



Magíster en Ciencias
Mención Radicales Libres
en Biomedicina

TITULO.

La activación de hemicanales formados por conexinas, promueve la entrada del ion calcio, el estrés oxidativo y la muerte celular, lo que es evitado por antioxidantes que bloquean los hemicanales.

**MAGISTER EN CIENCIAS
MENCIÓN RADICALES LIBRES EN BIOMEDICINA**

Nombre

Carolina Valeska Urrutia Álvarez

Director de tesis

Juan Carlos Sáez Carreño

Co-directores de tesis

Luis Andrés Cea Pisani

María Victoria Velarde Aliaga

INDICE

- Agradecimientos	3
- Resumen	4
- Abstract	6
- Introducción	8
- Hipótesis	13
- Objetivos	13
- Métodos	14
- Resultados	18
- Discusión	30
- Conclusión	36
- Bibliografía	37
- Anexos	42

Dedicada con todo mi amor a Sharif, mi familia y amigos

AGRADECIMIENTOS

A mi Tutor, el Dr. Juan Carlos Sáez, gracias por su sapiencia, consejos, paciencia y dedicación.

A mi Co-tutor, el Dr. Luis Cea por su apoyo, amabilidad y disposición en todo momento.

A mis compañeros de Laboratorio y Departamento de Fisiología de la PUC, Paolita, Teresita, Paloma, Daniela, José Luis, Anibal, Bruno, Adam, Fujiko, Carlos, Eli, Pablito, Keki, Valerie y Romina, agradezco el recibimiento, la amistad y la colaboración.

RESUMEN

Las conexinas (Cxs) son proteínas que forman hemicanales (HCs; HCs-Cxs) en la membrana celular, comunicando los medios intra y extracelulares, permitiendo el paso de iones y moléculas pequeñas. En este estudio se evaluó, la participación de los HCs en el ingreso de Ca^{2+} , la generación de ERO y la muerte celular. Además, se evaluó si los antioxidantes Tempol, Resveratrol y NAC bloquean los HCs formados por Cx43. Se utilizaron células HeLa parentales o transfectadas con Cx39, Cx43 o Cx45, incubadas en solución salina con pH 8,5, y/o en ausencia o presencia de Ca^{2+} extracelular, para aumentar la probabilidad de apertura de los HCs-Cxs. En todas las condiciones se evaluó la actividad de los HCs-Cxs (captación de etidio, Etd^+), la señal intracelular de Ca^{2+} libre (FURA-2), la generación de ERO (TBARS) y muerte celular (yoduro de propidio) en células HeLa no transfectadas o transfectadas con Cxs (HeLa-Cx39, HeLa-Cx43 o HeLa-Cx45). Además, dichos parámetros, exceptuando la muerte celular, se evaluaron en músculos denervados y no denervados de ratones silvestres y mutantes (deficientes de Cx43 y Cx45). Se observó que los tres tipos de HCs son activados por alcalinización o ausencia de cationes divalentes en la solución extracelular, pero la señal de Ca^{2+} intracelular aumentó solo en las células HeLa-Cx43 y HeLa-Cx45 incubadas en solución salina con iones divalentes, lo que más tarde se correlacionó con formación de ERO y muerte celular; la ausencia de Ca^{2+} extracelular o la carbenoxolona (bloqueador de los HCs) previno la muerte celular. Por otro lado, el contenido de TBARS en los músculos esqueléticos inervados de ratones mutantes deficientes en Cx43 y Cx45 fue menor que en los músculos denervados de animales silvestres. Además, los antioxidantes Tempol (500 μM) y Resveratrol (200 μM), pero no de NAC (5 mM), bloquearon los HCs-Cx43 en células expuestas a una solución salina libre de cationes divalentes. Por lo tanto, se propone que la muerte celular inducida por alcalinización es favorecida por la apertura de HCs permeables a Ca^{2+} . De este modo, la sobrecarga de Ca^{2+} intracelular sería el mediador directo de la generación de ERO y de la muerte celular. Además, se comprobó que la ausencia de los HCs formados por Cx43 y Cx45 en músculos de ratón, disminuye el estrés oxidativo, sugiriendo que los HCs expresados en músculos denervados favorecen la

generación de ERO posiblemente porque son permeables a Ca^{2+} . En la misma línea de pensamiento, como los antioxidantes Tempol y Resveratrol bloquearon los HCs-Cx43, se sugiere que además de ser antioxidantes per se, previenen el ingreso de Ca^{2+} a través de los HCs y por ende previenen que se gatille la formación de ERO. Esto último podría explicar la mayor efectividad de ciertos antioxidantes en el tratamiento de enfermedades asociadas a la generación de ERO.

ABSTRACT

Connexins are proteins that form hemichannels (HCs; HCs-Cxs) in the cell membrane communicating the intra and extracellular spaces where they allow transfer of ions and small molecules. In this study the participation of HCs was studied on Ca^{2+} inflow, ROS generation and cell death. In addition, the possible HC-Cx blocking effect of the antioxidant Tempol, Resveratrol and NAC was evaluated. Parental HeLa and Cx39, Cx43 and Cx45 HeLa cell transfectants were incubated in saline solution with pH 7.4 or 8.5, or without divalent cations to increase the open probability of HCs-Cxs. Under all conditions studied, the activity of HCs-Cxs [etidio (Etd^+) uptake], intracellular Ca^{2+} signal (FURA-2), ROS generation (TBARS) and cell death (propidium iodide labeling) was evaluated in parental Cx39, Cx43 or Cx45 transfected HeLa cells. In addition, those parameters but cell death were evaluated in denervated and innervated murine skeletal of wild type mice and skeletal muscle Cx43/Cx45 deficient mice. All three HCs were activated by extracellular alkalinization or absence of divalent cations in the extracellular saline solution, but the intracellular Ca^{2+} signal increased only in HeLa-Cx43 and HeLa-Cx45 cells bathed in saline solution contain divalent cations, which later was correlated with ROS formation and cell death. Moreover, alkalinization-induced cell death was prevented by the absence of extracellular divalent cations or treatment with carbenoxolone, a HC blocker. Moreover, the TBARS content in innervated muscles or denervated Cx deficient muscles was significantly lower than that of denervated muscles wild type muscles. In addition, Tempol (500 μM) and Resveratrol (200 μM), but not NAC (5 mM), blocked HCs-Cx43 in cell exposed to divalent cations-free saline solution. Therefore, it is proposed that cell death induced by alkalinization is favored by opening of HCs permeable to Ca^{2+} . Consequently, the intracellular Ca^{2+} overload induces generation of ROS and cell death. In addition, the lack of HC-Cx43 and HC-Cx45 in murine skeletal muscles reduced the oxidative stress, suggesting that HCs are likely an important membrane pathway for Ca^{2+} inflow that triggers the denervation-induced generation of ROS. In the same line of thought, Tempol and Resveratrol blocked HCs-Cx43, suggesting that in addition to their antioxidant effect they also prevent the Ca^{2+} inflow via HCs and

thus, prevent the generation of ROS. This could explain the efficacy of certain antioxidants for treating diseases associated to ROS generation.

INTRODUCCIÓN

Las conexinas (Cxs) comprenden una familia de proteínas que presentan 4 dominios transmembrana con los extremos NH₂- y COOH-terminales orientados hacia el interior de la célula (Sáez et al., 2010) (Fig. 1).

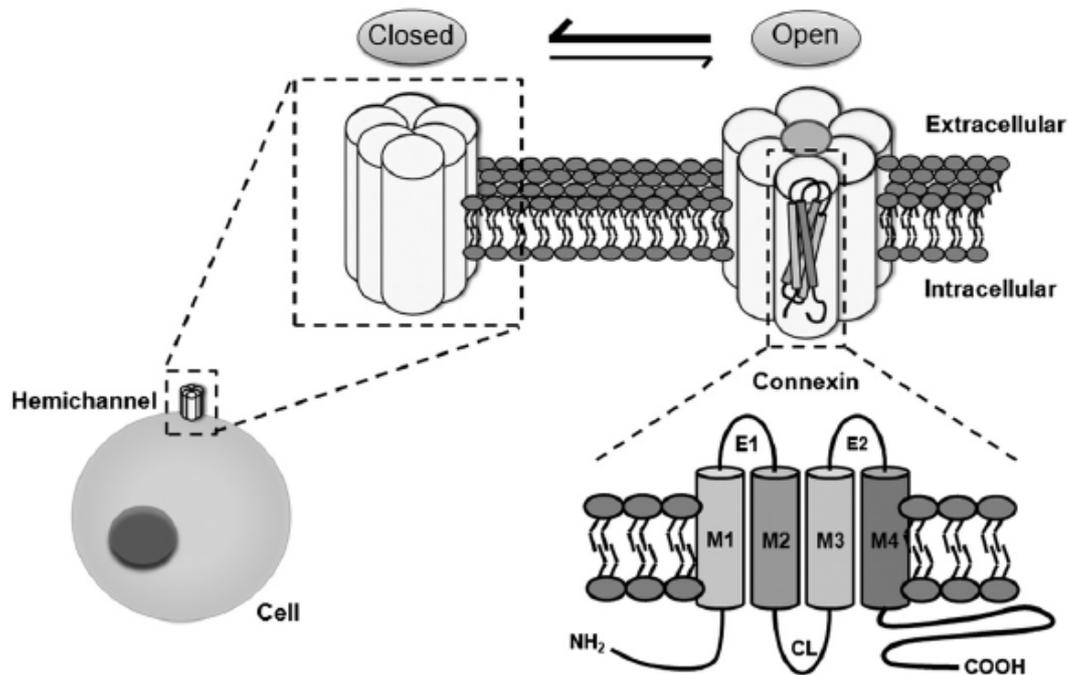


Figura 1. Diagrama que ilustra las estructuras básicas de los hemicanales formados por conexinas, presentes en la superficie celular. Cada conexina (Cx) consta de cuatro dominios transmembrana (M1-M4), dos asas extracelulares (E1 y E2) y una asa citoplásmica (CL). Los grupos amino (-NH₂) y carboxilo (-COOH) terminales son intracelulares. Un hemicanal está formado por seis Cxs que oligomerizan lateralmente dejando un poro central. En las células cultivadas en condiciones de reposo los hemicanales permanecen preferentemente cerrados, pero pueden ser activados por diversas condiciones fisiológicas y patológicas, lo que ofrece una ruta transmembrana difusional entre los ambientes intra y extracelulares (esquema extraído de Sáez et al., 2010).

Las Cxs también forman canales de unión en hendidura (CUH) y hemicanales (HCs). La función principal de los CUH es comunicar los compartimentos citoplasmáticos de células adyacentes y la de los HCs es comunicar los medios intra y extracelulares, permitiendo de este modo el paso de nutrientes, la liberación de productos metabólicos y la liberación de señales autocrinas y paracrinas como el ATP, la prostaglandina E₂ y el glutamato (Sáez et al., 2010; Schalper et al., 2008; Kang et al., 2008).

