



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Unidad Zacatenco

Departamento de Bioquímica

***Pirfenidona modula el acople excitación - contracción
en miocitos ventriculares de rata adulta.***

Tesis que presenta

I. F. Adrián Monsalvo Villegas

Para obtener el grado de

Maestro en ciencias

En la especialidad de

Bioquímica

Director de tesis

Dr. Guillermo Ávila Flores

México, D.F

Septiembre del 2015

*Dedicado a mi queridísima madre,
abue, hermano y esposa*

Agradecimientos

Agradezco a mi madre porque sin ella, no hubiera llegado hasta este punto, por haber hecho hasta lo imposible por sacarme adelante durante todo este tiempo y ayudarme a madurar con todos sus consejos; a mi abue por toda su ayuda y por todo el amor que me brindó en mi infancia y en todos estos años; a mi hermano, por ayudarme a conllevar los días difíciles de nuestras vidas; a mi esposa, por apoyarme en todo momento e impulsarme a concluir este ciclo.

Doy gracias al Dr. Ávila, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por todo su apoyo proporcionado a lo largo del proyecto, tanto en la parte experimental como teórica y por tener siempre un espacio en su agenda para atenderme pacientemente.

Doy gracias a mis asesores por darle seguimiento a mi proyecto, por el tiempo brindado y por sus sugerencias que me permitieron afinar los detalles de todo el trabajo.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio por tantos momentos de alegría. A Erick, por recordarme lo importante que es la familia y por ser un ejemplo a seguir, al igual que por enseñarme *más de una vez* todo lo relacionado al cultivo celular y análisis de datos; a Juan, por enseñarme la importancia de ahorrar y por todas las sugerencias dadas a lo largo del proyecto que me fueron de gran ayuda; a Guadalupe, por compartir su librería digital desinteresadamente; a Maricela por todas las galletas compartidas y por demostrar que con paciencia y perseverancia se puede llegar lejos.

A mis compañeros de generación por ayudarme a comprender que el forjar una auténtica amistad requiere del desinterés de ambas partes, también por enseñarme que es en los momentos difíciles que uno conoce la verdadera personalidad de las personas.

Doy gracias a las secretarias por todo su apoyo brindado a lo largo de la maestría, pero en especial a Angélica por tantas risas compartidas y por nunca descuidar las requisiciones del laboratorio y a Priscila por todo su apoyo y orientación en el área de documentación.

Finalmente, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) y al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (Cinvestav-IPN) por las becas otorgadas (CVU 555232).

Contenido

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN	4
Generalidades del corazón	4
Morfología de los cardiomiocitos	5
Maquinaria contráctil	7
Mecanismo de activación de la maquinaria contráctil	10
Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje	11
Potencial de acción	13
Acople excitación-contracción (ECC)	15
Remodelado estructural y eléctrico cardiaco	17
Pirfenidona	19
Efecto antioxidante	19
Efecto antiinflamatorio	21
Efecto antifibrótico	21
Efectos secundarios de pirfenidona	22
ANTECEDENTES	23
Efectos de la pirfenidona en la función cardiaca	23
Efectos de pirfenidona en las propiedades electrofisiológicas de cardiomiocitos	25
JUSTIFICACIÓN	31
HIPÓTESIS	32
OBJETIVO GENERAL	32
OBJETIVOS PARTICULARES	32
MATERIALES Y MÉTODOS	33
Cultivo primario de cardiomiocitos ventriculares de rata Wistar adulta	33
Tratamiento	34
Experimentos de contractilidad y transitorios de Ca^{2+}	34
Experimentos de fijación de voltaje	37
Registros de transitorios de calcio	39

Soluciones de registro	40
Análisis estadístico.....	40
RESULTADOS	41
Registros simultáneos de contractilidad y transitorios de Ca^{2+}	41
Pirfenidona incrementa el Ca^{2+} sistólico sin modificar el Ca^{2+} diastólico.....	43
Pirfenidona modifica la cinética de contractilidad a nivel de sarcómero y a nivel celular	44
El tratamiento con pirfenidona altera el comportamiento de los diagramas de fases de contracción <i>versus</i> $[Ca^{2+}]_i$	46
Pirfenidona aumenta el tamaño celular medido por C_m	49
Registros simultáneos de transitorios de calcio y corrientes de calcio tipo L.....	49
Pirfenidona estimula canales de calcio tipo L en miocitos ventriculares.....	51
La pirfenidona incrementa la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} inducidos por Ca^{2+}	52
El tratamiento con pirfenidona no afecta la ganancia del acople excitación-contracción.	53
DISCUSIÓN.....	55
El tratamiento crónico con pirfenidona provoca un efecto inotrópico y lusitrópico positivo...55	
La pirfenidona provoca una disminución en la sensibilidad de la maquinaria contráctil a la activación por Ca^{2+}	57
La pirfenidona incrementa el tamaño de los miocitos ventriculares.....	58
La pirfenidona estimula la salida de Ca^{2+} del RS durante el acople excitación-contracción.....	59
Relevancia fisiológica.....	60
PERSPECTIVAS	61
CONCLUSIONES	62
REFERENCIAS	63
APÉNDICE	71

RESUMEN

Durante el acople excitación-contracción (ECC), el potencial de acción activa canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L ($\text{Ca}_v1.2$), provocando la entrada de Ca^{2+} al citoplasma (I_{CaL}), éste a su vez activa a los receptores de rianodina, lo que conlleva a la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (RS). Como resultado, se presenta un incremento transitorio en la concentración de Ca^{2+} libre intracelular (transitorio de Ca^{2+}), capaz de activar a la maquinaria contráctil provocando el acortamiento celular.

La pirfenidona es un fármaco que inhibe el desarrollo de fibrosis y en consecuencia optimiza el funcionamiento del corazón. Básicamente, reduce el riesgo de desarrollar fibrilación auricular y atenúa secuelas ventriculares asociadas con el infarto al miocardio. Estas acciones se atribuyen a que el fármaco disminuye la expresión del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1), el cual es una de las principales citosina profibrogénica. Además, en nuestro laboratorio se descubrió que pirfenidona es capaz de modular las propiedades electrofisiológicas de los miocitos, ya que incrementa la actividad del $\text{Ca}_v1.2$ a través de una vía de señalización dependiente del AMPc y PKA, pero independiente del TGF- β 1.

Más recientemente reportamos que el tratamiento crónico con pirfenidona también aumenta la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} , sin modificar: la ganancia del ECC, el nivel de Ca^{2+} del RS disponible para ser liberado, ni la constante de tiempo de recaptura de Ca^{2+} al RS por la actividad de SERCA. En contraste, el fármaco inhibe la remoción lenta o secundaria de Ca^{2+} , atribuible tanto a un componente sensible como a uno insensible al Na^+ extracelular. Estas observaciones se hicieron en miocitos auriculares, primordialmente. En esta tesis se pretende extender esa clase de estudios a miocitos ventriculares.

El enfoque experimental consistió en aislar miocitos ventriculares de rata adulta y mantenerlos en cultivo durante 1-2 días, en ausencia (control) o presencia de pirfenidona, con la finalidad de investigar a través de estimulaciones eléctricas de campo, si pirfenidona modula la cinética de la contractilidad y los transitorios de Ca^{2+} . También se exploró la posibilidad de que el fármaco sea capaz de incrementar la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} asociados con el ECC, mediante experimentos simultáneos de fijación de voltaje y microfluorometría.

Los resultados indican que pirfenidona incrementa la corriente de Ca^{2+} tipo L, la amplitud del transitorio de Ca^{2+} , el porcentaje máximo de acortamiento y las velocidades de contracción y relajación. En contraste, no se modifica la ganancia del ECC ni los niveles de Ca^{2+} diastólico. Finalmente, diagramas de fase —contracción *versus* niveles de Ca^{2+} — indican que el compuesto disminuye la sensibilidad de los miofilamentos a la activación por Ca^{2+} .

Estos hallazgos contribuyen a entender los efectos benéficos que se observaban a nivel tisular. En particular, la mayor amplitud de los transitorios de Ca^{2+} y aceleración de las contracciones ayuda a explicar por qué pirfenidona incrementa la fracción de expulsión de sangre, en ventrículos con secuelas post-infarto al miocardio.

