacientes (131). Existen muchas otras asociaciones en las cuales se ha implicado a NOX2 como el productor de ROS que genera enfermedades, por ejemplo, en DMD el ROS derivado de NOX2 altera la función del receptor de rianodina, modificando así, el flujo o manipulación de calcio en los cardiomiocitos (17).

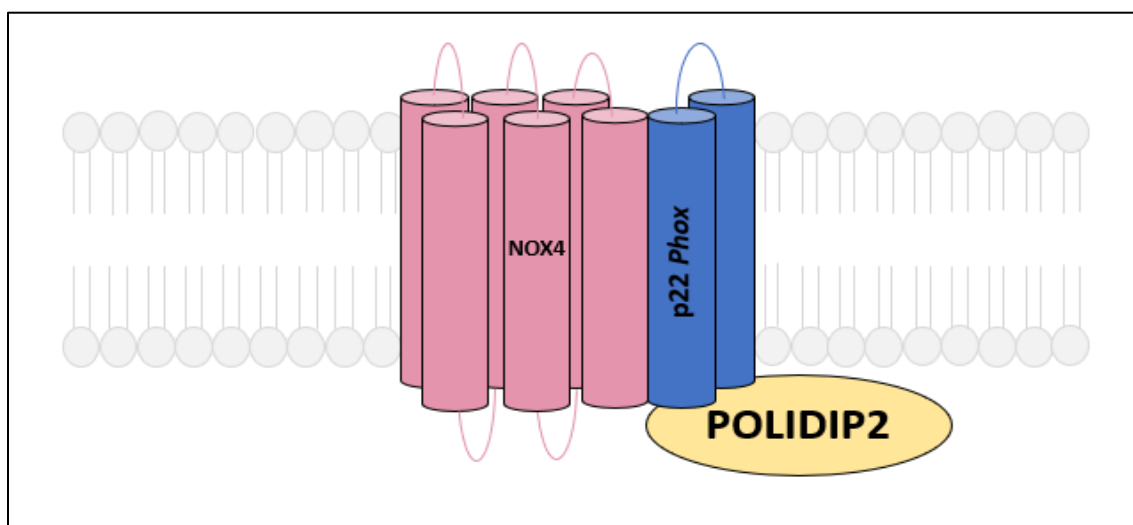
### 5.11.2.2 NOX4

La enzima NADPH oxidasa 4 (NOX4) es uno de los siete miembros de la familia NADPH oxidasas, NOX4 fue identificada por primera vez en el riñón en el año 2001, por lo cual, en comparación a NOX2 la información que se tiene de esta es bastante más reducida. Sin embargo, se ha demostrado que es el único miembro de su familia que produce constitutivamente peróxido de hidrógeno y a la vez se conoce que esta enzima se ha encontrado distribuida en gran manera en los tejidos humanos, dentro de los cuales destacan el tejido renal, el endotelio de los vasos sanguíneos, osteoclastos y células del músculo liso. NOX4 posee una localización subcelular característica o específica de cada tipo de célula, desde las mitocondrias, núcleo, adherencias focales, retículo endoplasmático, entre otros orgánulos, se encuentra a esta enzima con una distribución, grado de expresión y organización diferente. Con el pasar de los años se ha ampliado el conocimiento que se tiene a cerca de esta NADPH con respecto a su gen, estructura y función (125, 132).

Con respecto a la estructura de NOX4 se sabe que el sitio catalítico está conformado por 578 aminoácidos y posee una masa molecular de 28 kDa, mientras que la estructura completa de esta enzima posee un peso de 66,5 kDa y está conformada por solo dos proteínas que son NOX4 y p22phox, a diferencia de los otros miembros de la familia. La estructura de esta NOX4 está conformada por seis membranas o hélices que están conectadas a su vez por cinco bucles, denominados desde la A hasta la E, también existe un dominio deshidrogenasa (DH) los que brindan el sitio de unión para sus dos grupos prostéticos FAD y NADPH y finalmente un carbono terminal citoplasmático relativamente largo. Los bucles A, C y E se expresan hacia el exterior donde son producidos en su mayoría los ROS, mientras que por otro lado los bucles B y D se ubican hacia el interior o parte citoplasmática donde también se encuentra el dominio deshidrogenasa. Dentro de las hélices ya mencionadas es la tercera y la quinta que manifiestan cuatro residuos de histidina altamente conservados a los cuales se asocia su capacidad de reducir el oxígeno molecular y producir peróxido de hidrogeno y no superóxido como los demás miembros de su familia. Por otro lado, la función de los bucles A y C aún no se tiene bien determinada (132).



Dentro de la estructura de NOX4 se encuentra la presencia de múltiples proteínas con diferentes funciones dentro de las cuales destacan Polidip2 que actúa como un regulador de este NOX dentro de células vasculares, Hsp70 el cual es un regulador negativo de NOX4, Tks4/5 el cual se une al complejo principal de NOX4 y p22phox, específicamente por medio de este último y promueve la activación del complejo. Sumadas a las proteínas ya mencionadas se encuentran muchas más como la proteína disulfuro isomerasa (PDI), una chaperona de la superfamilia de tiorredoxina que regula positivamente la actividad de NOX4 y otras que si bien han sido detectadas no se conoce exactamente el mecanismo mediante el cual actúan, sin embargo, se encuentran representadas en la figura 2 (125, 126, 132).