Los HCs se forman por la oligomerización de seis subunidades de Cxs, que son codificadas por 21 genes diferentes en los seres humanos (Sohl & Willecke 2004). En los músculos esqueléticos, tres conexinas (Cxs 39, 43 y 45) son expresadas durante la ontogenia (von Maltzahn et al., 2006) y la regeneración muscular (Araya et al., 2005; Trovato-Salinaro et al., 2009).

Por otro lado, es sabido que la apertura de los HCs formados por Cxs (HCs-Cxs) puede ser inducida por modificaciones covalentes de las Cxs como la nitrosilación inducida por óxido nítrico, la defosforilación y también aumenta con variaciones de las condiciones extracelulares como por ejemplo, el aumento del pH extracelular y la reducción extracelular de cationes divalentes (Ca²⁺/Mg²⁺) (Sáez et al., 2010).

Para inducir la apertura de los HCs-Cxs *in vitro*, se puede utilizar la exposición de las células a soluciones libres de cationes divalentes (Ca²⁺ y Mg²⁺) (Sáez et al., 2010). De forma análoga, se ha demostrado que el aumento de la concentración extracelular de Ca²⁺ disminuye la apertura de HCs-Cx43, en diversos tipos celulares que expresan estas proteínas (Li et al., 1996). Sin embargo, Schalper y cols. (2010) demostraron que los HCs-Cx43, en células HeLa, son rápidamente activados por la alcalinización extracelular a pH 8,5, a pesar de encontrarse en presencia de una alta concentración de Ca²⁺ extracelular, que reduciría la probabilidad de apertura de los HCs (Sáez et al., 2010). Además, se demostró que los HCs-Cx43 son permeables a Ca²⁺ y que desempeñan un papel relevante en el control del Ca²⁺ libre intracelular (Shalper et al., 2010).

El aumento del ingreso de Ca^{2+} al medio intracelular puede activar distintas vías metabólicas, como la lipasa dependiente de Ca^{2+} y consecuentemente aumenta la generación de ácido araquidónico que es metabolizado por oxidasas dependientes de oxígeno (lipoxigenasas y ciclooxigenasa) que generan ion superóxido (Sáez et al., 1987). Además, el aumento intracelular de Ca^{2+} estimula la conversión de la xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa, la que cataliza la formación de radicales superóxidos, que pueden reaccionar con óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$) generando peroxinitrito (ONOO^-), compuesto altamente reactivo (Powers et al., 2005). Por otro lado, la entrada masiva de Ca^{2+} a la mitocondria induce la formación del poro de transición en la membrana mitocondrial interna, llevando a un colapso el potencial electroquímico de protones, lo que provoca una disminución de ATP y un aumento en especies reactivas de oxígeno (ERO) promoviendo la apoptosis celular (Powers et al., 2010).

Las ERO pueden generarse en la célula, a través de procesos enzimáticos y no enzimáticos. Cualquier proteína o sistema enzimático que transfiera electrones puede generar ERO como subproductos de la reacción de transferencia electrónica. Este es el caso del citocromo P450 (en el retículo endoplasmático), los peroxisomas, la xantina oxidasa y la NADPH oxidasa. No obstante, en condiciones normales la principal fuente de ERO en células no fagocíticas es la mitocondria.

Cuando aumenta el contenido intracelular de ERO o ERN (especies reactivas derivadas del nitrógeno) y se sobrepasan las defensas antioxidantes de la célula, se produce un estado de estrés oxidativo, el cual tiene como consecuencia principal la modificación de biomoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo que afecta la estructura y frecuentemente la actividad biológica de moléculas y organelos celulares. Estos cambios se manifiestan en diversos estados patológicos donde se alteran funciones celulares, contribuyendo al desarrollo de diversas enfermedades (Valko et al., 2007).

Recientemente, se demostró que la atrofia muscular inducida por la denervación del músculo extensor *digitorum longus* (EDL), tiene relación con

un aumento de los niveles y la actividad de los HCs-Cxs, que se localizan en la membrana celular de las fibras musculares. Según Cea y cols. (2013) los niveles relativos de las Cxs 39, 43 y 45 aumentan significativamente en músculo EDL denervado en ratas Sprague-Dawley en comparación con el músculo inervado del mismo animal (músculo contralateral). Como resultado final, la falta de expresión de los HCs-Cxs previene drásticamente el desarrollo de atrofia muscular, sugiriendo que los HCs-Cxs participan en el desarrollo de la atrofia muscular, posiblemente por ser canales que permiten la entrada de Ca^{2+} , y con ello, se activan vías de degradación de proteínas. En otras células, la apertura de los HCs-Cx promueve la muerte celular por apoptosis (Decrock et al., 2009). Además, durante la ejecución del presente trabajo se demostró que mutaciones en la Cx31 generan HCs con ganancia de actividad, lo que se asocia con la generación de ERO y muerte celular por necrosis (Chi et al., 2012).

Por otro lado, la suplementación con compuestos antioxidantes ha resultado eficaz para contrarrestar el estrés oxidativo en una amplia variedad de tipos celulares y tejidos afectados a condiciones patológicas, y se especula que esto podría ser uno de los enfoques para reducir la degeneración muscular asociada a atrofia y envejecimiento (Appell et al., 1997). Sin embargo, la administración aguda de un conocido agente oxidante como es la vitamina E (60 mg/Kg) en ratas Wistar, disminuye la expresión de ubiquitinas ligasas (MuRF1) asociadas a la atrofia muscular, pero no afecta el nivel de especies radicalarias (GSH/GSSG), indicando que la vitamina E, no estaría ejerciendo su rol antioxidante en esta condición, lo que sugiere un mecanismo de acción desconocido de este antioxidante en la reducción de la atrofia muscular (Servais et al., 2007). Por otro lado, Estudios previos sugieren que el Resveratrol, un polifenol natural presente en el maní, los pinos, la piel de las uvas y el vino tinto (Soleas et al., 2001; Burns et al., 2002), protege el músculo esquelético de la influencia de ciertas condiciones catabólicas, incluyendo la diabetes (Chen et al., 2011), la distrofia muscular (Hori et al., 2011) y el cáncer (Shadfar et al., 2011). Sin embargo, se han reportado resultados contradictorios, donde la pérdida de masa muscular no fue impedida, o incluso fue empeorado por el Resveratrol (Busquets et al., 2007), por lo que el

mecanismo por el cual el Resveratrol protege el músculo esquelético de pérdida de masa muscular no está claramente establecido.

Considerando la evidencia anteriormente descrita, en la presente tesis se propuso inducir la apertura de HCs formados por las Cxs 39, 43 ó 45, con el fin de determinar si el aumento de la actividad de dichos HCs induce la generación de ERO y la muerte celular. Además, se propuso estudiar si algunas moléculas antioxidantes bloquean los HCs sensibles a cambios redox como lo son los HCs-Cx43 (Retamal et al., 2007).

HIPÓTESIS

La activación de hemicanales formados por las conexinas 39, 43 ó 45, induce la generación de especies radicales y la muerte celular, lo que es evitado por algunos antioxidantes.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar si el aumento de estrés oxidativo es causado por la apertura de HCs, lo cual precede la muerte celular.

Objetivo específicos:

1. Determinar si el pH 8,5 activa los hemicanales formados por las conexinas musculares (Cx39 y 45).
2. Evaluar si el ingreso de Ca^{2+} en las células HeLa que expresan conexinas 39, 43 ó 45 se produce a través de los hemicanales.
3. Evaluar si la activación de hemicanales formados por las conexinas 39, 43 ó 45 aumenta el estrés oxidativo en las células.
4. Determinar sí la apertura de hemicanales formados por conexinas 39, 43 ó 45 aumenta la muerte celular.
5. Determinar si el aumento de la actividad de los hemicanales formados por conexinas musculares en ratones denervados se relaciona con la generación de ERO.
6. Determinar si algunos agentes antioxidantes son bloqueadores de HCs-Cx43.

MÉTODOS

Cultivos de células.

Se utilizó células HeLa transfectadas con Cxs 39, 43 o 45 que fueron gentilmente donadas por el Dr. Klaus Willecke, Universidad de Bonn, Alemania. Las células HeLa transfectadas o sin transfectar (parental, grupo control) se cultivaron en placas Petri de plástico Nunc estériles, con medio DMEM suplementado con suero fetal de bovino al 10% y se mantuvieron en una incubadora a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ y 98% de humedad relativa.

Protocolo de alcalinización extracelular.

Las células se incubaron en una solución Krebs-Ringer [en mM: 145 NaCl, 5 KCl, 3 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5,6 C₆H₁₂O₆, 10 ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-pireracilil-etanosulfónico (HEPES)] ajustado a pH 7,4 ó pH 8,5 con hidroximetil aminometano (TRIS-base) y a una solución libre de cationes divalentes (Ca²⁺/Mg²⁺) (en mM: 154 NaCl, 5,4 KCl, 5 C₆H₁₂O₆, 10 HEPES y 0,5 EGTA) donde también se ajustó a pH 7,4 y a pH 8,5 con TRIS-base.

Captación de etidio.

Células HeLa sembradas sobre cubreobjetos de vidrio de 25 mm de diámetro se mantuvieron inmersas dentro de placas Nunc de 90 cm de diámetro. Luego de 48 h de cultivo alcanzaron una confluencia del 70% y se utilizaron para evaluar la captación de etidio (Etd⁺).

La captación de Etd⁺ se evaluó en células incubadas por 30 min en una solución Krebs-Ringer (pH 7,4 ó pH 8,5) o en una solución Krebs-Ringer libre de cationes divalentes (Ca²⁺/Mg²⁺) (pH 7,4 ó pH 8,5) que contenía 5 μM bromuro de Etd⁺. Para comprobar la participación de los HCs en los cambios de captación de Etd⁺ se aplicó 200 μM carbenoxolona (Cbx), un bloqueador de los HCs. La fluorescencia fue registrada en regiones de interés que correspondían a los núcleos de las células que fueron inspeccionadas en un

microscopio invertido provisto de objetivos de inmersión en agua marca Olympus modelo BX41TF. Las imágenes fueron capturadas cada 30 min con una cámara digital monocromática de enfriamiento rápido. La captación de Etd⁺ fue medida en una longitud de onda de 595 nm de emisión.

Entrada de Ca²⁺ al citosol (señal de Ca²⁺ intracelular).