ABSTRACT

During excitation-contraction coupling (ECC), action potentials activate voltage-gated Ca^{2+} channels (L-type, or $\text{Ca}_v1.2$). This activation allows Ca^{2+} to enter into the cytoplasm (I_{CaL}) which drives the opening of ryanodine receptors, leading to the release of Ca^{2+} from the sarcoplasmic reticulum (SR). As a result, the concentration of intracellular free Ca^{2+} rises transiently (Ca^{2+} transient), allowing this ion to activate the contractile machinery, thus resulting in cell shortening.

Pirfenidone is a drug that inhibits the development of fibrosis; therefore, it improves the performance of the heart by reducing the risk of atrial fibrillation and ventricular complications related to myocardial infarction. These effects are attributed to a concomitant reduction in the expression levels of a pro-fibrotic cytokine, TGF- β 1, which is considered the principal fibrogenic cytokine. At the cellular level, our laboratory found that chronic treatment with pirfenidone regulates the electrophysiological properties of myocytes. In particular, the drug increases the activity of $\text{Ca}_v1.2$ through a cAMP and PKA-dependent signaling pathway, but independent of TGF- β 1.

More recently, we reported that the drug also increases the amplitude of the Ca^{2+} transient, without altering: the gain of ECC, levels of releasable SR Ca^{2+} or the rate of SR Ca^{2+} reuptake by SERCA. In contrast, pirfenidone inhibits the slow or secondary systems that recycle Ca^{2+} (both sensitive and insensitive to extracellular Na^{2+}). All these observations were made on atrial myocytes, primordially. Thus, the main goal of this work is to extend this kind of studies to ventricular myocytes.

The experimental approach consisted on isolating adult rat ventricular myocytes. They were then kept in culture for 1-2 days, in the absence (control) or presence of pirfenidone [1 mM] and subsequently stimulated by electrical field. The kinetics of contractility and Ca^{2+} transients was then explored. Additionally, simultaneous experiments of voltage clamp and microfluorometry were performed, to estimate the gain of ECC. Our results indicate that pirfenidone increases: I_{CaL} , the amplitude of the Ca^{2+} transient, the percentage of cell and sarcomere shortening, and the maximum velocities of contraction and relaxation. In contrast, it altered neither the gain of ECC nor the levels of diastolic Ca^{2+} . Finally, phase diagrams of contraction versus levels of Ca^{2+} indicate that pirfenidone reduces the sensitivity of myofilaments to activation by Ca^{2+} .

These findings contribute to the understanding the beneficial effects previously observed at the tissue level. For example, the largest amplitude of Ca^{2+} transients and the acceleration of contractions help to explain why pirfenidone increases the fraction of blood ejection, in ventricles damaged post infarction.

ABREVIATURAS

$[Ca^{2+}]_i$	Concentración de Ca^{2+} intracelular
<i>CICR</i>	Liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}
<i>CIDV</i>	Canales iónicos dependientes de voltaje
C_m	Capacitancia membranal
<i>cTnC</i>	Troponina C cardiaca
<i>cTnI</i>	Troponina I cardiaca
<i>cTnT</i>	Troponina T cardiaca
<i>ECC</i>	Acople Excitación-Constracción
G_{max}	Conductancia máxima
I_{CaL}	Corriente de Ca^{2+} tipo L
I_m	Corriente iónica que fluye a través de la membrana
<i>iNOS</i>	Óxido nítrico sintasa inducible
<i>LTCC</i>	Canales de Ca^{2+} tipo L
<i>mb</i>	Membrana plasmática
<i>PA</i>	Potencial de acción
<i>PFD</i>	Pirfenidona
<i>ROS</i>	Especies reactivas de oxígeno
<i>RS</i>	Retículo sarcoplásmico
<i>RyR</i>	Canal de Ca^{2+} sensible a rianodina
<i>Tm</i>	Tropomiosina
<i>Tn c</i>	Complejo de troponinas
<i>TT</i>	Túbulo T
<i>VDCC</i>	Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje
V_m	Potencial de mb

INTRODUCCIÓN

It will not be possible to trace, historically and step by step, the growth of our knowledge of the fine structure of cardiac muscle... Consequently, we shall stress newer developments and review the rest more briefly. Sommer & Waugh 1976

Generalidades del corazón

El corazón es un poderoso órgano muscular cuyas funciones principales son: i) recibir la sangre desoxigenada del organismo y bombearla a los pulmones; y ii) recolectar la sangre oxigenada de los pulmones y bombearla a todos los tejidos del cuerpo (Laizzo 2010). Para lograr cumplir sus funciones, el corazón se somete a un ciclo de eventos altamente sincronizados que pueden dividirse en dos estados: diástole y sístole. Durante la diástole, los cardiomiocitos (células contráctiles) se encuentran relajados, permitiéndoles a las cámaras superiores (aurículas) e inferiores (ventrículos) del corazón recolectar la sangre; en contraste, en el estado sistólico los cardiomiocitos se contraen, provocando el bombeo de sangre. Las aurículas tras contraerse impulsan la sangre hacia los ventrículos (a través de la válvula mitral y tricúspide), mientras que los ventrículos bombean la sangre hacia los pulmones o hacia el resto del organismo a través de la válvula pulmonar y aórtica, respectivamente (Laizzo 2010; Fearnley et al. 2011; Services 2015).

Hoy en día se conoce ampliamente la fisiología cardíaca, lo que nos ha permitido identificar a los protagonistas que participan en la secuencia de eventos que generan la alternancia entre sístole y diástole, siendo ampliamente aceptado que la transición de diástole a sístole requiere de un acople electromecánico que resulta en la contracción del corazón. Es por ello que uno de los grandes retos para la investigación es hallar fármacos que modulen la dinámica de dicho acople con la finalidad de mejorar el funcionamiento cardíaco, el cual se ve alterado en múltiples patologías cardíacas.

A continuación, se revisan brevemente algunos conceptos relacionados con las propiedades morfológicas, mecánicas, eléctricas y fisiológicas de los cardiomiocitos. Posteriormente se expondrán los antecedentes que motivaron el desarrollo de este trabajo.

Morfología de los cardiomiocitos

Los miocitos cardiacos o cardiomiocitos, también conocidos como células de trabajo, generalmente son células mononucleadas (aunque algunos son binucleados) y poseen organelos típicos de células eucariotas como: mitocondrias, aparato de Golgi, retículo sarcoplásmico (RS), lisosomas y peroxisomas, además poseen miofilamentos altamente organizados que son esenciales para la contracción cardiaca (Sommer & Waugh 1976), como se detallará en la siguiente sección.

La morfología y composición molecular de los cardiomiocitos varía de acuerdo a la edad del organismo y a su ubicación dentro del corazón. La principal diferencia entre miocitos ventriculares y auriculares, es su membrana plasmática (sarcolema), la cual es de vital importancia para el proceso de contracción, puesto que es la región donde se conduce el potencial de acción y donde se ubican proteínas que permiten la entrada y salida del ión Ca^{2+} . En el caso del sarcolema ventricular, se observan invaginaciones de 100 a 300 nm, llamados túbulos T (TT) (Song et al. 2005), estas invaginaciones constituyen del 33 al 64% de la totalidad del sarcolema ventricular de rata, ubicándose un 60% de los TT a una distancia menor de 0.5 μm de las líneas Z (Page & Surdyk-Droske 1979; Soeller & Cannell 1999). Si bien en un inicio se creía que los miocitos auriculares no poseían TT, hoy en día hay reportes que indican que cerca de un 1/3 de dicha población presenta TT, siendo la región del epicardio auricular la que presenta mayor cantidad de TT con respecto al endocardio (Frisk et al. 2014).

El RS se asocia funcionalmente con el sarcolema en regiones conocidas como *junctions* que su vez se dividen en triadas o diadas; los nombres hacen referencia al número de integrantes: un TT más dos cisternas de RS a sus costados es una triada, mientras que una cisterna del RS acoplada a la periferia del sarcolema es una diada (*Fig. 1*). En los cardiomiocitos auriculares, el patrón estriado que presentan, bajo microscopia, se debe principalmente a una distribución regular de túbulos Z (*Fig. 1B*), que son regiones del RS orientadas perpendicularmente a lo largo del eje de la célula. En las *junctions* se yuxtaponen los canales de calcio tipo L del sarcolema y los receptores de rianodina (canales liberadores de calcio del RS, RyR). Esto hace posible un proceso denominado liberación de calcio inducida por calcio (o CICR, por sus siglas en inglés, en el que la entrada de este ion por canales L activa a los RyR aledaños. En relación a la distribución

espacial del RyR, éste se puede dividir en dos grupos: los que se localiza en la triadas o diadas (*junctional RyR*) y los que se encuentran lejos del sarcolema (e.g. en las profundidades de la célula, *non-junctional RyR*; (Bootman et al. 2006).