**Figura 11: Estructura de la NADPH oxidasa 4.** La estructura de NOX4 está compuesta por múltiples proteínas. Se ilustran los componentes proteicos de la NADPH oxidasa 4. Tomado y adaptado de Guo, S. 2015. (132)

La regulación de la expresión de NOX4 no se encuentra muy bien aclarada, a pesar de ello existen algunas publicaciones que declaran que esta enzima está regulada por un grupo de factores transcripcionales como el micro ARN-25 y el micro ARN-21(132).

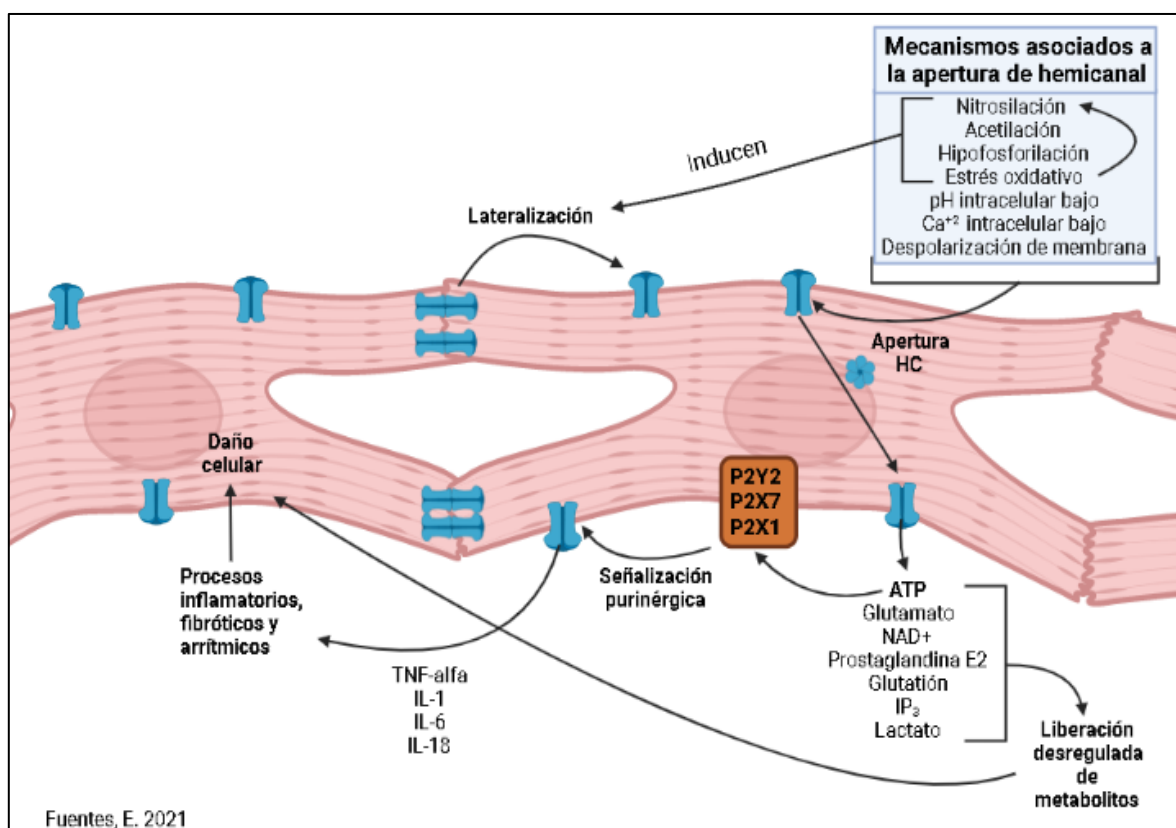
Con respecto al funcionamiento de NOX4 se ha demostrado que no existe necesidad de la participación de subunidades citosólicas a diferencia de la mayoría de los miembros de la familia NADPH oxidasas. La activación o regulación positiva de esta enzima ocurre por varios estímulos, como la hipoxia, hiperoxia, hiperglicemia, esfuerzo físico y el factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (TGF  $\beta 1$ ). Las principales funciones que se asocian a NOX4 son la producción de peróxido de hidrogeno, lo que se ha implicado en la muerte y senescencia celular, sumado a esto, bajo ciertas condiciones ha demostrado tener acción protectora en procesos isquémicos, ya que promueve el proceso de angiogénesis del endotelio, todo esto mediante la producción de ROS, también su función se ha asociado a proliferación y migración celular (132). De hecho, se ha postulado que la actividad de NOX4 en un circuito extracelular posee acción similar a la super óxido dismutasa y acelera la dismutación espontanea de oxígeno para producir peróxido de hidrógeno. Este último hecho es estudiado ya que se ha observado que la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conduce a un aumento en la expresión del factor HIF1 que es un sensor clave de la hipoxia, de lo cual se puede desprender la asociación que se le hace a NOX4 como un sensor de hipoxia. Finalmente, otra de las funciones que se encuentra como foco de estudio en esta NADPH oxidasa es la de ser un protector cardíaco, evitando procesos ateroscleróticos como un vaso protector en el endotelio (133, 134).