Células HeLa sembradas y mantenidas como se describió en el párrafo anterior fueron pre incubadas por 45 min al indicador de Ca²⁺ libre FURA-2 (2 μM). La entrada del ion calcio se indujo con la exposición a un solución extracelular alcalina (pH 8,5) y se registró la señal de Ca²⁺ libre intracelular (F340 nm/F380 nm) con un microscopio Eclipse Ti Nikon (Japón) cada 3 s durante 15 min.

Determinación de estrés oxidativo.

Se utilizó células HeLa transfectadas con Cx39, Cx43 o Cx45 como también células HeLa sin transfectar (parental, grupo control) sembradas en placas Nunc de 35 cm de diámetro (10⁶ células por placa). Luego de 48 h de crecimiento se incubaron por 1 h en una solución Krebs-Ringer (pH 7,4 ó pH 8,5) o en una solución Krebs-Ringer libre de cationes divalentes (Ca²⁺/Mg²⁺) (pH 7,4 ó pH 8,5). Posteriormente, las células fueron recolectadas con una espátula de goma y en frío de hielo, se lisaron por sonicación, se centrifugó a 3000 r.p.m en un centrífuga de mesón y en el sobrenadante se evaluó el contenido de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) utilizando como estándar una curva de calibración obtenida con malondialdehido (MDA) (Esterbauer et al., 1982). El MDA reacciona con el ácido tiobarbitúrico formando aductos cromogénicos y fluorescentes de MDA-TBA muy estables, que son cuantificables por espectrofotometría de absorción visible, cuya lectura se realizó a 532 nm.

Muerte celular.

La muerte celular se evaluó utilizando el ensayo de tinción con yoduro de propidio. Se utilizaron cultivos de células HeLa transfectadas con Cx39, Cx43 o Cx45 y las HeLa células parentales (grupo control no transfectado), las cuales se incubaron por 3 h en una solución Krebs-Ringer (pH 7,4 ó pH 8,5) o en una solución Krebs-Ringer libre de cationes divalentes ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) (pH 7,4 ó pH 8,5) a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Luego de las 3 h se incubaron por 5 minutos con $5 \mu\text{M}$ yoduro de propidio. En un microscopio Olympus modelo BX41TF equipado con iluminación de epifluorescencia (595 nm de emisión) se fotografió al menos en los que se cuantificó el número de células totales y las teñidas con yoduro de propidio.

Músculo denervado de ratón.

Se utilizaron ratones machos C57Bl/6, silvestres y mutantes (con músculos deficientes en Cx43 y Cx45), los cuales se anestesiaron con una mezcla de 3:1 de ketamina (10%): xylazina (2%) (1,3 ml/kg cada uno). A un grupo de ratones se le extirpó una porción (1 cm) del nervio ciático izquierdo (Delbono, 1992) y posteriormente, se suturó la región expuesta. El músculo derecho permaneció inervado como control contralateral. Un grupo de ratones no denervados se utilizó como control. Posteriormente, todos los ratones se mantuvieron por 7 días con agua y comida *ad libitum* (Cea et al., 2013). Al cabo de este período de tiempo, todos los ratones se sacrificaron por decapitación bajo anestesia y se les extrajo los músculos *gastronecmios*. Las muestras de 25 mg de tejido muscular denervado o inervado fueron homogeneizadas con 500 μL de PBS (1x). Luego se agregó en un tubo ependorf 100 μL de muestra homogeneizada más TBA (0,8% p/v), ácido acético (20% v/v) y SDS (8% p/v). Después estas muestras se calentaron a 100°C por 1h y luego se dejaron enfriar y se centrifugaron a 3000 rpm por 45 min. En el sobrenadante se evaluó el contenido de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) utilizando como estándar una curva de calibración obtenida con malondialdehído (MDA) (Esterbauer et al., 1982). La cuantificación se realizó por espectrofotometría de absorción visible a 532 nm.

Ensayos del efecto de antioxidantes sobre la actividad de los HCs-Cx43.

Se utilizó células HeLa transfectadas con Cx43 sembradas sobre placas Nunc de 90 cm de diámetro que contenían cubreobjetos de vidrio de 25 mm de diámetro. Luego de 48 h de crecimiento y con una confluencia del 70%, se evaluó la captación de Etd⁺ en las células crecidas sobre los cubreobjetos de vidrio.

Las células se incubaron 5 min en una solución Krebs-Ringer (pH 7,4) que contenía 5 μM Etd⁺. Posteriormente, la solución extracelular se reemplazo por solución Krebs-Ringer (pH 7,4) sin cationes divalentes (0 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) con 5 μM Etd⁺ y se evaluó la captación del colorante. La fluorescencia fue registrada en regiones de interés que correspondían a los núcleos de 5 células por cada experimento, las que fueron inspeccionadas en un microscopio invertido marca Nikon modelo Eclipse TI, provisto de objetivos de inmersión en agua. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital monocromática de enfriamiento rápido cada 30 s (tiempo de exposición = 30 ms, ganancia = 0,5). Luego de 10 min de registro, fueron agregados por separado los antioxidantes Tempol (500 μM), Resveratrol (200 μM) o NAC (5 mM).

Análisis de imágenes.

Para el análisis de las imágenes se utilizó el software ImageJ 1.64r de cuantificación de fluorescencia (Bethesda, MD / Meriland, EE.UU.) y para realizar los gráficos y análisis estadísticos se usó el software GraphPad Prism 5 (San Diego, California, EE.UU.).

RESULTADOS

Objetivo específico 1.

1. El medio alcalino (pH 8,5) activa los hemicanales formados por las conexinas musculares (Cx39, Cx43 y Cx45).

En las células HeLa transfectadas con el cDNA que codifica para la conexina39, conexina43 o conexina45 (HeLa-Cx39, HeLa-Cx43 y HeLa-Cx45, respectivamente) se determinó la expresión de cada Cx mediante ensayos de inmunofluorescencia (dato no mostrado). Las células fueron incubadas con una solución salina que contiene cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) y un pH alcalino (pH 8,5), que aumentó la captación de Etd^+ 3,9 veces sobre el nivel basal en las HeLa-Cx39. Además, las células HeLa-Cx39 fueron incubadas a pH 7,4 en una solución libre de cationes divalentes (DCFS), la cual aumentó 4,29 veces la captación de Etd^+ sobre el nivel basal. A su vez, las células incubadas a pH 8,5 en ausencia de cationes divalentes la captación de Etd^+ aumentó 4,6 veces sobre el nivel basal. En las células HeLa-Cx43 incubadas a pH 8,5 con cationes divalentes en la solución extracelular la captación de Etd^+ aumentó 2,6 veces sobre el nivel basal, y en las células incubadas en solución extracelular con pH 7,4 y sin cationes divalentes la captación de Etd^+ aumentó 3,1 veces sobre el basal, mientras que en las células incubadas a pH 8,5 sin cationes divalentes la captación de Etd^+ aumentó 3,2 veces sobre el basal. Por otro lado, las células HeLa-Cx45 incubadas a pH 8,5 con cationes divalentes mostraron un aumento de captación de Etd^+ igual a 2,6 veces sobre el basal, y en las células incubadas a pH 7,4 sin cationes divalentes la captación de Etd^+ aumentó 2,5 veces sobre el basal y en las incubadas a pH 8,5 sin cationes divalentes aumentó 3,0 veces sobre el basal (Fig. 1).

La captación de Etd^+ observada en las células incubadas a pH 8,5 en presencia de cationes divalentes, fue parcialmente bloqueada con carbenoxolona (Cbx, 200 μM). En células HeLa-Cx39 la captación de Etd^+ disminuyó 2,1 veces, mientras que en células HeLa-Cx43 disminuyó 1,5 veces y en células HeLa-Cx45 disminuyó 1,9 (Fig. 1).

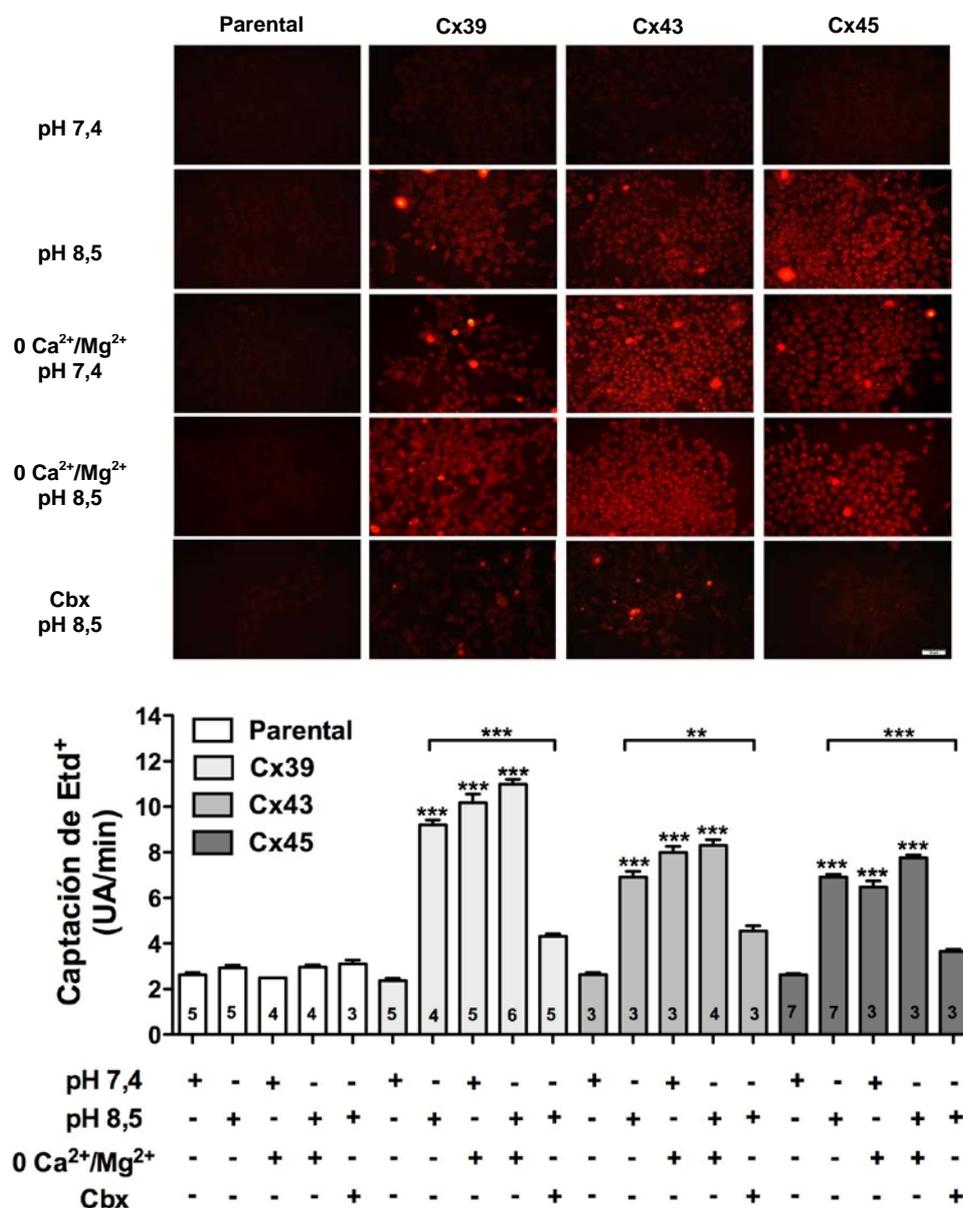


Figura 1. La alcalinización extracelular aumenta la captación de Etd⁺ en células transfectadas con Cxs 39, 43 o 45. Se utilizó células HeLa parentales o transfectadas con Cx30, Cx43 o Cx45 (HeLa-Cx39, HeLa-Cx43 ó HeLa-Cx45). Después de 30 min de incubación a pH 8,5 en ausencia (-) o en presencia (+) de cationes divalentes (0 Ca²⁺/Mg²⁺), la captación de Etd⁺ aumentó en las tres transfectantes evaluadas, lo que se previno con carbenoxolona (Cbx, 200 μ M), un bloqueador de HCs y no aumento en células parentales (Parental). Los dígitos en el interior de las barras indican el número de réplicas. *** P <0,05, prueba de Kruskal-Wallis con un post-test.