Por otra parte, los discos intercalares son sistemas de unión que asocian a los cardiomiocitos entre sí, formando las fibras del miocardio. Los trabajos de Sjöstrand establecieron que los discos intercalares se ubican en el extremo longitudinal y de forma escalonada en los extremos transversales (Sjostrand et al. 1958), hoy en día sabemos que las uniones célula-célula presentes en el corazón son de 3 tipos: fascia adherente (unión adherente), maculae adherente (desmosoma) y uniones comunicantes (gap junctions o nexos) (Ross & Wojciech 2008; Mezzano & Sheikh 2012).

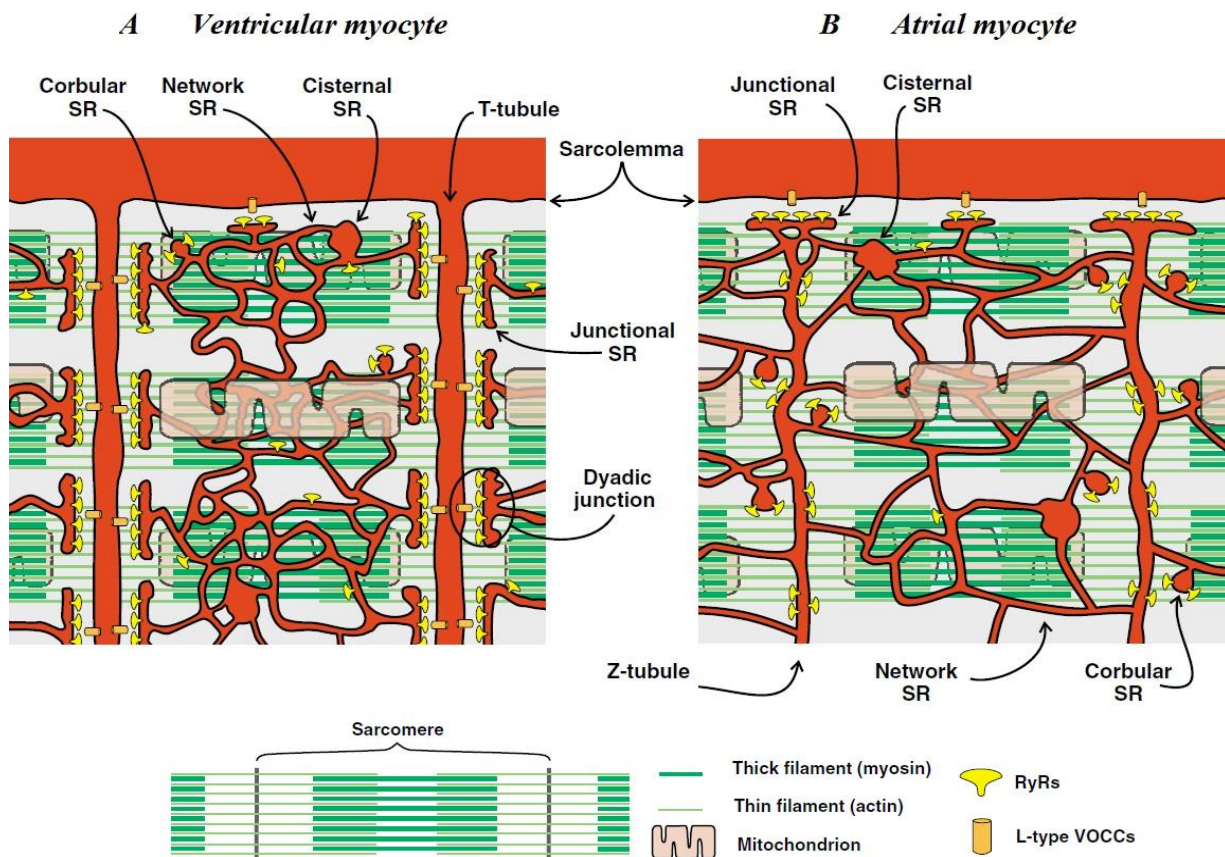


Figura 1. Diferencias estructurales de miocitos ventriculares y auriculares. Los miocitos ventriculares (A) presentan túbulos T mientras que los miocitos auriculares (B) muestran túbulos Z. Además, en comparación de los miocitos auriculares los ventriculares presentan *junctions* (sitios de unión entre la membrana plasmática o el sarcolema y el RS, diadas o triadas) que llegan a regiones más profundas del citoplasma, debido a la presencia de túbulos T o TT. RS, retículo sarcoplásmico. Tomado de Bootman et al., 2011.

Maquinaria contráctil

Los miofilamentos son los encargados de transducir la energía química a energía mecánica, es por ello que son considerados como la “maquinaria contráctil” de la célula. En el caso de los cardiomiocitos, los miofilamentos son los componentes que mayor volumen celular ocupan (del 40 al 50%; (Page et al. 1971), esto se debe en gran parte a que están conformados por un gran número de proteínas, que para facilitar su estudio se agrupan en filamentos delgados, gruesos y proteínas accesorias. Bajo un microscopio, la disposición de los filamentos gruesos y delgados crea un patrón repetitivo de bandas claras y oscuras (bandas I, A, H y líneas Z y M, *Fig. 2*), siendo la región delimitada por dos líneas Z lo que denominamos como *sarcómero*, el cual es la unidad contráctil del músculo estriado (Ross & Wojciech 2008; Silverthorn 2009)

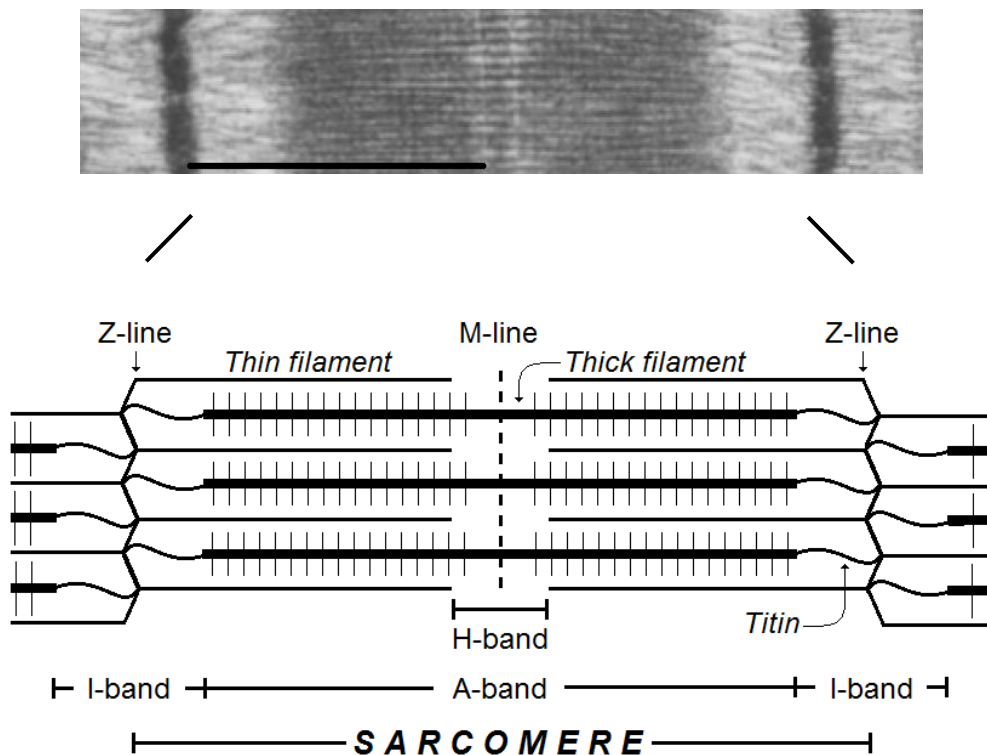


Figura 2. Organización del sarcómero. Las líneas Z representan los límites laterales del sarcómero y la línea M indica el centro de los filamentos gruesos. La banda A es la región donde se ubican los filamentos gruesos. Las bandas H e I son las zonas donde no se superponen los filamentos. En la parte superior se muestra una imagen del sarcómero tomada por microscopía electrónica de una célula muscular cardíaca, la barra indica una longitud de 1 µm. Tomada de (Funatsu et al. 1993). La imagen inferior esquematiza la estructura del sarcómero. Tomada de Bers 2001.