Los mecanismos fisiopatológicos por los cuales se ha asociado a NOX4 son múltiples, pero todos tienen un factor en común, la producción de ROS. No podemos olvidar que las especies reactivas del oxígeno producen daño a nivel de ADN, lípidos y proteínas, lo que desencadena finalmente la muerte celular mediante mecanismos como la activación de MAP quinasa o bien mediante una muy elevada concentración de ROS que inhibe la acción de las caspasas pasando así de apoptosis a necrosis (125).

De lo anterior se desprende que una elevada producción de NOX4 se haya asociado a patologías como la aterosclerosis, gravedad en accidente cerebro vascular y favorecer el aneurisma aórtico en la enfermedad de Marfan, la cual es producida por mutaciones que afectan el tejido conectivo, esquelético y especialmente el vascular, sobre el cual tiene un

gran efecto las ROS producidas por NOX4 y de ahí viene la asociación al daño aórtico en esta enfermedad (135). Por el lado contrario no se ha descrito deficiencias en humanos ni en mamíferos de la enzima en cuestión.

La relación de las NADPH oxidasas con la DMD se ha logrado establecer por la acción que genera el estrés oxidativo sobre la Cx43, demostrado en el estudio realizado por Vielma, A en el año 2020 (17). Lo cual fue desarrollado en capítulos anteriores de esta revisión.



**Figura 12: Principales mecanismos implicados en el daño celular asociado a hemicanales de Cx43 en la DMD.** Se resumen los principales mecanismos que participan en el daño de los cardiomiocitos en la DMD, asociado a la apertura de los HCs de Cx43 por diversos estímulos que desencadenan vías de señalización que concluyen en daño celular y disfunción cardíaca.

## 6. CONCLUSIONES

En la literatura y estudios analizados se evidencia que las posibles etiologías de la enfermedad de Duchenne son variadas y por ende no se dispone de un tratamiento curativo. Sin embargo, es posible mencionar que la Cx43 posee un rol importante en la patología de la enfermedad de Duchenne, causando alteraciones cardíacas como la arritmia ventricular, insuficiencia cardíaca, entre otras.

En la DMD, la Cx43 se encuentra erróneamente en las membranas laterales de los cardiomiocitos. Asociado a lo anterior, se evidencia un aumento de la nitrosilación de la Cx43 en el tejido cardíaco con DMD, estudiado en modelos de ratones mdx. Sumado a esto, también se ha logrado asociar la hipofosforilación de los residuos de serina 325, 328 y 330 de Cx43 en corazones DMD humanos y de ratones, lo cual coopera en el fenómeno de remodelación o lateralización de la conexina en cuestión. Finalmente, existe también asociado a la lateralización, participación de una elevada acetilación de Cx43 por la enzima HAT sobreexpresada. Todo esto en conjunto, sumado a la participación del estrés oxidativo, genera la apertura desregulada del HC de Cx43, permitiendo el paso irregular de muchas moléculas como el ATP, potenciando el daño del tejido cardíaco en las personas con enfermedad de Duchenne.

Estudios relacionados a los mecanismos alterados de la Cx43 han demostrado que es posible utilizarla como diana terapéutica en miocardiopatías como la presente en la enfermedad de Duchenne, sin embargo, es necesario incrementar la investigación en esta área a manera de generar mayor evidencia.

## 7. REFERENCIAS

1. Cammarata-Scalisi F, Camacho N, Alvarado J, Lacruz-Rengel MA. Distrofia muscular de Duchenne, presentación clínica. *Revista chilena de pediatría*. 2008;79:495-501.
2. Huamán-Dianderas FD, Guevara-Fujita ML, Málaga DR, Estrada-Cuzcano A, Fujita R. [Detection of mutations causing Duchenne and Becker muscular dystrophies: multiplex polymerase chain reaction vs. Multiplex ligation dependent probe amplification]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2019;36(3):475-80.
3. Guerra M, Suárez-Obando F, Robles R, Ayala P. Distrofia Muscular de Duchenne/Becker. 2019;52:8-14.
4. Vieitez I, Gallano P, González-Quereda L, Borrego S, Marcos I, Millán JM, et al. Mutational spectrum of Duchenne muscular dystrophy in Spain: Study of 284 cases. *Neurologia*. 2017;32(6):377-85.
5. Silva CT, Fonseca DJ, Mateus H, Contreras N, Restrepo CM. Distrofia muscular de Duchenne y Becker: Una visión molecular. *Acta Medica Colombiana*. 2005;30:112-6.
6. Falzarano MS, Scotton C, Passarelli C, Ferlini A. Duchenne Muscular Dystrophy: From Diagnosis to Therapy. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2015;20(10):18168-84.
7. Chaustre R DM, Chona S W. Distrofia muscular de duchenne: perspectivas desde la rehabilitación. *Revista Med*. 2011;19:37-44.
8. Aartsma-Rus A, Ginjaar IB, Bushby K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *Journal of medical genetics*. 2016;53(3):145-51.
9. Silva THD, Anequini IP, Fávero FM, Voos MC, Oliveira ASB, Telles JAR, et al. Functional performance and muscular strength in symptomatic female carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Arq Neuropsiquiatr*. 2020;78(3):143-8.
10. San Martín P P, Solis F F, Cavada Ch G. Sobrevida de pacientes con distrofia muscular de Duchenne. *Revista chilena de pediatría*. 2018;89:477-83.
11. Birnkrant DJ, Bushby K, Bann CM, Alman BA, Apkon SD, Blackwell A, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: respiratory, cardiac, bone health, and orthopaedic management. *The Lancet Neurology*. 2018;17(4):347-61.