Objetivo específico 2. Entrada de Ca^{2+} al citosol.

2. Entrada de Ca^{2+} en células HeLa transfectadas con HCs formados por las Cxs 39, 43 ó 45.

Luego de exponer las células a una solución salina alcalina (pH 8,5) con cationes divalentes ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) se evaluó la señal de Ca^{2+} intracelular. Se observó un aumento significativo en la señal de Ca^{2+} en las células HeLa transfectadas con la Cx43 (~5,2 veces respecto al basal) o la Cx45 (~3,4 veces respecto al basal). Sin embargo, no se observó un aumento significativo en la señal de Ca^{2+} en las células HeLa transfectadas con la Cx39, cuyo comportamiento fue similar al de las células HeLa parentales (Fig. 2B y C).

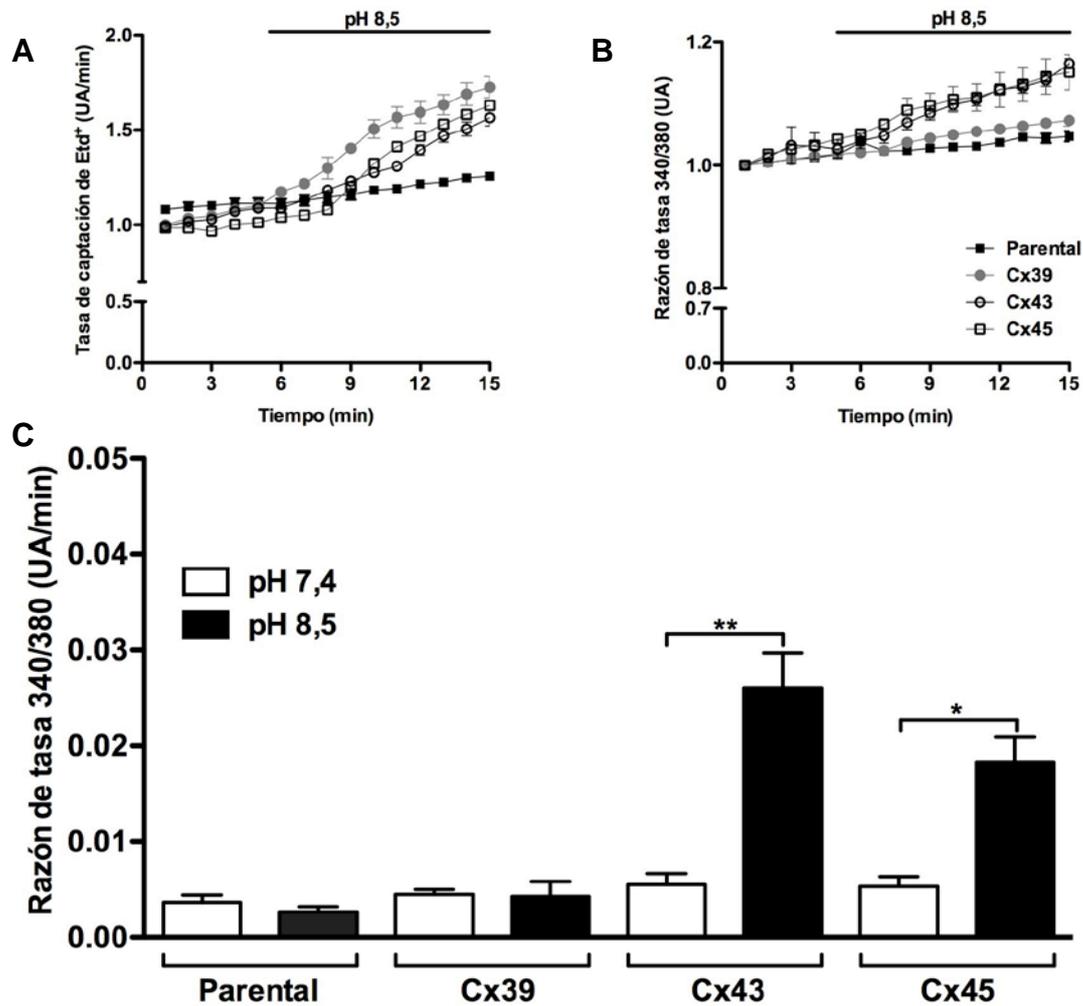


Figura 2. La alcalinización extracelular no aumenta la señal de Ca²⁺ intracelular en células HeLa-Cx39. Se utilizó células HeLa parentales o transfectadas con Cx30, Cx43 o Cx45 (HeLa-Cx39, HeLa-Cx43 ó HeLa-Cx45). A) Curva de captación de etidio (Etd⁺) en células Hela-Cx39, HeLa-Cx43, HeLa-Cx45 y parentales (sin transfectar). B) En células Hela-Cx43 y HeLa-Cx45, pero no en las células HeLa-Cx39, la exposición extracelular a medio alcalino (pH= 8,5) aumentó significativamente la señal de Ca²⁺ (razón 340/380 nm) después de 3 min de exposición. C) La señal de Ca²⁺ intracelular se evaluó luego de 15 min de exposición al medio alcalino y esta fue significativamente más alta en las células HeLa-Cx43 y Hela-Cx45, pero no en células HeLa-Cx39 (n = 3). ** P <0,05, prueba de Kruskal-Wallis con un post-test.

Objetivo específico 3. Participación de los HCs-Cxs en el estrés oxidativo inducido por pH extracelular alcalino.

3. La activación de hemicanales formados por las Cxs 43 ó 45 aumenta el estrés oxidativo en células.

El aumento de la concentración de Ca^{2+} libre intracelular ha sido asociado con un aumento en el estado oxidativo de células (Powers *et al.*, 2010). Por lo tanto, se decidió evaluar si en las células HeLa-Cx43 ó HeLa-Cx45, que mostraron un aumento en la señal de Ca^{2+} al ser expuestas a pH alcalino (pH 8,5), aumentan los niveles de TBARS. Los niveles de TBARS determinados en las células HeLa-Cx43 aumentaron de 0,53 ($\mu\text{M}/10^6$ células), en solución salina con cationes divalentes ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) y pH 7,4, a 15,10 ($\mu\text{M}/10^6$ células) en solución salina con cationes divalentes ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) y pH 8,5. Del mismo modo, en las HeLa-Cx45 los niveles de TBARS aumentaron de 0,98 ($\mu\text{M}/10^6$ células) en la solución salina con cationes divalentes ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) y pH 7,4, a 14,90 ($\mu\text{M}/10^6$ células) en el solución extracelular alcalina (pH 8,5) con cationes divalentes. Este efecto no fue observado en las células incubadas en solución salina con pH 8,5 y libre de cationes divalentes (0 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) y en las células incubadas en solución salina con cationes divalentes y pH 8,5 que además contenía 200 μM carbenoxolona (Cbx), un bloqueador de HCs. Las células HeLa-Cx39 incubadas en las diferentes condiciones no presentaron diferencias significativas en relación al grupo control (células HeLa parentales) (Fig.3).

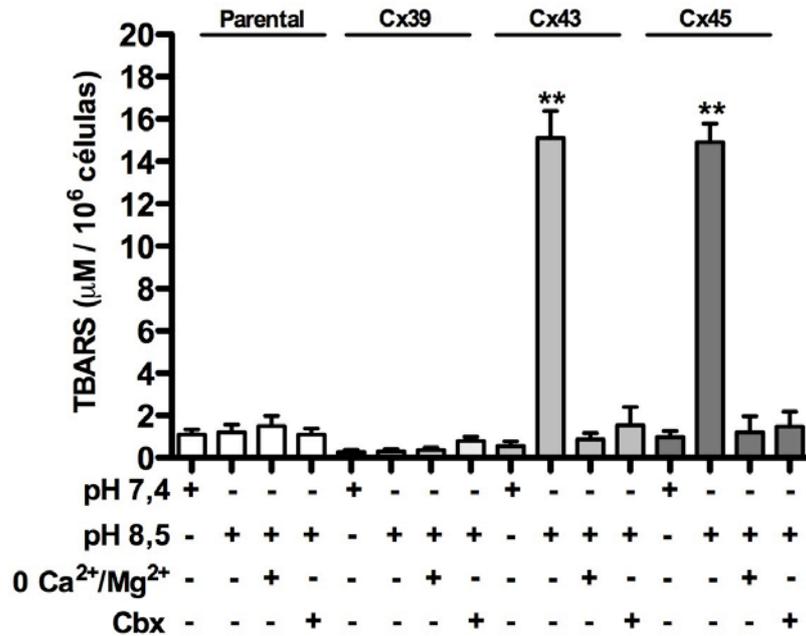


Figura 3. El pH alcalino aumenta los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en cultivos de células HeLa-Cx43 ó HeLa-Cx45. Las células HeLa-Cx43 ó HeLa-Cx45, incubadas por 1 h a una solución alcalina (pH 8,5) con cationes divalentes (0 Ca²⁺/Mg²⁺), mostraron un incremento en las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, lo que fue prevenido por 200 µM carbenoxolona (Cbx). Las células HeLa-Cx39 no presentaron diferencias significativas luego de ser tratadas con las diferentes condiciones en relación a las células parentales (Parental) (n = 3). ** P <0,05, prueba de Mann Whitney.

Objetivo específico 4. Participación de la apertura de los HCs en la muerte celular inducida por alcalinización extracelular.