Una de las características más llamativas del proceso de activación en el músculo cardíaco, es la complejidad y alcance de las interacciones proteína-proteína que se desencadenan por la unión del Ca^{2+} a los filamentos delgados, es por ello que antes de adentrarnos en el proceso de activación de la maquinaria contráctil, describiremos brevemente las principales proteínas que conforman al sarcómero y las interacciones proteicas que se llevan a cabo a bajas concentraciones de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$).

La *miosina II*, es el principal componente de los filamentos gruesos y la proteína motora del sarcómero. Una cola α -helicoidal de 150-160 nm (que forma el eje central de los filamentos gruesos) y dos cabezas globulares de 15-20 nm capaces de unirse a la actina e hidrolizar ATP, componen a la miosina. En el músculo cardíaco ~300 moléculas de miosina se agrupan cola con cola para formar un filamento grueso (Jiménez & Merchant 2003; Silverthorn 2009).

La *actina filamentosa* (F-actina) formada por la polimerización del monómero G-actina (actina globular), es considerada como el esqueleto de los filamentos delgados, ya que funciona de andamiaje para las demás proteínas que conforman a los filamentos delgados y también posee los sitios de unión a miosina que son indispensables para que se lleve a cabo la contracción. Además de la F-actina, los filamentos delgados están constituidos por la *tropomiosina* (Tm) y el *complejo de troponinas* (Tn).

La Tm es una proteína de 40 nm de largo y 2 nm de diámetro conformada por una doble α -hélice, que se estabiliza gracias a un hepta-péptido repetido de aminoácidos (aa) hidrofóbicos, la secuencia de aa de Tm también contiene un repetido periódico, tal que le permite unirse a 7 monómeros de actina. Cada 70 monómeros de actina se encuentra un complejo de troponinas unido a una Tm. La troponina es un heterotrímero formado por las subunidades: *troponina C* (TnC), *troponina I* (TnI) y *troponina T* (TnT).

La TnC, posee un peso de 18 kDa y se compone de dos dominios globulares y cuatro sitios de unión a Ca^{2+} (dos en cada dominio), los sitios I – II ubicados en el lóbulo N-terminal son específicos para Ca^{2+} , mientras que los dos restantes unen tanto Mg^{2+} como Ca^{2+} . Para el caso de TnC cardíaca (cTnC) el sitio I no une Ca^{2+} en el rango fisiológico, ya que difiere respecto a otras isoformas en cuanto a la identidad de aa en los sitios que coordinan al ion Ca^{2+} .

La TnI cardiaca (cTnI) con un peso de 24 KDa tiene 6 regiones funcionales, entre las que destacan: una extensión de aa en el extremo N-terminal susceptibles a ser fosforilados por PKA (Ser23 y Ser24); una región reguladora (o activadora) y una región inhibitoria que cumple la función crítica de interactuar con la actina e inhibir la actividad ATPasa de la miosina a bajas $[Ca^{2+}]_i$.

La TnT cardiaca (cTnT) con un peso ~ 38 KDa y una longitud de casi 21 nm, no solo es el componente más largo y grande del heterotrímero de Tn, sino que también es la subunidad que posee más sitios de interacción proteica, ya que se une a cTnC, cTnI, Tm y a la actina (Latorre et al. 1996; Kobayashi & Solaro 2005).

La yuxtaposición entre los filamentos gruesos y delgados y la correcta alineación de los mismos, se mantiene gracias a un gran número de proteínas que se clasifican como proteínas accesorias. A continuación describiremos solo 2 proteínas: la titina y nebulina (si se desea ahondar en las demás proteínas accesorias, se puede recurrir a Ross and Wojciech 2009).

La titina, también llamada conectina, es una proteína flexible con un peso de 2970 a 3700 KDa (varía de acuerdo a la isoforma), lo que la convierte en la proteína más grande encontrada en los mamíferos. Se compone mayoritariamente por dominios homólogos a la fibronectina-3 (Fn3) y dominios semejantes a la inmunoglobulina (dominios Ig), que le permiten unirse a la actina y a la miosina, respectivamente. Sus funciones no solo se limitan a favorecer el correcto alineamiento de los miofilamentos de actina y miosina, sino que además se encarga de la regulación de la longitud y distensibilidad del sarcómero (Castro-Ferreira et al. 2009).

Por otra parte, la nebulina es una proteína inelástica de 600 KDa, que se encuentra adherida a los filamentos delgados con el extremo C-terminal orientado a la línea Z, su función principal es la de alinear a los filamentos de actina y anclarlos a la línea Z, también se cree que regula la longitud de los filamentos delgados durante el desarrollo muscular (Garrido Pertierra et al. 2006; Silverthorn 2009).

Mecanismo de activación de la maquinaria contráctil

Gracias a datos obtenidos desde los años 1990's, por cristalografía, rayos-X, criomicroscopía electrónica, etc., se obtuvo una idea bastante precisa (pero incompleta) de lo que ocurría durante la contracción muscular. Sin embargo, no fue hasta inicios del siglo XX, que los trabajos de Takeda y colaboradores y Craig, mejoraron en gran medida el conocimiento de las interacciones proteicas que se llevan a cabo en la contracción (Craig & Lehman 2001; Takeda et al. 2003).

Debido a que en el estado diastólico el $[Ca^{2+}]_i$ es bajo (~ 100 nM), el sitio específico de unión a Ca^{2+} de cTnC se encuentra desocupado, por lo que el C-terminal de TnI (región inhibitoria) se encuentra unido a la actina, permitiendo que el complejo de Tn-Tm se localice en la periferia de los filamentos de actina, esa conformación impide la unión de la cabeza globular de miosina con la actina (complejo actomiosina). Cuando la $[Ca^{2+}]_i$ aumenta, el ion se une al sitio regulador II de cTnC, provocando cambios conformacionales en cTnC capaces de desestabilizar la interacción de TnI-actina y favorecer la unión de TnI con el C-terminal de TnC. Esta unión inducida por Ca^{2+} genera cambios estructurales que inducen el movimiento de Tm hacia el interior de la F-actina removiendo de esa manera el bloqueo estérico del complejo Tn-Tm y permitiendo la formación del complejo actomiosina (Kobayashi & Solaro 2005; Solaro et al. 2009).

Pese a que hay un gran reacomodo de las interacciones proteína-proteína de los filamentos delgados, desencadenado por la unión al Ca^{2+} , eso no es suficiente para generar contracción, También se requiere la participación de una proteína motora de los filamentos gruesos, o miosina.

En el músculo relajado, el ATP es rápidamente hidrolizado una vez que se une a las cabezas de miosina; sin embargo, la energía liberada de la hidrólisis aun no es utilizada, ya que ni el ADP ni el P_i es liberado (estado activado de la miosina, M-ADP- P_i). Cuando el $[Ca^{2+}]_i$ aumenta, se libera la región de la actina que posee sitios de unión a miosina, permitiendo que se forme el complejo actomiosina (A-M-ADP- P_i), y solo hasta que se forma el complejo se libera el P_i , provocando que la interacción A-M se fortalezca, al igual que provoca que se genere el desplazamiento de los filamentos delgados hacia el centro del sarcómero, debido a cambios conformacionales que

provoca una flexión de $\sim 45^\circ$ en la cabeza de miosina. Finalmente, el ADP también es liberado fortaleciendo aún más la interacción A-M y la única manera de debilitarla es la reincorporación de ATP a la miosina, repitiendo de esa manera el ciclo, el cual continuará hasta que el $[Ca^{2+}]_i$ vuelva a disminuir a valores diastólicos o hasta agotarse el ATP (estado conocido como *rigor mortis*) (Rayment et al. 1993; Welsh 2008).

Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje

La base de la excitabilidad de la membrana plasmática (mb) son los iones y los canales iónicos dependientes de voltaje (CIDV). Los CIDV, forman una superfamilia de genes homólogos constituida por las familias de canales de K^+ , Na^+ y Ca^{2+} , y todos ellos responden a cambios en el potencial de mb (V_m). Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDCC, por sus siglas en inglés) permiten una entrada de Ca^{2+} al interior de la célula y considerando que el Ca^{2+} actúa como mensajero químico en varias funciones celulares como: contracción muscular, secreción de neurotransmisores, transcripción génica, modulación de la excitabilidad de la membrana, regulación enzimática, etc., se podría decir que los VDCC son los puentes que enlazan las señales eléctricas de la superficie con las respuestas bioquímicas intracelulares.

En mamíferos, la familia de VDCC se conforma de al menos 10 miembros, codificados por diferentes genes. Actualmente, la forma de nombrarlos más empleada es la sugerida por Ertel y colaboradores, donde se emplea el símbolo químico del ión que fluye principalmente (Ca), seguido (en subíndice) del principal regulador fisiológico, posteriormente se coloca el número correspondiente a la subfamilia. Finalmente se coloca un punto y el número que indica el orden en que se descubrió el canal dentro de la subfamilia (Ertel et al. 2000). Por ejemplo, el $Ca_v1.2$, es un canal de Ca^{2+} regulado por voltaje que pertenece a la subfamilia 1 y fue el segundo en descubrirse dentro de su subfamilia.

Los VDCC se pueden agrupar en base a sus propiedades electrofisiológicas en canales de alto y bajo umbral de activación (HVA y LVA, respectivamente por sus siglas en inglés). Los canales HVA, han sido encontrados abundantemente en músculo esquelético, liso y cardiaco, al igual que en neuronas, y debido a la amplitud de su conductancia (*Large*) y su lenta cinética de decaimiento (*Long Lasting*) se clasificaron como canales de calcio tipo L (LTCC, por sus siglas en

inglés) (Lacinová 2005). No obstante, ahora se sabe que existe otra subfamilia de canales HVA que se expresan principalmente en neuronas y células neuroendócrinas.

La subfamilia de los LTCC, consta de 4 miembros ($Ca_v1.1 - 1.4$) y se activan a voltajes mayores a -30 mV, además presentan una alta conductancia unitaria (25 pS) y su actividad se ve afectada con bajas concentraciones de dihidropiridinas (DHPs), por lo que también se les conoce como receptores de DHPs o DHPRs (por sus siglas en inglés; (Hille 1992). En corazón de rata adulta no se ha reportado la participación de los $Ca_v1.1$ ni $Ca_v1.4$. En los nodos sinusal y auriculoventricular se encuentra expresado principalmente el canal $Ca_v1.3$, mientras que los ventrículos expresan exclusivamente al $Ca_v1.2$ (Benitah et al. 2010).

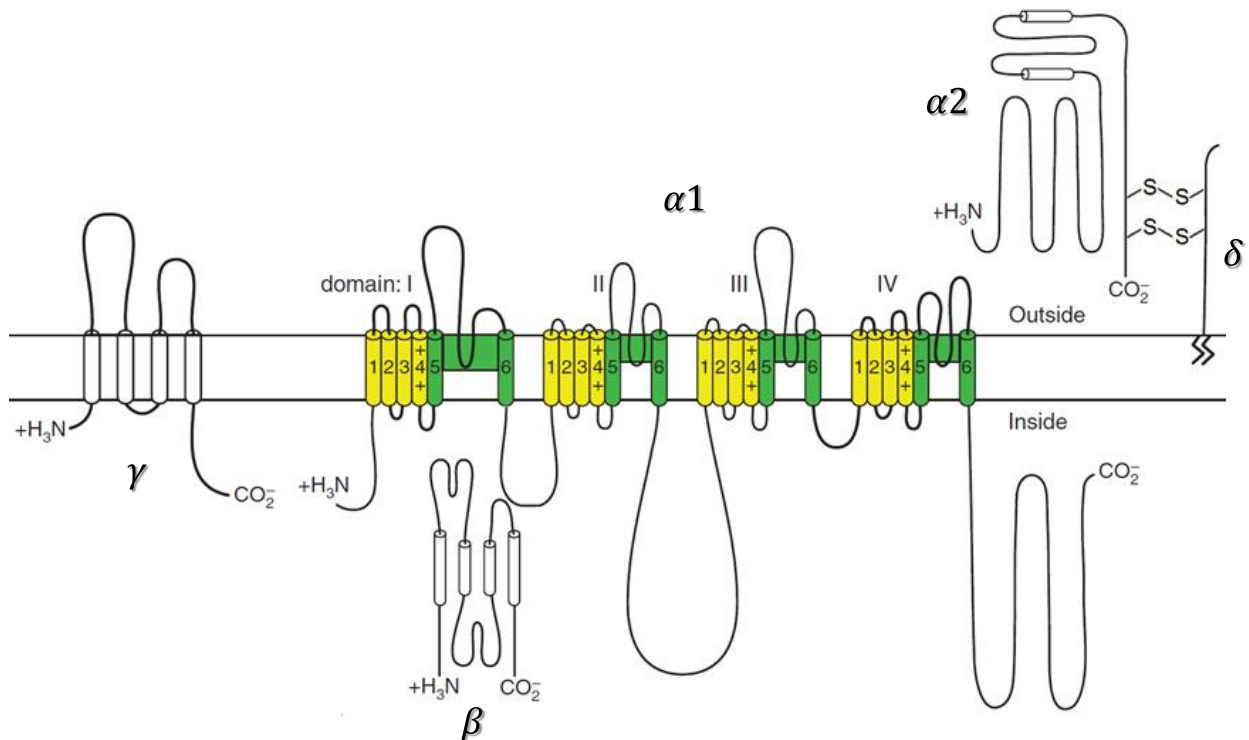


Figura 3. Esquema general de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Se muestra el complejo de proteínas que componen al canal: la subunidad principal $\alpha 1$ y las accesorias γ , β y $\alpha 2$ - δ . En la subunidad principal se representan los segmentos transmembranales (1-6) de los dominios (I-IV). En verde se denota la región que forma el poro del canal y en amarillo el sensor de voltaje (S4). Imagen modificada de Caterall 2011.

Estructuralmente, los LTCC, se componen de cuatro o cinco subunidades distintas (Fig. 3). La subunidad principal ($\alpha 1$), es una proteína de 250 KDa, sin embargo, los *western-blots* arrojan una banda prominente de 190 kDa, que se atribuye a una escisión del extremo C-terminal (De Jongh et al. 1996).

$\alpha 1$ se asocia con las siguientes subunidades accesorias: $\alpha 2$ - δ , dímero de 170 kDa unido por puentes disulfuro y codificado a partir del mismo gen; β , subunidad intracelular de 55 kDa y una subunidad transmembranal γ de 33 kDa (*Fig. 3*). La subunidad principal $\alpha 1$ es la más grande y forma el poro por donde pasa Ca^{2+} , además de que contiene el sensor de voltaje y sitios de unión de varios moduladores; se organiza en cuatro dominios homólogos (I-IV), agrupados en seis segmentos transmembranales (S1-S6). El segmento S4 funge como el sensor de voltaje gracias a los residuos de carga positiva (lisinas y argininas) con los que cuenta. El asa transmembranal entre los segmentos S5 y S6 de cada dominio dan forma al filtro de selectividad iónico y representa la parte más angosta de la región del poro (Catterall 2011).

Potencial de acción

El corazón es una bomba rítmica electromecánica, cuyo funcionamiento depende en gran medida de la generación y propagación isócrona del potencial de acción (PA), ya que éste es el evento inicial que genera la contracción.

El PA es un cambio en el V_m que refleja una secuencia compleja de activación e inactivación de numerosos canales iónicos que determinan principalmente el movimiento de los iones Ca^{2+} , K^+ y Na^+ (Nerbonne & Kass 2005). Cabe resaltar dos aspectos del PA cardíaco: i) su capacidad de propagarse a través de las uniones comunicantes, lo que permite despolarizar a células adyacentes de forma sincronizada, provocando que el corazón funcione como un sincitio tanto eléctrico como mecánico (De Bakker & Van Rijen 2006) y ii) su larga duración previene la re-excitación eléctrica y proporciona el tiempo necesario para que se lleve a cabo la contracción y relajación muscular antes del próximo estímulo eléctrico (Bers 2001).