12. Waldrop MA, Flanigan KM. Update in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Curr Opin Neurol.* 2019;32(5):722-7.
13. Osorio A, Cantillo J, Salas A, Garrido M, Vílchez J. Consenso para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento del paciente con distrofia muscular de Duchenne. *Neurología.* 2018;34.
14. Viñet L. Distrofia Muscular de Duchenne. A propósito de un caso. *Cuba.*2018.
15. Salas A. Distrofia muscular de Duchenne. *Anales de Pediatría Continuada.* 2014;12:47–54.
16. Ortez C, Natera de Benito D, Carrera García L, Expósito J, Nolasco G, Nascimento A. [Advances in the treatment of Duchenne muscular dystrophy]. *Medicina (B Aires).* 2019;79 Suppl 3:77-81.
17. Vielma AZ, Boric MP, Gonzalez DR. Apocynin Treatment Prevents Cardiac Connexin 43 Hemichannels Hyperactivity by Reducing Nitroso-Redox Stress in Mdx Mice. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15).
18. Galve Basilio E, Manterola FA, Ballester Rodés M, Castro Beiras A, Fernández de Soria Pantoja R, Penas Lado M, et al. Guías de práctica clínica de la Sociedad Española de Cardiología en miocardiopatías y miocarditis. *Revista Española de Cardiología.* 2000;53(3):360-93.
19. Estigarribia Passaro J. Clasificación de las miocardiopatías. Un objetivo, muchas propuestas. *Revista Uruguaya de Cardiología.* 2019;34:245-83.
20. Shih JA, Folch A, Wong BL. Duchenne Muscular Dystrophy: the Heart of the Matter. *Curr Heart Fail Rep.* 2020;17(3):57-66.
21. Lillo MA, Himelman E, Shirokova N, Xie LH, Fraidenraich D, Contreras JE. S-nitrosylation of connexin43 hemichannels elicits cardiac stress-induced arrhythmias in Duchenne muscular dystrophy mice. *JCI Insight.* 2019;4(24).
22. Romero Millares RL, Rodríguez Gómez Y, García Hernández RA, Lorendis Sarduy C, Romero Rodríguez BR. Supervisión cardiovascular de paciente con Cardiomiopatía de Duchenne severa en rehabilitación neurorespiratoria. Presentación de un caso. *Revista Cubana de Medicina Física y Rehabilitación; Vol 10, No 1 (2018): Enero-Abril.* 2018.
23. Kamdar F, Garry DJ. Dystrophin-Deficient Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2016;67(21):2533-46.

24. Bachur C, Garcia M, Garcia C, Requel R, Bachur J. Analysis of cardiac exams: electrocardiogram and echocardiogram use In Duchenne muscular dystrophies. *Fisioterapia em Movimento*. 2014;27:429-36.
25. Delgado Roche L, Martínez Sánchez G. El estrés oxidativo en la enfermedad cardiovascular: evidencias para un tratamiento más integral. *Revista Cubana de Farmacia*. 2009;43:0-.
26. Robards A, J. Parallels in Cell to Cell Junctions in Plants and Animals. structural and molecular diversity of the gap junctions 1990. p. 1 - 12.
27. Urquiza S, Carezzano F. The celular junctions and the emergence of animals. 2013. p. 353.
28. Alberts B, Johnson A, Lewis J. *Molecular Biology of the Cell*. New York 2002. 1400 p.
29. Harris AL. Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2007;94(1-2):120-43.
30. Nielsen MS, Axelsen LN, Sorgen PL, Verma V, Delmar M, Holstein-Rathlou N-H. Gap junctions. *Comprehensive Physiology*. 2012;2(3):1981-2035.
31. Zheng-Fischhöfer Q, Ghanem A, Kim JS, Kibschull M, Schwarz G, Schwab JO, et al. Connexin31 cannot functionally replace connexin43 during cardiac morphogenesis in mice. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 4):693-701.
32. Winterhager E, Pielensticker N, Freyer J, Ghanem A, Schrickel JW, Kim JS, et al. Replacement of connexin43 by connexin26 in transgenic mice leads to dysfunctional reproductive organs and slowed ventricular conduction in the heart. *BMC Dev Biol*. 2007;7:26.
33. Beyer EC, Berthoud VM. Gap junction gene and protein families: Connexins, innexins, and pannexins. *Biochimica et biophysica acta Biomembranes*. 2018;1860(1):5-8.
34. Xing L, Yang T, Cui S, Chen G. Connexin Hemichannels in Astrocytes: Role in CNS Disorders. *Front Mol Neurosci*. 2019;12:23.
35. Laird DW. Life cycle of connexins in health and disease. *The Biochemical journal*. 2006;394(Pt 3):527-43.