4.- La apertura de los HCs formados por las Cxs 43 ó 45 favorecen la muerte de células expuestas a una solución salina alcalina que contiene cationes divalentes.

Es sabido que el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular libre y el estrés oxidativo inducen muerte celular (Decrock et al., 2009; Powers et al., 2010). Por tal motivo se evaluó la muerte de células, mediante la tinción con yoduro de propidio en células incubadas por 3 h en una solución salina alcalina (pH 8,5) (ver Métodos) o fisiológica (pH 7,4), en ausencia o presencia de cationes divalentes. Al término del experimento el 98,9% de las células HeLa-Cx43 incorporó propidio y fueron contabilizadas como muertas. El mismo tratamiento indujo un 52,1% de mortalidad en las células HeLa-Cx45 (Fig. 4). En cambio, las células HeLa-Cx39 solo presentaron un 7,9% de mortalidad y las células HeLa parentales presentaron solo un 1,40% de mortalidad (Fig. 4).

Por otro lado, las células que expuestas a soluciones salinas libres de cationes divalentes ($0 \text{ Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) y pH 7,4 ó pH 8,5 no mostraron un aumento significativo en el porcentaje de mortalidad (Fig. 4). Las células HeLa-Cx39 presentaron un 10,9% de mortalidad (Fig. 4). Las células HeLa-Cx43 presentaron solo un 1,6% de mortalidad y las células HeLa-Cx45 mostraron una mortalidad de solo un 0,8% (Fig. 4).

En células transfectadas con Cxs y expuestas a solución salina alcalina (pH 8,5) la presencia de Cbx (200 μM) previno un aumento significativo en la mortalidad, alcanzando un 1,6% en las células HeLa-Cx39, un 1,7% en las células HeLa-Cx43 y un 1,4% en las células HeLa-Cx45 (Fig. 4).

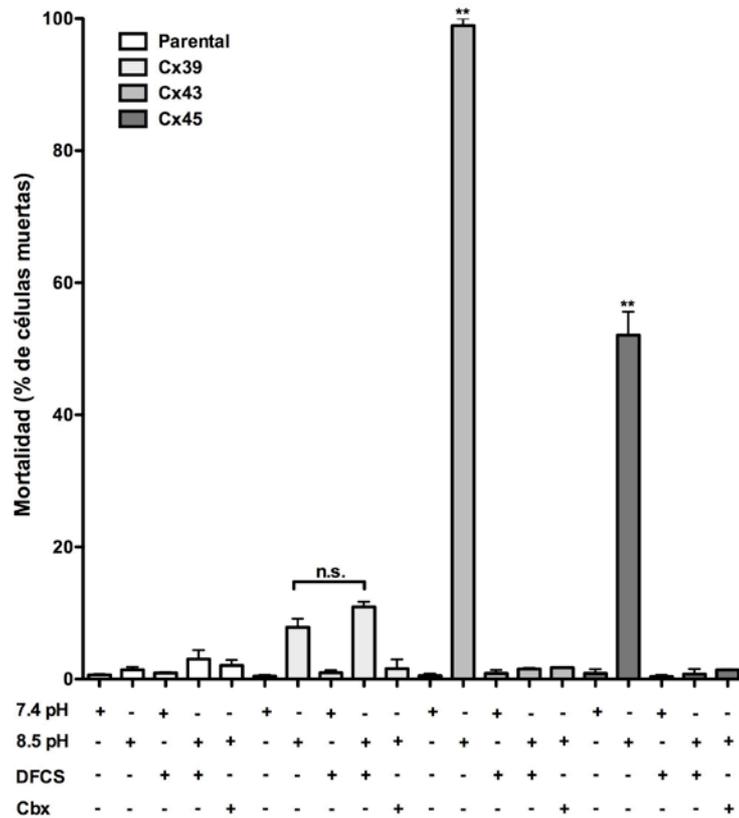
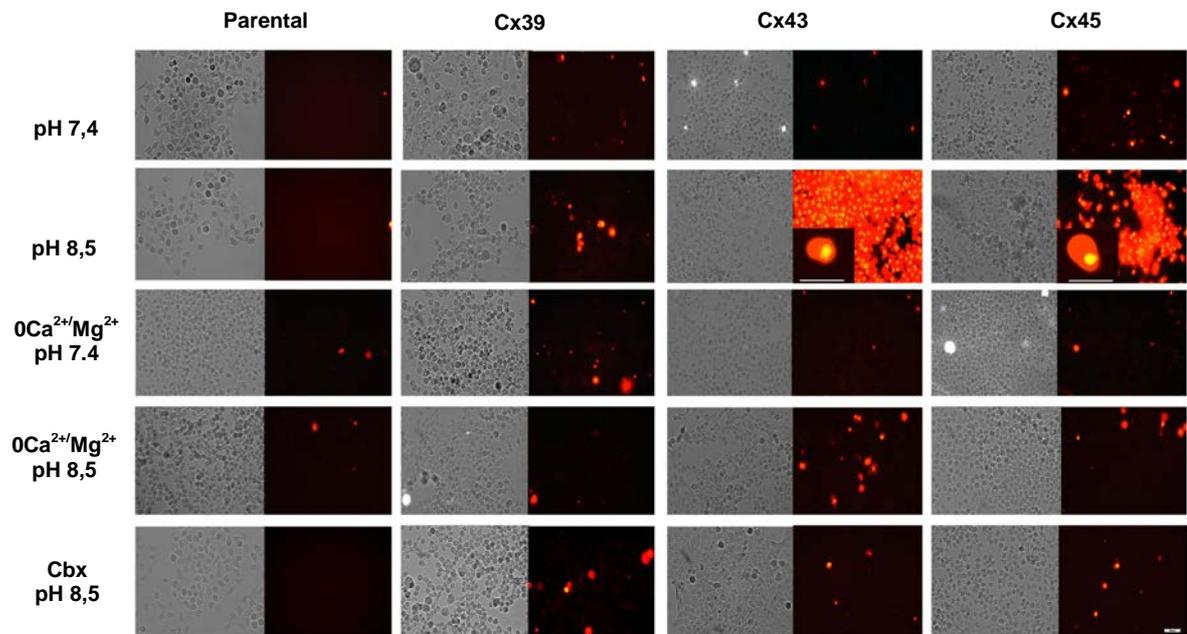


Figura 4. La alcalinización extracelular induce muerte en las células HeLa-Cx43 y HeLa-Cx45, pero no en las células HeLa-Cx39. Las células HeLa-Cx43 y Cx45 mostraron un aumento importante en la mortalidad (%) sólo al ser incubadas por 3 h en la solución salina que contenía Ca²⁺, mientras que en las células HeLa-parental o HeLa-Cx39 no lo se afectó significativamente (n = 3). ** P <0,05, prueba de Mann Whitney.

Objetivo específico 5. La denervación aumenta el estrés oxidativo en músculos esqueléticos.

5. El aumento de la actividad de los HCs-Cxs en músculos esqueléticos de ratones denervados aumenta la generación ERO.

Es sabido que la denervación aumenta la generación de ERO en los músculos esqueléticos (Abruzzo et al., 2010) y recientemente se demostró que la denervación induce la expresión *de novo* de las Cxs 39, 43 y 45 en músculos EDL denervados y que los HCs formados por Cxs 43 y 45 favorecen el desarrollo de la atrofia muscular, posiblemente porque permiten la entrada de Ca^{2+} (Cea et al., 2013). Por esto se evaluó si los TBARS aumentan en los músculos *gastronecmio* de ratones silvestres y ratones con músculos deficientes en la expresión de Cx43 y Cx45 denervados.

Los niveles de TBARS de músculos denervados de ratones mutantes (deficientes de Cx43 y Cx45) fue de 65,1 $\mu\text{M/g}$, cuyo valor fue menor que el de músculos no denervados de ratones silvestres (81,8 $\mu\text{M/g}$). Los niveles de TBARS del músculo denervados y deficientes en Cx43 y Cx45 fueron de 42,1 $\mu\text{M/g}$, cuyo valor también fue menor que el de músculos de ratones silvestres denervados (70,8 $\mu\text{M/g}$) (Fig. 6).

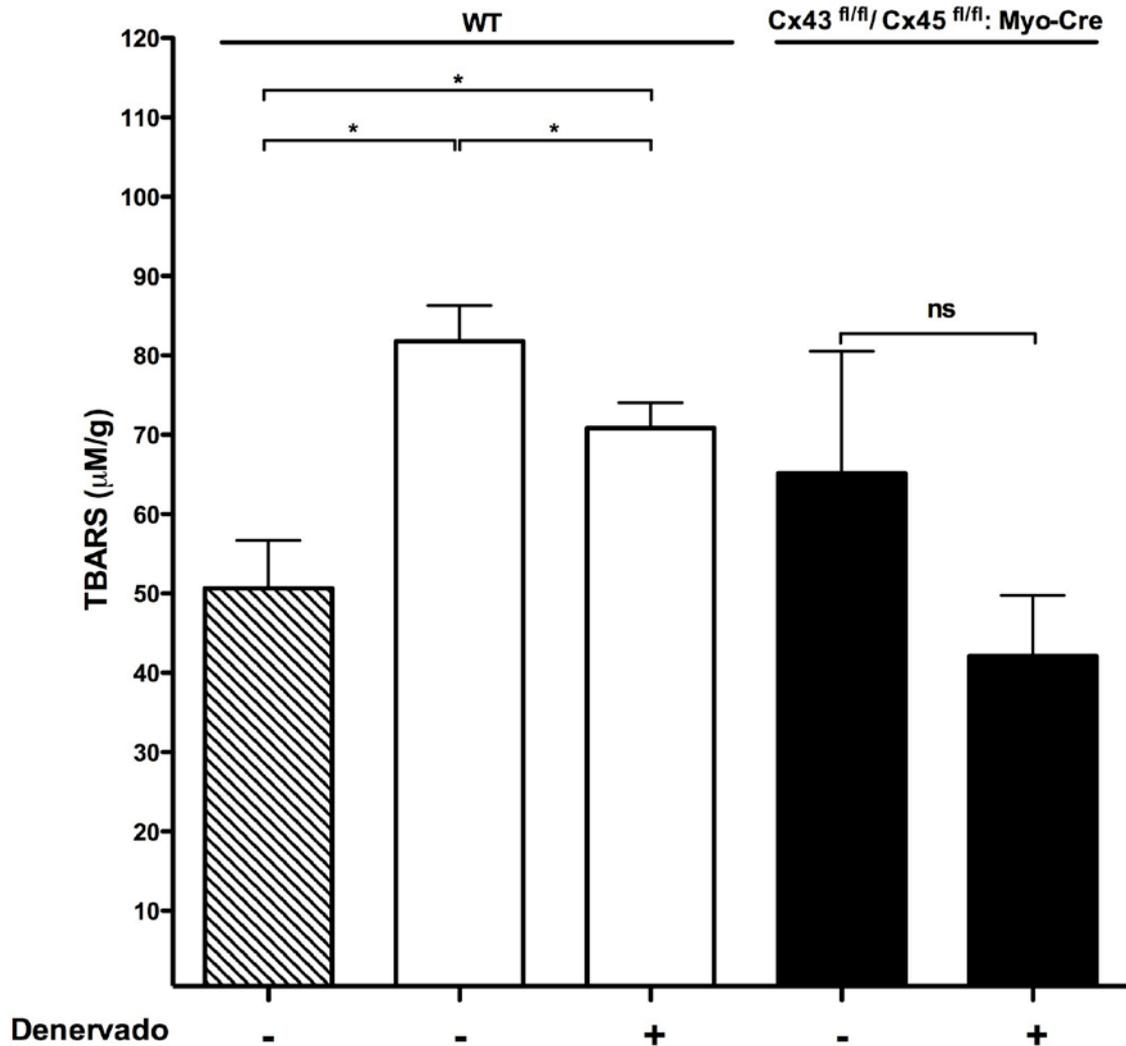


Figura 6. La ausencia de Cx43 y Cx45 impide el aumento de los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en músculos esqueléticos murinos denervados. Siete días post-denervación se aislaron los músculos *gastrocnemius*, de los ratones deficientes en Cx43 y Cx45, y se compararon los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de músculos inervados contralaterales (-) de músculos denervados (+) frente a los músculos inervados de ratones controles (barra achurada) (n=3). * P <0,05, prueba de Mann-Whitney U.