El PA ventricular consta de 5 fases (*Fig. 4*) y parte de un V_m de reposo de ~ -85 mV, debido a la alta conductancia de K^+ que presentan los canales responsables de I_{K1} . Una vez que se excita la célula debido al impulso eléctrico, se activan los canales de Na^+ dependientes de voltaje ($\text{Na}_v1.5$), provocando una despolarización súbita (fase 0) que eleva el V_m de -85 a $+50$ mV (cercano al potencial de equilibrio del Na^+).

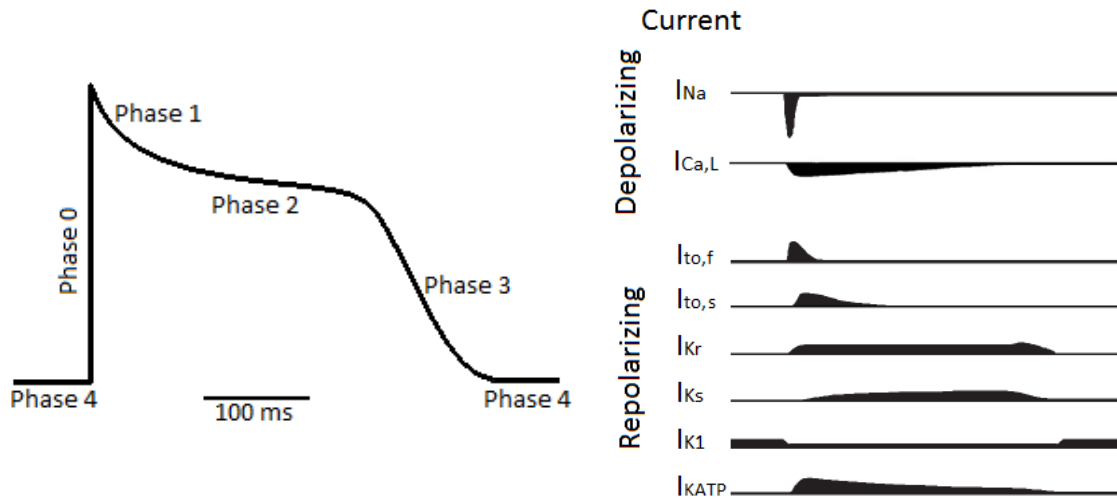


Figura 4. **Potencial de acción cardíaco.** Izquierda) Representación esquemática de las cinco fases del PA ventricular. Derecha) Corrientes iónicas involucradas en el PA. Dichas corrientes pueden ser ya se entrantes (provocando despolarización), concretamente de sodio (I_{Na}) y de calcio tipo L (I_{CaL}) o salientes (de K^+ , provocando repolarización). Las últimas se pueden dividir en corrientes transitorias ($I_{to,f}$ e $I_{to,s}$), sostenidas (I_{Kr} , e I_{Ks}) y de rectificación entrante (I_{K1} e I_{KATP}). *Modificada de (Nerbonne & Kass 2005).*

La fase 1 (repolarización temprana) representa la inactivación de los canales de Na^+ y la concomitante activación de canales de K^+ responsables de la corriente saliente transitoria de K^+ (I_{to}), lo que da como resultado una disminución en el V_m de +50 a \sim +30 mV.

La fase 2, es el resultado de un balance entre la corriente despolarizante I_{CaL} , que se origina por la apertura de los LTCC y las corrientes repolarizantes de rectificación tardía de K^+ , como lo son I_{Ks} e I_{Kr} . La inactivación de los LTCC permite que predomine el efecto repolarizante de I_{Ks} e I_{Kr} dando origen a la fase 3 o de repolarización tardía. Finalmente, la fase 4 representa el retorno y mantenimiento del potencial de reposo (Nerbonne & Kass 2005; Amin et al. 2010; Santana et al. 2010).

Cabe mencionar que la forma del PA varía entre cardiomiocitos de diferentes regiones del corazón, entre la edad del animal y especie, debido a diferencias en la expresión de canales iónicos de membrana que contribuyen en cada fase del PA (Santana et al. 2010).

Acople excitación-contracción (ECC)

Desde que en 1883 Ringer demostró que el corazón de rana solo se contraía en la presencia de Ca^{2+} extracelular (Ringer 1883), se ha aumentado en gran medida el interés por comprender el papel del Ca^{2+} en el proceso de la contracción muscular. En los años posteriores a 1883, surgieron múltiples trabajos que relacionaban a la contracción muscular con la estimulación eléctrica, pero fue hasta 1952 que Sandow definió el término: *acople excitación contracción* (ECC, por sus siglas en inglés), como la secuencia de eventos que ocurren desde la generación del potencial de acción en la fibra muscular hasta que se inicia la generación de tensión (Sandow 1952).

En las células cardíacas, el ECC comienza cuando se despolariza el V_m , dando pie a que se activen los LTCC, lo que genera una I_{Ca} entrante, que por sí sola es insuficiente para inducir la activación de la maquinaria contráctil pero es suficiente para controlar localmente una gran liberación de Ca^{2+} del RS, a través de activar un grupo o *clúster* de RyRs (Bers 2002). Este proceso se denomina liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR, por sus siglas en inglés) el cual fue descrito y demostrado de manera formidable por Fabiato en el músculo cardíaco (Fabiato 1983; Fabiato 1985). El RyR requiere de la unión de ~ 4 iones Ca^{2+} para activarse (Zahradníková et al. 1999) y permitir la salida de Ca^{2+} del RS, aumentando localmente la concentración de Ca^{2+} y activando RyRs adyacentes, amplificando de esa manera la señal de Ca^{2+} . La liberación de Ca^{2+} , producida por un grupo de RyRs es el evento elemental del ECC y se conoce como chispa de calcio (Cheng et al. 1993; Cannel et al. 1994). Cientos de chispas de Ca^{2+} pueden ser sincronizadas por I_{Ca} (durante la despolarización), produciendo un aumento global y uniforme en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que permite la activación de la maquinaria contráctil y genera contracción (proceso descrito previamente, (Bers 2002).

La CICR es un mecanismo de retroalimentación positiva; es decir, una vez que inicia CICR, él mismo se mantiene activado, entonces, ¿qué provoca la terminación de la CICR? En principio, existen 3 posibilidades: **i)** un cierre estocástico, implica que tanto el Ca_v tipo L como todos los RyRs cercanos al Ca_v se cierran en el mismo momento, provocando una rápida caída de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que interrumpiría la retroalimentación del proceso; **ii)** agotamiento del Ca^{2+} del RS y **iii)** proceso de inactivación/adaptación del RyR, quien presenta un estado refractario para su reactivación,