36. Andelova K, Egan Benova T, Szeiffova Bacova B, Sykora M, Prado NJ, Diez ER, et al. Cardiac Connexin-43 Hemichannels and Pannexin1 Channels: Provocative Antiarrhythmic Targets. *Int J Mol Sci.* 2020;22(1).
37. Michela P, Velia V, Aldo P, Ada P. Role of connexin 43 in cardiovascular diseases. *Eur J Pharmacol.* 2015;768:71-6.
38. Giessmann D, Theiss C, Breipohl W, Meller K. Decreased gap junctional communication in neurobiotin microinjected lens epithelial cells after taxol treatment. *Anat Embryol (Berl).* 2005;209(5):391-400.
39. Thomas T, Jordan K, Laird DW. Role of cytoskeletal elements in the recruitment of Cx43-GFP and Cx26-YFP into gap junctions. *Cell Commun Adhes.* 2001;8(4-6):231-6.
40. Qu C, Gardner P, Schrijver I. The role of the cytoskeleton in the formation of gap junctions by Connexin 30. *Exp Cell Res.* 2009;315(10):1683-92.
41. He LQ, Cai F, Liu Y, Liu MJ, Tan ZP, Pan Q, et al. Cx31 is assembled and trafficked to cell surface by ER-Golgi pathway and degraded by proteasomal or lysosomal pathways. *Cell Res.* 2005;15(6):455-64.
42. Falk MM, Kells RM, Berthoud VM. Degradation of connexins and gap junctions. *FEBS Lett.* 2014;588(8):1221-9.
43. Laing JG, Beyer EC. The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway. *J Biol Chem.* 1995;270(44):26399-403.
44. Qin H, Shao Q, Igdoura SA, Alaoui-Jamali MA, Laird DW. Lysosomal and proteasomal degradation play distinct roles in the life cycle of Cx43 in gap junctional intercellular communication-deficient and -competent breast tumor cells. *J Biol Chem.* 2003;278(32):30005-14.
45. Srinivas M, Verselis VK, White TW. Human diseases associated with connexin mutations. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2018;1860(1):192-201.
46. García IE, Prado P, Pupo A, Jara O, Rojas-Gómez D, Mujica P, et al. Connexinopathies: a structural and functional glimpse. *BMC Cell Biol.* 2016;17 Suppl 1(Suppl 1):17.
47. Heathcote K, Syrris P, Carter ND, Patton MA. A connexin 26 mutation causes a syndrome of sensorineural hearing loss and palmoplantar hyperkeratosis (MIM 148350). *J Med Genet.* 2000;37(1):50-1.



48. Maestrini E, Korge BP, Ocaña-Sierra J, Calzolari E, Cambiaghi S, Scudder PM, et al. A missense mutation in connexin26, D66H, causes mutilating keratoderma with sensorineural deafness (Vohwinkel's syndrome) in three unrelated families. *Hum Mol Genet.* 1999;8(7):1237-43.
49. Alexandrino F, Sartorato EL, Marques-de-Faria AP, Steiner CE. G59S mutation in the GJB2 (connexin 26) gene in a patient with Bart-Pumphrey syndrome. *Am J Med Genet A.* 2005;136(3):282-4.
50. Saporta MA, Shy ME. Inherited peripheral neuropathies. *Neurol Clin.* 2013;31(2):597-619.
51. Abrams CK, Scherer SS. Gap junctions in inherited human disorders of the central nervous system. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1818(8):2030-47.
52. Paznekas WA, Boyadjiev SA, Shapiro RE, Daniels O, Wollnik B, Keegan CE, et al. Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am J Hum Genet.* 2003;72(2):408-18.
53. Shaw RM, Saffitz JE. A role for connexin-43 in Duchenne muscular dystrophy cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 2020;130(4):1608-10.
54. Luo B, Yan Y, Zeng Z, Zhang Z, Liu H, Li J, et al. Connexin 43 reduces susceptibility to sympathetic atrial fibrillation. *Int J Mol Med.* 2018;42(2):1125-33.
55. Mathias RT, White TW, Gong X. Lens gap junctions in growth, differentiation, and homeostasis. *Physiol Rev.* 2010;90(1):179-206.
56. Gao J, Sun X, Martinez-Wittinghan FJ, Gong X, White TW, Mathias RT. Connections between connexins, calcium, and cataracts in the lens. *J Gen Physiol.* 2004;124(4):289-300.
57. Laird DW, Naus CC, Lampe PD. SnapShot: Connexins and Disease. *Cell.* 2017;170(6):1260-e1.
58. Paul DL, Ebihara L, Takemoto LJ, Swenson KI, Goodenough DA. Connexin46, a novel lens gap junction protein, induces voltage-gated currents in nonjunctional plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *J Cell Biol.* 1991;115(4):1077-89.
59. Belousov AB, Fontes JD, Freitas-Andrade M, Naus CC. Gap junctions and hemichannels: communicating cell death in neurodevelopment and disease. *BMC Cell Biol.* 2017;18(Suppl 1):4.