Objetivo específico 6. Algunos antioxidantes bloquean los HCs-Cx43.

6. Acción bloqueadora de HCs-Cx43 de ciertos antioxidantes.

Es sabido que algunos antioxidantes previenen la atrofia muscular inducida por denervación, pero no siempre ha sido asociado a una disminución de las ERO, lo que sugiere la participación de un mecanismo de acción desconocido (Servais et al., 2007). Por esto, se evaluó la posible acción bloqueadora de tres antioxidantes sobre la actividad de los HCs-Cx43. En estos estudios se observó que la captación de Etd⁺ de células HeLa-Cx43 inducida por la exposición a una solución salina libre de cationes divalentes se reduce 4,8 veces con carbenoxolona (Cbx, 200 μ M; control positivo); 3,6 veces con Tempol (500 μ M) y 3,3 veces con Resveratrol (200 μ M). Sin embargo, NAC solo disminuyó 1,4 veces la captación de Etd⁺ (Fig. 7).

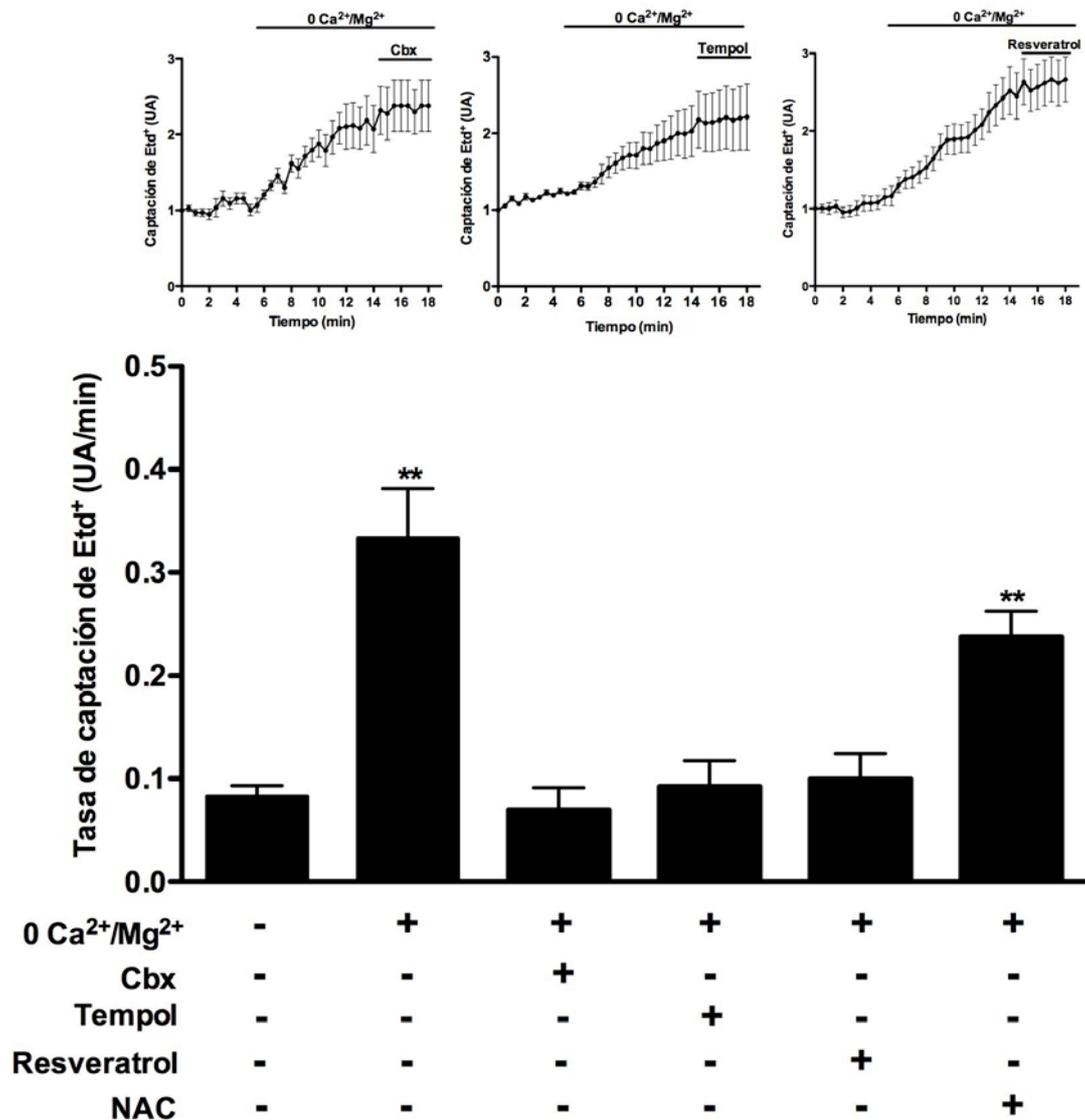


Figura 7. Los antioxidantes Tempol y Resveratrol bloquean los HCs-Cx43. En células HeLa transfectadas con Cx43, 10 min de pre-incubación en un medio salino libre de cationes divalentes aumentó la captación de etidio (Etd⁺), efecto que fue bloqueado con Tempol (500 μ M) o Resveratrol (200 μ M). Sin embargo, la preincubación con más alta de N-acetil cisteína (NAC) (5 mM) no redujo significativamente la captación de Etd⁺ (n=3). ** P <0,05, prueba de Mann-Whitney U.

DISCUSIÓN

En esta Tesis, se demostró que la activación de HCs formados por Cx43 o Cx45 se relaciona con el aumento del ingreso de Ca^{2+} a las células, lo que lleva a un aumento en el estrés oxidativo y la posterior muerte celular. Por el contrario, las células que expresan HCs no permeables o muy poco permeables a Ca^{2+} , como es el caso de los HCs-Cx39, no presentan cambios significativos en el estrés oxidativo ni en la mortalidad celular similar a las células que no expresan Cxs. Además, la ausencia de HCs formados por Cx43 y Cx45 en músculos de ratón sometidos a denervación, previene el aumento del estrés oxidativo, lo cual reduciría el ingreso de Ca^{2+} en las fibras musculares denervadas. Por otra parte, antioxidantes como el Tempol y Resveratrol disminuyen la entrada de Etd^+ en las células HeLa-Cx43 expuestas a solución libres de cationes divalentes, lo que sugiere nuevo mecanismo de acción de estos compuestos, y abre un nuevo foco de investigación, además de ofrecer una posible explicación del efecto protector de algunos antioxidantes sobre la atrofia muscular inducida por la denervación.

Activación de los HCs formados por Cx39 o Cx45 por alcalinización extracelular.

La exposición a una solución salina extracelular con pH 8,5 aumentó rápidamente la tasa de captación de Etd^+ en células que expresan HCs formados por Cx39 ó 45, similar a lo previamente descrito para los HCs-Cx43 (Schalper et al., 2010).

Se ha demostrado, mediante estudios con inmunofluorescencia confocal, que la captación de Etd^+ en HeLa-Cx43, inducido por el pH alcalino, no se debe a un aumento en los niveles de HCs en la membrana celular. Siendo probable que el pH alcalino active un mecanismo de compuerta que lleva a la apertura de los HCs (Schalper et al., 2010). Según Harris (2001) en algunas Cxs, la sensibilidad química al pH puede implicar interacciones entre las regiones del dominio COOH-terminal y el asa citoplásmica, ya que el truncamiento del dominio COOH-terminal elimina la sensibilidad al pH ácido que cierra los HCs, y la presencia del COOH-terminal de la Cx restaura la

sensibilidad al pH. Por otro lado, Schalper y col. (2010) postulan que el dominio COOH-terminal de la Cx43 no se requiere para la activación de los HCs inducida por alcalinización, debido a que el aumento en la captación de Etd⁺ fue más pronunciado en las células que expresan la Cx43 truncada (Cx43Δ257) en comparación con las células que expresan la Cx43 silvestre. De este modo la regulación por pH ácido o pH alcalino parece obedecer a mecanismos diferentes.

Entre otros estímulos que promueven la apertura de los HCs-Cxs se encuentran los cambios de potenciales de membrana. Es así como se ha demostrado que los HCs de las células cultivadas en condiciones de reposo, presentan una baja probabilidad de apertura cuando la membrana celular es expuesta a potenciales negativos y la probabilidad de apertura se incrementa a potenciales positivos (Sáez et al., 2010). Por otro lado, el aumento de la concentración de Ca²⁺ extracelular reduce la probabilidad de apertura de muchos HCs formados por Cxs. A través de microscopía de fuerza atómica, que el vestíbulo externo del poro de HCs-Cx43 posee un diámetro de 1,8 nm bajo condiciones control y que, la eliminación del Ca²⁺ extracelular aumenta el diámetro del vestíbulo exterior del poro del HC a 2,5 nm (Thimm et al., 2005). En HCs-Cx32 los iones Ca²⁺ se unen a un anillo 12 Asp en el exterior vestíbulo del poro o hemicanal. Alternativamente, los HCs-Cx37 pueden ser bloqueados directamente por Ca²⁺ extracelular pasando por el poro y llegando a sitios de unión localizados en el lado citoplásmico (Puljung et al., 2004). Sin embargo, el aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular libre a valores de 500 nM aumenta la apertura de los HCs-Cx32 y HCs-Cx43 y concentraciones mayores inducen menor efecto hasta que finalmente inducen el cierre (DeVuys et al., 2006; 2009).