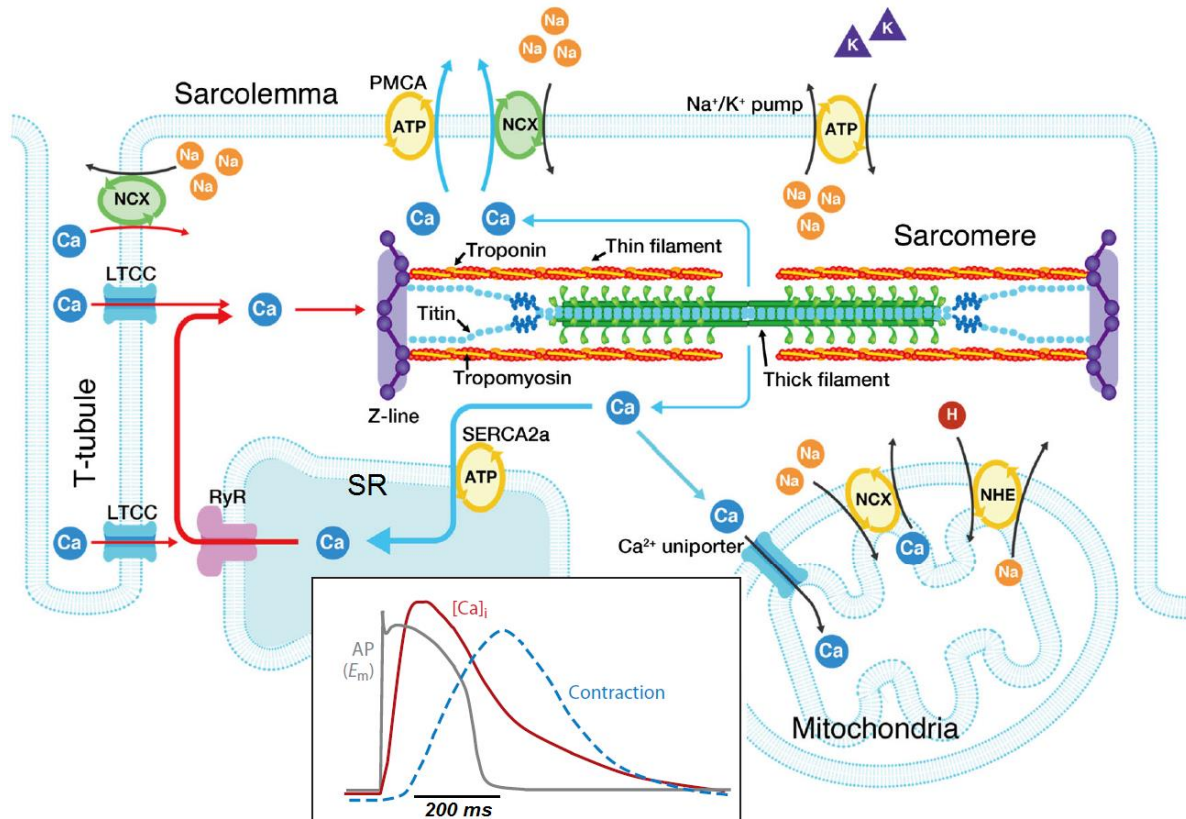


Figura 5. Representación del acople excitación-contracción (ECC) en músculo cardíaco. Se ilustran los flujos de calcio así como los principales sistemas de transporte involucrados en el ECC. Tomada de (Kobirumaki-Shimozawa et al. 2014). El recuadro inferior ilustra las diferencias en la temporalidad del PA, el transitorio de Ca^{2+} y la contracción. Tomada de Bers, 2002. LTCC, Canal de Ca^{2+} tipo L; NCX, intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; NHE, intercambiador de sodio/hidrógeno; PMCA, ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática; RS, Retículo sarcoplásmico; RyR, receptor de rianodina.

al igual que una disminución en su probabilidad de apertura tras activarse; es decir, se puede reactivar pero solo a concentraciones muy elevadas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Bers 2002). Este último fenómeno podría involucrar la participación de ciertas proteínas accesorias de RyR2, tales como sorcina, calmodulina y FKBP12.6 (Rueda et al. 2014). Por ejemplo, Farrell y colaboradores (2003) reportaron que sorcina inhibe al RyR2 a altas $[\text{Ca}^{2+}]_i$, lo cual podría ser clave para explicar el término de la CIRC.

Cada posibilidad mencionada no ha convencido a la totalidad del mundo científico, por lo que actualmente aún se busca un mecanismo indiscutible que explique la terminación de CIRC. Aunque es posible que la respuesta sea una combinación de los mecanismos mencionados.

Una vez que se aumenta la $[Ca^{2+}]_i$ y se lleva a cabo la contracción del músculo cardíaco, la $[Ca^{2+}]_i$ regresa a sus valores diastólicos permitiendo la relajación muscular (Fig. 5). La remoción del Ca^{2+} citosólico se debe principalmente a dos mecanismos: La ATPasa de Ca^{2+} del RS (o bomba SERCA2a), que se encarga de transportar activamente el Ca^{2+} al interior del RS; y el intercambiador de Na^+/Ca^{2+} (NCX), el cual expulsa un ion Ca^{2+} hacia el exterior de la célula por cada 3 iones de Na^+ que introduce a la célula. Estos dos mecanismos remueve casi en su totalidad al ion del espacio citoplásmico. Sin embargo, se ha observado que a pesar de inhibir ambos sistemas aún ocurre la relajación. Eso se debe a que existen otros mecanismos, denominados sistemas lentos de remoción de Ca^{2+} , como la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA) y el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (Bassani et al. 1992).

Remodelado estructural y eléctrico cardíaco.

En los apartados anteriores se explicaron diversos fenómenos que en conjunto permiten un correcto funcionamiento cardíaco, y como podremos recordar, todos ellos (el PA, el ECC y la CICR) requieren de la secuencia sincronizada de diversos eventos, por lo que patologías que afecten el delicado balance de dicha secuencia de eventos, resultaría en un daño global de la funcionalidad cardíaca. De forma general, todos aquellos factores que reducen el flujo sanguíneo, tales como la hipertensión, ajustes neurohumorales, mutaciones en proteínas relacionadas con la contractilidad, etc., conllevan a que el corazón experimente una serie de cambios estructurales (Ramos-Mondragón et al. 2008).

Esa “remodelación estructural” se caracteriza por i) un crecimiento hipertrófico de los cardiomiocitos, ii) incremento en la expresión del TGF- β y iii) un incremento excesivo de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés; (Weber 1997; Armoundas et al. 2001). Dichos cambios favorecen el mantenimiento de la integridad estructural del corazón, además, incrementan el gasto cardíaco y remplazan el tejido dañado a través de un proceso de cicatrización altamente organizado.

La remodelación estructural comúnmente se acompaña de una “remodelación electrofisiológica, que consiste en cambios en la actividad de canales iónicos dependientes de voltaje, el PA y el ECC (Pogwizd et al. 2001; Nattel et al. 2007). Cuando recién se instalan, ambas

remodelaciones se consideran compensatorias; es decir, que forman parte de una respuesta adaptativa del corazón, puesto que los cambios asociados le permiten continuar con su funcionamiento, pese al nuevo estado de estrés. Sin embargo, si el daño persiste los cambios se convierten en crónicos o descompensados y contribuyen *per se* al mal funcionamiento del órgano; concretamente, se puede presentar mayor disminución del gasto cardiaco, fibrosis exacerbada, arritmias, disfunción contráctil progresiva, y todo ello eventualmente puede desembocar en insuficiencia cardiaca (Armoundas et al. 2001). Así, la remodelación que en un principio fue benéfica, termina siendo el propio sustrato para empeorar la función cardiaca (circulo vicioso mostrado con flechas rojas en la Fig. 6).

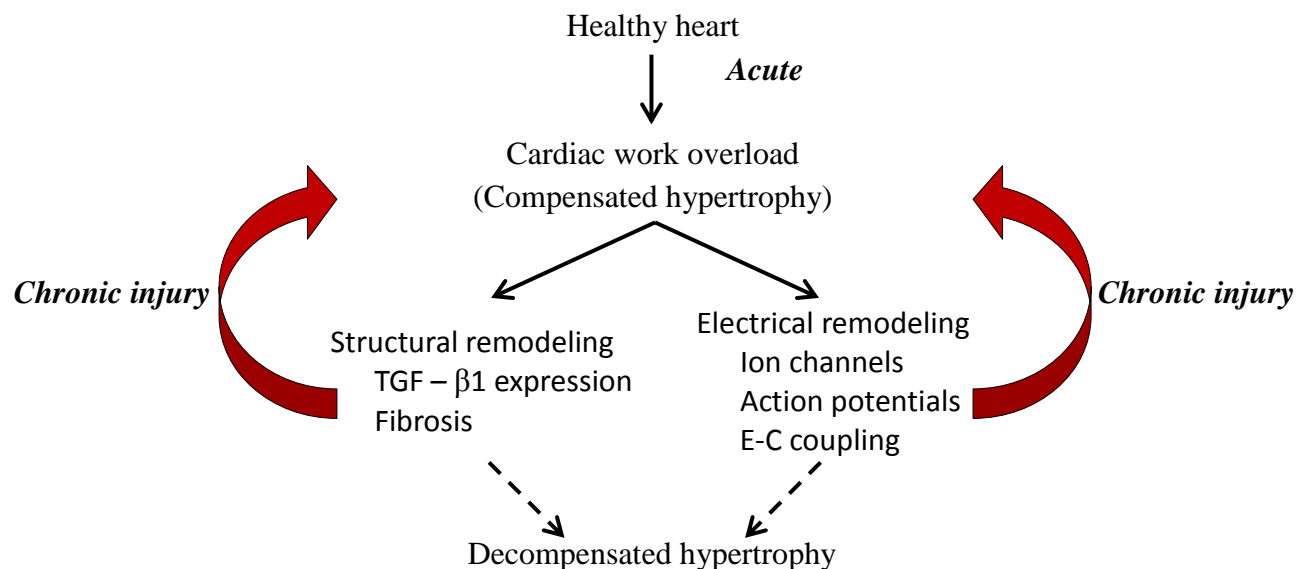


Figura 6. Remodelado estructural y eléctrico cardíaco. Algunas enfermedades provocan una disminución en el gasto cardiaco lo que provoca una remodelación estructural y eléctrica (hipertrofia compensada) como una respuesta de adaptación al estado de estrés. Si el daño se vuelve crónico se genera una retroalimentación que deteriora aún más al corazón (flechas rojas) generando de esa manera, una hipertrofia descompensada (líneas punteadas). Esquema inspirado de Ramos-Mondragón et al. 2008.