60. Hofer A, Dermietzel R. Visualization and functional blocking of gap junction hemichannels (connexons) with antibodies against external loop domains in astrocytes. *Glia*. 1998;24(1):141-54.
61. Dermietzel R, Traub O, Hwang TK, Beyer E, Bennett MV, Spray DC, et al. Differential expression of three gap junction proteins in developing and mature brain tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(24):10148-52.
62. Bargiotas P, Monyer H, Schwaninger M. Hemichannels in cerebral ischemia. *Curr Mol Med*. 2009;9(2):186-94.
63. Contreras JE, Sánchez HA, Eugenin EA, Speidel D, Theis M, Willecke K, et al. Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(1):495-500.
64. Tarzemanly R, Jiang G, Jiang JX, Larjava H, Häkkinen L. Connexin 43 Hemichannels Regulate the Expression of Wound Healing-Associated Genes in Human Gingival Fibroblasts. *Scientific reports*. 2017;7(1):14157-.
65. Chandrasekhar A, Bera AK. Hemichannels: permeants and their effect on development, physiology and death. *Cell Biochem Funct*. 2012;30(2):89-100.
66. Leybaert L, Lampe PD, Dhein S, Kwak BR, Ferdinandy P, Beyer EC, et al. Connexins in Cardiovascular and Neurovascular Health and Disease: Pharmacological Implications. *Pharmacological reviews*. 2017;69(4):396-478.
67. Gadicherla AK, Wang N, Bulic M, Agullo-Pascual E, Lissoni A, De Smet M, et al. Mitochondrial Cx43 hemichannels contribute to mitochondrial calcium entry and cell death in the heart. *Basic Res Cardiol*. 2017;112(3):27.
68. Sáez JC, Leybaert L. Hunting for connexin hemichannels. *FEBS Lett*. 2014;588(8):1205-11.
69. Schalper KA, Sánchez HA, Lee SC, Altenberg GA, Nathanson MH, Sáez JC. Connexin 43 hemichannels mediate the Ca<sup>2+</sup> influx induced by extracellular alkalinization. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;299(6):C1504-15.
70. Fiori MC, Figueroa V, Zoghbi ME, Saéz JC, Reuss L, Altenberg GA. Permeation of calcium through purified connexin 26 hemichannels. *J Biol Chem*. 2012;287(48):40826-34.

71. Esseltine JL, Laird DW. Next-Generation Connexin and Pannexin Cell Biology. *Trends Cell Biol.* 2016;26(12):944-55.
72. Retamal MA, Reyes EP, García IE, Pinto B, Martínez AD, González C. Diseases associated with leaky hemichannels. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:267.
73. Cotrina ML, Lin JH, Nedergaard M. Adhesive properties of connexin hemichannels. *Glia.* 2008;56(16):1791-8.
74. Rhett JM, Yeh ES. The Potential for Connexin Hemichannels to Drive Breast Cancer Progression through Regulation of the Inflammatory Response. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4).
75. Cocozzelli AG, White TW. Connexin 43 Mutations Lead to Increased Hemichannel Functionality in Skin Disease. *Int J Mol Sci.* 2019;20(24).
76. Price GW, Chadjichristos CE, Kavvadas P, Tang SCW, Yiu WH, Green CR, et al. Blocking Connexin-43 mediated hemichannel activity protects against early tubular injury in experimental chronic kidney disease. *Cell Commun Signal.* 2020;18(1):79.
77. Duffy HS, Fort AG, Spray DC. Cardiac connexins: genes to nexus. *Adv Cardiol.* 2006;42:1-17.
78. Copen SR, Kaba RA, Halliday D, Dupont E, Skepper JN, Elneil S, et al. Comparison of connexin expression patterns in the developing mouse heart and human foetal heart. *Mol Cell Biochem.* 2003;242(1-2):121-7.
79. Desplantez T. Cardiac Cx43, Cx40 and Cx45 co-assembling: involvement of connexins epitopes in formation of hemichannels and Gap junction channels. *BMC Cell Biol.* 2017;18(Suppl 1):3.
80. Leithe E, Mesnil M, Aasen T. The connexin 43 C-terminus: A tail of many tales. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2018;1860(1):48-64.
81. Boengler K, Schulz R. Connexin 43 and Mitochondria in Cardiovascular Health and Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2017;982:227-46.
82. Pohl U. Connexins: Key Players in the Control of Vascular Plasticity and Function. *Physiol Rev.* 2020;100(2):525-72.
83. Nagy JI, Ochalski PA, Li J, Hertzberg EL. Evidence for the co-localization of another connexin with connexin-43 at astrocytic gap junctions in rat brain. *Neuroscience.* 1997;78(2):533-48.