El Mg²⁺, otro catión divalente extracelular, también afecta el estado funcional de los HCs. El aumento de la concentración de Mg²⁺ extracelular desplaza la dependencia de la activación por voltaje, es decir, la apertura ocurre a potenciales más positivas, disminuyendo la conductancia máxima, acelerando desactivación y retardando la activación (Sáez et al., 2010).

En el presente trabajo, el pH alcalino aumentó la apertura de los HCs incluso en presencia de los cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}). Por lo tanto, la alcalinización extracelular en células HeLa-Cx39, -Cx43 y -45 es un método aceptable para evaluar el papel de la apertura de los HCs-Cs en presencia de concentraciones iónicas fisiológicas. La ausencia Ca^{2+} y Mg^{2+} más el pH 8,5 del medio extracelular aumentan aún más la captación de Etd^+ en células HeLa-Cx39, -Cx43 y -45, comparado con solo una de las condiciones, lo que puede ser asociado a un aumento del número de HCs abiertos. En apoyo a esta interpretación se ha visto que el diámetro de un poro externo bajo condiciones fisiológicas de 1,8 mM Ca^{2+} extracelular es de 1,8 nm, que posiblemente corresponde al estado cerrado, y una vez que se extrae el Ca^{2+} del medio extracelular el diámetro de externo del poro aumenta a 2,5 nm (Thimm et al., 2005). Más aun, la probabilidad de apertura de los HCs-Cx43 aumenta considerablemente al reducir la concentración extracelular de Ca^{2+} (Contreras et al., 2003).

Permeabilidad al Ca^{2+} de los HCs formados por Cx39, Cx43 o Cx45.

Luego de inducir la apertura de HCs formados por Cx39, Cx43 ó Cx45, con una solución salina alcalina con cationes divalentes ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$), se observó que la apertura de los HCs-Cx43 y -Cx45 permitieron el ingreso de Ca^{2+} a las células desde el medio externo, lo que se demuestra debido a que las células parentales, que no expresan HCs, no presentaron un aumento significativo ni en la captación de Etd^+ , ni en la señal de Ca^{2+} intracelular. Estos resultados son consistentes con los descritos por Schalper y col. (2010), que previamente demostraron que una solución salina alcalina (pH 8,5) aumenta la captación de Etd^+ y la permeabilidad de la membrana celular al Ca^{2+} , en células HeLa-Cx43. Schalper y col. (2008) además sugirieron que los HCs-Cx45 expresados en células HeLa tratadas con FGF-1 son permeables al Ca^{2+} , lo que implica que más de un mecanismo de apertura de los HCs favorece el ingreso de Ca^{2+} a las células a través de HCs-Cxs.

Es importante mencionar que la apertura de los HCs no es necesariamente una condición para el aumento de la señal de Ca^{2+} intracelular,

ya que las células que expresan HCs-Cx39 a pesar de aumentar su captación de Etd+, no aumentan significativamente su permeabilidad al Ca^{2+} . En el caso de los HCs-Cx39 no se ha descrito nada respecto a su permeabilidad a iones incluyendo el Ca^{2+} , lo cual aporta un nuevo conocimiento sobre este tipo de Cx, que se podría replicar con otros estímulos, como por ejemplo cambios de voltaje ó inhibición metabólica como ha sido demostrado para la Cx32 (Sánchez et al., 2009) y la Cx26 (Sánchez et al., 2010).

Estrés oxidativo y muerte de células HeLa-Cx39, Cx43 ó Cx45 expuestas a pH extracelular alcalino.

En las células HeLa-Cx43 ó HeLa-Cx45 se visualizó la entrada de Ca^{2+} inducida por una solución salina con pH alcalino (pH 8,5) las que mostraron un aumento del estrés oxidativo (aumento de TBARS) y un incremento en la mortalidad celular. Por el contrario, las células HeLa-Cx39, no mostraron un aumento significativo en el estrés oxidativo ni en la muerte de células, lo que se asocia a la ausencia o baja permeabilidad al Ca^{2+} , ya que ha sido demostrado que el aumento del influjo de Ca^{2+} al medio intracelular puede activar distintas vías que aumentan la generación de ERO y ERN, promoviendo la apoptosis celular (Powers et al., 2010). Además ha sido reportado, que la apertura de HC-Cx43 disminuye los niveles de antioxidantes endógenos. Es así como, en una línea celular epitelial renal, LLC-PK1, que no expresa HCs-Cx43, y células transfectadas con el gen de la Cx43, se comprobó que la incubación con 30 μM Cd^{2+} genera apertura de los HCs-Cx43 y posterior a esta apertura se genera un aumento del estrés oxidativo en las células, debido a que disminuyen los niveles intracelulares de glutatión reducido (GSH) y aumentaron los niveles extracelulares de GSH, lo que finalmente se tradujo en muerte celular (Fang et al., 2011). De este modo, sería interesante investigar en el futuro si la apertura de HCs-Cxs en células expuestas a un medio con cationes divalentes, se asocia a la pérdida de los niveles de GSH intracelular y un aumento de los niveles extracelular de este compuesto antioxidante.

Estrés oxidativo en músculo esquelético denervado y el papel de los hemicanales formados por Cx43 o Cx45.

Dentro de esta investigación se observó que los niveles de TBARS en el músculo denervado de ratones mutantes (deficientes de Cx43 y Cx45) fue menor que el de músculos denervados de ratones silvestres, lo que indica que la ausencia de HCs-Cx43 y HCs-Cx45 en las miofibras disminuye considerablemente el estrés oxidativo en músculos esqueléticos. Esto podría explicarse según la información planteada anteriormente, es decir por la ausencia de canales que permiten el ingreso del Ca^{2+} a las células. En apoyo a esta observación, se ha descrito que la ausencia de Cx43 y Cx45 en las miofibrillas de ratones atenúa drásticamente la atrofia inducida por denervación, ya que el área de sección transversal de miofibras es considerablemente menor en músculos denervados de ratones silvestres que en los de ratones con músculos deficientes en Cx43 y Cx45 (Cea et al., 2013).

Es importante mencionar que en los músculos *gastronecmios* denervados y no denervados de los ratones silvestres o mutantes, los niveles de TBARS fueron mayores en los músculos no denervados que en los músculos denervados de los mismos animales, lo que puede deberse a que en el músculo esquelético, la producción de anión radical superóxido mitocondrial es mayor durante el ejercicio muscular intenso cuando la necesidad de ATP es alta y es más bajo durante los períodos de inactividad muscular cuando el requisito de ATP es mínimo (Powers & Jackson 2008). Así, durante los periodos de baja actividad muscular o nula actividad muscular no existente (por ejemplo, inmovilización o denervación), la producción de ERO mitocondrial es baja. Por lo tanto, la contribución mitocondrial por lesión oxidativa mediada por desuso muscular puede ser menor (Powers et al., 2005).

Efecto bloqueador de HCs de los antioxidantes en células HeLa-Cx43.

Respecto al efecto de distintos antioxidantes sobre la apertura de HCs-Cx43, se determinó que la actividad de los HCs se reduce principalmente con Tempol (500 μM) y Resveratrol (200 μM), lo cual es un importante foco de investigación en el futuro, ya que ha sido descrito que el uso de algunos antioxidantes previenen la atrofia muscular, pero no siempre ejerciendo su rol directo como antioxidantes en la disminución de ERO ó ERN, lo que sugiere la participación de un mecanismo de acción desconocido de los antioxidantes en la reducción de la atrofia muscular (Servais et al., 2007). Además, estudios previos sugieren que Tempol y Resveratrol protegen al músculo esquelético de la influencia de ciertas condiciones catabólicas (Halter et al., 2010; Alamdari et al., 2012). Sin embargo, los mecanismos por los que dichos compuestos reducen la pérdida de masa muscular no ha sido aclarada y el efecto bloqueador de HCs-Cxs, demostrado en el presente trabajo, ofrece una posible explicación a los efectos anti-atróficos. Sin lugar a dudas, es importante seguir realizando más experimentos para dilucidar con mayor exactitud en modelos *in vivo* el mecanismo de acción del Tempol y Resveratrol sobre la atrofia muscular.

CONCLUSIONES

- Los HCs-Cx43 o HCs-Cx45, pero no los HCs-Cx39, son permeables a Ca^{2+} , al ser activados con una solución salina alcalina (pH 8,5).
- La apertura de los HCs-Cx43 o HCs-Cx45 inducida por alcalinización favorece la generación de TBARS y la muerte celular.
- La ausencia de HCs-Cx43 y HCs-Cx45 en músculos esqueléticos reduce los niveles de TBARS inducidos por denervación
- Los antioxidantes Tempol y Resveratrol, pero no NAC, son inhibidores de HCs-Cx43.

BIBLIOGRAFÍA

Abruzzo PM, di Tullio S, Marchionni C, Belia S, Fanó G, Zampieri S, Carraro U, Kern H, Sgarbi G, Lenaz G, Marini M. Oxidative stress in the denervated muscle. *Free Radic Res.* 44 (2010) 563-76.

Alamdari N, Aversa Z, Castellero E, Gurav A, Petkova V, Tizio S, Hasselgren PO. Resveratrol prevents dexamethasone-induced expression of the muscle atrophy-related ubiquitin ligases atrogin-1 and MuRF1 in cultured myotubes through a SIRT1-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* 417 (2012) 528-533.

Appell HJ, Duarte JA, Soares JM. Supplementation of vitamin E may attenuate skeletal muscle immobilization atrophy. *Int J Sports Med.* 18 (1997) 157-160.

Araya R, Eckardt D, Maxeiner S, Kruger O, Theis M, Willecke K, Sáez JC. Expression of connexins during differentiation and regeneration of skeletal muscle: functional relevance of connexin43. *J Cell Sci* 118(2005) 27–37

Burns J, Yokota T, Ashikara H, Lean ME, Crozier A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J Agric Food Chem.* 50 (2002) 3337–3340.

Busquets S, Fuster G, Ametller E, Oliván M, Figueras M, Costelli P, Carbo N, Argiles JM, Lopez-Soriano FJ. Resveratrol does not ameliorate muscle wasting in different types of cancer cachexia models, *Clin. Nutr.* 26 (2007) 239–244.

Cea LA, Cisterna BA, Puebla C, Frank M, Figueroa XF, Cardozo C, Willecke K, Latorre R, Sáez JC. *De novo* expression of connexin hemichannels in denervated fast skeletal muscles leads to atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110 (2013) 16229-16234.