84. Cotrina ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, Liu S, Li J, Azmi-Ghadimi H, et al. Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(26):15735-40.
85. Kang J, Kang N, Lovatt D, Torres A, Zhao Z, Lin J, et al. Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J Neurosci*. 2008;28(18):4702-11.
86. Genetos DC, Kephart CJ, Zhang Y, Yellowley CE, Donahue HJ. Oscillating fluid flow activation of gap junction hemichannels induces ATP release from MLO-Y4 osteocytes. *J Cell Physiol*. 2007;212(1):207-14.
87. Schwanke U, Konietzka I, Duschin A, Li X, Schulz R, Heusch G. No ischemic preconditioning in heterozygous connexin43-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(4):H1740-2.
88. Boengler K, Schulz R, Heusch G. Connexin 43 signalling and cardioprotection. *Heart*. 2006;92(12):1724-7.
89. Leykauf K, Dürst M, Alonso A. Phosphorylation and subcellular distribution of connexin43 in normal and stressed cells. *Cell Tissue Res*. 2003;311(1):23-30.
90. Schulz R, Boengler K, Totzeck A, Luo Y, Garcia-Dorado D, Heusch G. Connexin 43 in ischemic pre- and postconditioning. *Heart Fail Rev*. 2007;12(3-4):261-6.
91. Clarke TC, Williams OJ, Martin PE, Evans WH. ATP release by cardiac myocytes in a simulated ischaemia model: inhibition by a connexin mimetic and enhancement by an antiarrhythmic peptide. *Eur J Pharmacol*. 2009;605(1-3):9-14.
92. Himelman E, Lillo MA, Nouet J, Gonzalez JP, Zhao Q, Xie LH, et al. Prevention of connexin-43 remodeling protects against Duchenne muscular dystrophy cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 2020;130(4):1713-27.
93. Sepp R, Severs NJ, Gourdie RG. Altered patterns of cardiac intercellular junction distribution in hypertrophic cardiomyopathy. *Heart*. 1996;76(5):412-7.
94. Schultz JG, Andersen S, Andersen A, Nielsen-Kudsk JE, Nielsen JM. Evaluation of cardiac electrophysiological properties in an experimental model of right ventricular hypertrophy and failure. *Cardiol Young*. 2016;26(3):451-8.
95. Boulaksil M, Bierhuizen MFA, Engelen MA, Stein M, Kok BJM, van Amersfoorth SCM, et al. Spatial Heterogeneity of Cx43 is an Arrhythmogenic Substrate of Polymorphic

Ventricular Tachycardias during Compensated Cardiac Hypertrophy in Rats. *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2016;3:5-.

96. Nouet J, Himelman E, Lahey KC, Zhao Q, Fraidenraich D. Connexin-43 reduction prevents muscle defects in a mouse model of manifesting Duchenne muscular dystrophy female carriers. *Scientific reports*. 2020;10(1):5683-.

97. Remo BF, Qu J, Volpicelli FM, Giovannone S, Shin D, Lader J, et al. Phosphatase-resistant gap junctions inhibit pathological remodeling and prevent arrhythmias. *Circulation research*. 2011;108(12):1459-66.

98. Gonzalez JP, Ramachandran J, Himelman E, Badr MA, Kang C, Nouet J, et al. Normalization of connexin 43 protein levels prevents cellular and functional signs of dystrophic cardiomyopathy in mice. *Neuromuscular Disorders*. 2018;28(4):361-72.

99. Moreno A. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to channel gating canal. 2005.

100. Solan JL, Lampe PD. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1711(2):154-63.

101. Solan JL, Lampe PD. Key connexin 43 phosphorylation events regulate the gap junction life cycle. *J Membr Biol*. 2007;217(1-3):35-41.

102. Laird DW. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1711(2):172-82.

103. Gonzalez JP, Ramachandran J, Xie LH, Contreras JE, Fraidenraich D. Selective Connexin43 Inhibition Prevents Isoproterenol-Induced Arrhythmias and Lethality in Muscular Dystrophy Mice. *Sci Rep*. 2015;5:13490.

104. Wang N, De Vuyst E, Ponsaerts R, Boengler K, Palacios-Prado N, Wauman J, et al. Selective inhibition of Cx43 hemichannels by Gap19 and its impact on myocardial ischemia/reperfusion injury. *Basic Res Cardiol*. 2013;108(1):309.

105. Kazunori Y, Satoshi O. Identification of the sequence determinants of protein N-terminal acetylation through a decision tree approach. 2017.

106. Colussi C, Rosati J, Straino S, Spallotta F, Berni R, Stilli D, et al. N $\epsilon$ -lysine acetylation determines dissociation from GAP junctions and lateralization of connexin 43 in normal and dystrophic heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(7):2795-800.

107. Baeza J, Smallegan MJ, Denu JM. Mechanisms and Dynamics of Protein Acetylation in Mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 2016;41(3):231-44.
108. Whitehead NP, Pham C, Gervasio OL, Allen DG. N-Acetylcysteine ameliorates skeletal muscle pathophysiology in mdx mice. *J Physiol.* 2008;586(7):2003-14.
109. Giepman BN. Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovasc Res.* 2004;62(2):233-45.
110. Spange S, Wagner T, Heinzl T, Krämer OH. Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(1):185-98.
111. di Bari MG, Ciuffini L, Mingardi M, Testi R, Soddu S, Barilà D. c-Abl acetylation by histone acetyltransferases regulates its nuclear-cytoplasmic localization. *EMBO Rep.* 2006;7(7):727-33.
112. Guzmán L. S - NITROSILACIÓN DE PROTEÍNAS: IMPLICANCIAS EN LA BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER *Revista Farmaciencia* Diciembre; 2013. p. 9
113. Anand P, Stamler JS. Enzymatic mechanisms regulating protein S-nitrosylation: implications in health and disease. *J Mol Med (Berl).* 2012;90(3):233-44.
114. Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(2):150-66.
115. Soetkamp D, Nguyen TT, Menazza S, Hirschhäuser C, Hendgen-Cotta UB, Rassaf T, et al. S-nitrosation of mitochondrial connexin 43 regulates mitochondrial function. *Basic research in cardiology.* 2014;109(5):433-.
116. Cho DH, Nakamura T, Fang J, Cieplak P, Godzik A, Gu Z, et al. S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science.* 2009;324(5923):102-5.
117. Gonzalez DR, Beigi F, Treuer AV, Hare JM. Deficient ryanodine receptor S-nitrosylation increases sarcoplasmic reticulum calcium leak and arrhythmogenesis in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(51):20612-7.
118. Zhang YH. Nitric oxide signalling and neuronal nitric oxide synthase in the heart under stress. *F1000Research.* 2017;6:742-.
119. Shao Q, Casin KM, Mackowski N, Murphy E, Steenbergen C, Kohr MJ. Adenosine A1 receptor activation increases myocardial protein S-nitrosothiols and elicits protection

from ischemia-reperfusion injury in male and female hearts. *PLoS One*. 2017;12(5):e0177315.

120. Cutler MJ, Plummer BN, Wan X, Sun Q-A, Hess D, Liu H, et al. Aberrant S-nitrosylation mediates calcium-triggered ventricular arrhythmia in the intact heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(44):18186-91.

121. Korinthenberg R. A new era in the management of Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol*. 2019;61(3):292-7.

122. Ma JW, Ji DD, Li QQ, Zhang T, Luo L. Inhibition of connexin 43 attenuates oxidative stress and apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *BMC Pulm Med*. 2020;20(1):19.

123. Paredes Salido F, Roca Fernández JJ. Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular. *Offarm*. 2002;21(7):96-100.

124. Li R, Jia Z, Trush MA. Defining ROS in Biology and Medicine. *React Oxyg Species (Apex)*. 2016;1(1):9-21.

125. Buvelot H, Jaquet V, Krause KH. Mammalian NADPH Oxidases. *Methods Mol Biol*. 2019;1982:17-36.

126. Zhang Y, Murugesan P, Huang K, Cai H. NADPH oxidases and oxidase crosstalk in cardiovascular diseases: novel therapeutic targets. *Nature Reviews Cardiology*. 2020;17(3):170-94.

127. Arango Rincón JC, Gámez Díaz LY, López Quintero JÁ. Sistema NADPH oxidasa: nuevos retos y perspectivas. *Iatreia*. 2010;23:362-72.

128. Triana B, Bernabeu A, Piñeiro J, Milián M. NADPH-oxidasa fagocítica: Componentes, ensamblaje y mecanismo de acción. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 2001;20:59-63.

129. Konior A, Schramm A, Czesnikiewicz-Guzik M, Guzik TJ. NADPH oxidases in vascular pathology. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(17):2794-814.

130. Coyoy Salgado A, Morán J. Papel de las ERO producidas por las NOX en procesos fisiológicos. México: *Revista de educación bioquímica*; 2012. p. 100-9.

131. Cos Padrón Y, Marsán Suárez V, Sánchez Segura M, Macías Abraham C. Enfermedad granulomatosa crónica: Aspectos actuales. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 2004;20:0-.
132. Guo S, Chen X. The human Nox4: Gene, structure, physiological function and pathological significance. *Journal of drug targeting*. 2015;23:1-9.
133. Morawietz H. Cardiovascular protection by Nox4. *Cardiovascular Research*. 2018;114(3):353-5.
134. Schröder K, Zhang M, Benkhoff S, Mieth A, Pliquett R, Kosowski J, et al. Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. *Circ Res*. 2012;110(9):1217-25.
135. Valderrama Zurián FJ, Martín Gutiérrez V, Sorlí JV, Mingarro Castillo M, Ejarque Doménech I, Ortiz Uriarte R, et al. Marfan's syndrome. *Atencion primaria*. 2009;41(5):281-4.