Chen KH, Cheng ML, Jung YH, Chiu DTY, Shiao MS, Chen JK, Resveratrol ameliorates metabolic disorders and muscle wasting in streptozotocin-induced diabetic rats, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 301 (2011) E853–E863.

Chi J, Li L, Liu M, Tan J, Tang C, Pan Q, Wang D, Zhang Z. Pathogenic connexin-31 forms constitutively active hemichannels to promote necrotic cell death. *PLoS One.* (2012) 7(2): e32531.

Contreras JE, Sáez JC, Bukauskas FF, Bennett MV. Functioning of cx43 hemichannels demonstrated by single channel properties. *Cell Commun Adhes.* 10 (2003) 245-9.

Decrock E, Vinken M, De Vuyst E, Krysko DV, D'Herde K, Vanhaecke T, Vandenameele P, Rogiers V, Leybaert L. Connexin-related signaling in cell death: to live or let die? *Cell Death Differ.* 16 (2009) 524-536.

Delbono O. Calcium current activation and charge movement in denervated mammalian skeletal muscle fibres. *J Physiol.* 451 (1992) 187-203.

De Vuyst E, Decrock E, Cabooter L, Dubyak GR, Naus CC, Evans WH, Leybaert L. Intracellular calcium changes trigger connexin 32 hemichannel opening. *EMBO J.* 25 (2006) 34-44.

De Vuyst E, Wang N, Decrock E, De Bock M, Vinken M, Van Moorhem M, Lai C, Culot M, Rogiers V, Cecchelli R, Naus CC, Evans WH, Leybaert L. Ca²⁺ regulation of connexin 43 hemichannels in C6 glioma and glial cells. *Cell Calcium.* 46 (2009) 176-187.

Esterbauer H, Cheeseman KH, Dianzani MU, Poli G, Slater TF. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes. *Biochem J.* 208 (1982) 129-140.

Fang X, Huang T, Zhu Y, Yan Q, Chi Y, Jiang JX, Wang P, Matsue H, Kitamura M, Yao J. Connexin43 hemichannels contribute to cadmium-induced oxidative stress and cell injury. *Antioxid Redox Signal.* 14 (2011) :2427-2439.

Halter B, Gonzalez de Aguilar JL, Rene F, Petri S, Fricker B, Echaniz-Laguna A, Dupuis L, Larmet Y, Loeffler JP. Oxidative stress in skeletal muscle stimulates early expression of Rad in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med.* 48 (2010) 915-923.

Harris A. L. Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. *Q. Rev. Biophys.* 34 (2001) 325–472.

Hori YS, Kuno A, Hosoda R, Tanno M, Miura T, Shimamoto K, Horio Y, Resveratrol ameliorates muscular pathology in the dystrophic mdx mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy, *J. Pharm. Exp. Ther.* 338 (2011) 784–794.

Kang J, Kang N, Lovatt D, Torres A, Zhao Z, Lin J, Nedergaard M. Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J Neurosci.* 28 (2008). 4702-471.

Li H, Liu TF, Lazrak A, Peracchia C, Goldberg GS, Lampe PD, Johnson RG. Properties and regulation of gap junctional hemichannels in the plasma membranes of cultured cells. *J Cell Biol.* 134 (1996) 1019-1030.

Powers SK, Duarte J, Kavazis AN, Talbert EE. Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation. *Exp Physiol.* 95 (2010) 1-9.

Powers SK, Kavazis AN, DeRuisseau KC. Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 288 (2005) 337-344.

Powers SK and Jackson JM. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production *Physiol Rev.* 88 (2008) 1243–1276.

Puljung MC, Berthoud VM, Beyer EC, Hanck DA. Polyvalent cations constitute the voltage gating particle in human connexin37 hemichannels, *J. Gen. Physiol.* 124 (2004) 587–603.

Retamal MA, Schalper KA, Shoji KF, Bennett MV, Sáez JC. Opening of connexin 43 hemichannels is increased by lowering intracellular redox potential. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104 (2007) 8322-8327.

Sáez JC, Kessler JA, Bennett MV, Spray DC. Superoxide dismutase protects cultured neurons against death by starvation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84 (1987) 3056-3059.

Sáez JC, Schalper KA, Retamal MA, Orellana JA, Shoji KF, Bennett MV. Cell membrane permeabilization via connexin hemichannels in living and dying cells. *Exp Cell Res.*316 (2010) 2377-2389.

Sánchez HA, Mese G, Srinivas M, White TW, Verselis VK. Differentially altered Ca^{2+} regulation and Ca^{2+} permeability in Cx26 hemichannels formed by the A40V and G45E mutations that cause keratitis ichthyosis deafness syndrome. *J Gen Physiol.*136 (2010) 47-62.

Sánchez HA, Orellana JA, Verselis VK, Sáez JC. Metabolic inhibition increases activity of connexin-32 hemichannels permeable to Ca^{2+} in transfected HeLa cells. *Am J Physiol.* 297(2009) C665-C678.

Schalper KA, Palacios-Prado N, Retamal MA, Shoji KF, Martínez AD, Sáez JC. Connexin hemichannel composition determines the FGF-1-induced membrane permeability and free $[Ca^{2+}]_i$ responses. *Mol Biol Cell.* 19 (2008) 3501-3513.

Schalper KA, Sánchez HA, Lee SC, Altenberg GA, Nathanson MH, Sáez JC. Connexin 43 hemichannels mediate the Ca^{2+} influx induced by extracellular alkalinization. *Am J Physiol Cell Physiol.* 299 (2010) C1504-C1515.

Servais S, Letexier D, Favier R, Duchamp C, Desplanches D. Prevention of unloading-induced atrophy by vitamin E supplementation: links between oxidative stress and soleus muscle proteolysis? *Free Radic Biol Med.* 42 (2007) 627-635.

Shadfar S, Couch ME, McKinney KA, Weinstein LJ, Yin X, Rodriguez JE, Guttridge DC, Willis M. Oral resveratrol therapy inhibits cancer-induced skeletal muscle and cardiac atrophy in vivo, *Nutr. Cancer* 63 (2011) 749–762.

Sohl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res.*62 (2004) 228–232.

Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. The world of resveratrol. *Adv Exp Med Biol.* 492 (2001) 159–182.

Thimm J, Mechler A, Lin H, Rhee S, Lal R. Calcium-dependent open/closed conformations and interfacial energy maps of reconstituted hemichannels, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 10646–10654.

Trovato-Salinaro A, Belluardo N, Frinchi M, von Maltzahn J, Willecke K, Condorelli DF, Mudò G. Regulation of connexin gene expression during skeletal muscle regeneration in the adult rat. *Am J Physiol Cell Physiol.* 296 (2009) 593-606.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39 (2007) 44-84.

von Maltzahn J, Wulf V, Willecke K. Spatiotemporal expression of connexin 39 and -43 during myoblast differentiation in cultured cells and in the mouse embryo. *Cell Commun Adhes* 13(2006) 55-60.

ANEXOS

Participación en congreso internacional:

VIII International Congress, Society for Free Radical Biology and Medicine, South American Group. Buenos Aires. Argentina. Octubre 2013.

Activation of connexin 43- or 45-based hemichannels allows the increase of intracellular Ca^{2+} inducing ROS production and cell death

¹Urrutia C., ^{1,2}Cea LA., ^{1,2}Sáez JC.

¹Departamento de Fisiología, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago Chile.

²Centro Interdisciplinario de Neurociencias de Valparaíso, Valparaíso, Chile.

Connexin (Cx) proteins form hemichannels (HCs) at the cell membrane, communicating the intra- and extra-cellular medium, allowing transfer of ions and small molecules. Here, we evaluated the involvement of HCs formed by Cx39, Cx43 or Cx45, in Ca^{2+} influx, ROS generation and cell death. HeLa cells not transfected (parental) or stably transfected with Cx39, Cx43 or Cx45 were incubated in Krebs's solution (pH 7.4 or 8.5) with or without divalent cations or carbenoxolone (a HCs-blocker). We evaluated the activity of Cx HCs (ethidium uptake), Ca^{2+} influx (FURA-2), ROS generation (TBARS) and cell death (propidium iodide staining). The extracellular *alkalinization* (pH 8.5, 30 minutes) induced opening of all HC types, and increased the intracellular Ca^{2+} concentration, only in HeLa cells transfected with Cx43 or Cx45, which was correlated with ROS generation and cell death (~3 hours later). In addition, the absence of extracellular Ca^{2+} or inhibition of Cx HC prevented cell death. Therefore, we propose that cell death induced by alkalization is favored by opening of HCs permeable to Ca^{2+} . Furthermore, the intracellular Ca^{2+} overload would be direct mediator of ROS generation and cell death.

Participación en congreso nacional:

LV Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile XXVII. Reunión Anual Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas. Puerto Varas. Chile. Noviembre 2012.

La activación de hemicanales formados por conexinas aumentan la generación de ERO y promueven la muerte celular.

Urrutia C., Cea LA., Hernández R., Velarde V., Sáez JC. Departamento de Fisiología. Pontificia Universidad Católica de Chile. cbiomar@gmail.com

Las conexinas (Cxs) son proteínas integrales de membrana, que forman hemicanales (HCs), los que comunican el medio intra y extracelular, al permitir el paso de iones y moléculas pequeñas. En el presente trabajo se estudió si la activación de los HCs formados por las Cxs (HCs Cxs) 43 ó 45 induce la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la muerte celular. Se utilizaron células HeLa transfectadas con Cx43 ó Cx45, y células HeLa no transfectadas (parentales, grupo control), incubadas en medio extracelular a pH 7,4 ó pH 8,5, en ausencia o presencia de cationes divalentes ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) o de La^{3+} , como bloqueador de HCs Cxs. Se analizó la actividad de HCs Cxs (captación de etidio), el contenido de malondialdehído (TBARS) como indicador de estrés oxidativo y la muerte celular (tinción con yoduro de propidio). Los resultados indican que los HCs Cxs son activados por la alcalinización, lo que aumenta las ERO e induce muerte celular, que es evitada por la ausencia de cationes divalentes extracelulares. Por lo tanto, la apertura de los HCs Cxs favorece el ingreso de cationes divalentes y precede la generación de ERO y muerte celular.

Participación en publicaciones:

Cea LA, Riquelme MA, Vargas AA, Urrutia C, Saez JC. Pannexin 1 channels in skeletal muscles. Hypothesis & Theory Front. Physiol. (2014).00139.

Publicaciones en preparación:

Urrutia C, Cea LA, Saez JC. "Opening by hemichannels by alkalination leads to the generation of ROS and cell death"

Urrutia C, Cea LA, Saez JC. "Connexin 43 hemichannels are blocked by Tempol and resveratrol but not by N-acetyl cystein". Urrutia C, Cea LA, Saez JC.