Por lo anterior sería deseable que fármacos candidatos a prevenir o revertir padecimientos cardiacos actúen en ambas clases de remodelaciones, estructural y eléctrica. En este trabajo se pretenden investigar efectos de la **pirfenidona**, de la cual se hablará en la siguiente sección.

Pirfenidona

La pirfenidona (PFD), es un compuesto sintético derivado de la 2-piridona (5-metil-1-fenil-2(1H)-piridona, *Fig 7*), posee bajo peso molecular (185.22 g/mol) y debido a su naturaleza hidrofóbica es capaz de atravesar la membrana plasmática sin la necesidad de un receptor (Macías-Barragán et al. 2010). Sus propiedades terapéuticas se descubrieron por Gadekar, quien tras experimentar con múltiples derivados de piridona, en 1976 patentó a AMR-69 (que después se llamaría pirfenidona) por sus propiedades analgésicas, antipiréticas y anti-inflamatorias (Gadekar 1974). In vivo, la PFD es metabolizada principalmente por el citocromo CYP1A2; aunque también participan, en menor medida: CYP2C9, 2C19, 2D6 y 2E1. Su principal metabolito, la 5-carboxi-pirfenidona, se considera inactivo puesto que no ejerce efectos biológicos, aun a concentraciones mucho más elevadas que el fármaco (Carter 2011). Sus efectos se pueden clasificar como anti-oxidantes, anti-inflamatorios y anti-fibróticos, y se describirán brevemente enseguida.

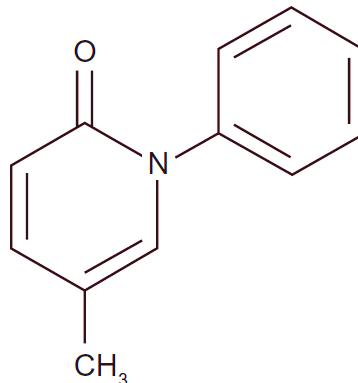


Figura 7. Estructura química de pirfenidona (PFD). La pirfenidona es un derivado de la 2-piridona, posee un peso y fórmula molecular de 185.22 g/mol y $C_{12}H_{11}NO$, respectivamente. Su nombre según la nomenclatura de la IUPAC es 5-metil-1-fenil-2-(1H)-piridona. *Imagen tomada de (Carter 2011).*

Efecto antioxidante

Misra y Rabideau reportaron que la PFD es capaz de secuestrar radicales hidroxilo (OH) y prevenir la peroxidación de lípidos en microsomas de hígado (Misra & Rabideau 2000). En el mismo trabajo no se encontró evidencia de que el fármaco secuestrara especies reactivas de oxígeno —ROS, por sus siglas en inglés— más tóxicas que el OH, tales como el anión superóxido (O_2^-). Sin embargo, posteriormente Mitani y colaboradores reportaron —en un

modelo *in vitro*— que el fármaco sí posee la facultad de secuestrar aniones O_2^- , pero sólo después de asociarse a iones hierro (complejo PFD-Fe, con estequiometría 3:1) (Mitani et al. 2008). Cabe mencionar que la actividad antioxidante es dependiente de la dosis y se presenta en un intervalo de tiempo de segundos a minutos.

También se ha reportado que un tratamiento crónico (~6-8 h) con PFD es capaz de inhibir la expresión de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) a nivel transcripcional en hepatocitos, provocando que tanto los niveles de la expresión proteica de iNOS como del óxido nítrico (NO) disminuyeran. ($EC_{50} \sim 2.12$ mM) El efecto se atribuyó principalmente a que a partir de ~2 h el fármaco impide la activación de NF- κ B, el cual es un factor de transcripción importante para la inducción del gen de iNOS (Nakanishi et al. 2004b; Tsuchiya et al. 2004).

Más recientemente, el grupo de trabajo del mexicano Armendáriz Borunda, en un modelo *in vivo* de cirrosis hepática, demostró que PFD disminuye en ~30% los niveles de nitritos y malonaldehído (producto de la peroxidación lipídica de la membrana plasmática). De hecho, también se reportó que el compuesto inhibe la expresión génica de diversas proteínas implicadas en el estrés oxidativo, entre las que se encontró a la iNOS (Salazar-Montes et al. 2008). Años después, el mismo grupo demostró que en células estelares hepáticas la PFD aumenta (a partir de las 12 h) la expresión de los mRNAs que codifican para diversas proteínas que presentan actividades antioxidantes. Dicho efecto del fármaco se atribuye a que provoca un incremento en la importación del factor transcripcional Nrf2 al núcleo (Macias-Barragan et al. 2014).

De lo anterior queda claro que las acciones antioxidantes de PFD se pueden clasificar en dos: i) la capacidad del fármaco para secuestrar rápidamente (en segundos) ROS y ii) una modulación a largo plazo (en horas) de la expresión de proteínas que a su vez sintetizan óxido nítrico o bien actúan como antioxidante. Dicha modulación de la expresión proteica se debe a cambios en la importación al núcleo de factores de transcripción, tales como NF- κ B y Nrf2.

Efecto antiinflamatorio

El efecto antiinflamatorio de la PFD ha sido ampliamente examinado en diversos modelos de inflamación llevados a cabo en hígado, riñón y pulmón (Avila et al. 2014; Macías-Barragán et al. 2010). La actividad antiinflamatoria se ha estudiado principalmente por el grupo de Hisashi Oku, que tras múltiples experimentos (tanto *in vitro* como *in vivo*) observó que pirfenidona es capaz de disminuir de manera dependiente de la dosis, la expresión de las principales citocinas proinflamatorias como TNF- α , IFN- γ y las interleucinas IL-12, IL-18, IL-1b e IL-6 y además es capaz de aumentar la IL-10 favoreciendo aún más su actividad anti-inflamatoria (Nakazato et al. 2002; Oku et al. 2008; Oku et al. 2002).

Por otra parte, Hirano y colaboradores en un modelo *in vivo*, donde se indujo asma con exposiciones repetidas a un alérgeno, demostró que PFD disminuye la infiltración de eosinófilos y linfocitos en los bronquios dañados, además disminuyó la expresión de las interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13, que son interleucinas que favorecen la aparición de la fase aguda de la inflamación (Hirano et al. 2006).

Las acciones mostradas por la PFD en las diversas citosinas inflamatorias impulsaron a diversos grupos de trabajo a realizar experimentos de trasplante de órganos en animales, donde el fármaco mostró resultados alentadores en dicho procedimiento, ya que fue capaz de inhibir la proliferación de neutrófilos, linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ e inhibir múltiples citosinas implicadas en el daño inmunológico como: IL- β 1, IL-4, IL-5, IL-17, mejorando de esa manera la tolerancia al trasplante (Dosanjh et al. 2002; Liu et al. 2005; Zhou et al. 2005; Visner et al. 2012).

Efecto antifibrótico

Con el avance de la ciencia, se comenzó a comprender que el estrés oxidativo y la inflamación generan un daño celular que precede al desarrollo de la fibrosis (cuando el proceso de reparación no es el adecuado) (Nakazato et al. 2002), por lo anterior surgió la hipótesis de que algunos anti-inflamatorios podrían usarse para tratar la fibrosis. Y con esto en mente, Margolin en 1994 patentó la acción antifibrotica de la PFD (Margolin 1994). Actualmente, el efecto

antifibrótico de la PFD es por mucho el más estudiado (con respecto a las dos actividades previamente mencionadas) ya que se ha documentado en una gran variedad de modelos *in vitro* e *in vivo* de fibrosis.

De forma resumida, los resultados han indicado que el fármaco no solo es capaz de prevenir la fibrosis sino que también es capaz de revertirla en pulmón (Iyer et al. 1999a; Iyer et al. 1999b), hígado (Di Sario et al. 2002; Di Sario et al. 2004), riñones (RamachandraRao et al. 2009; Brook et al. 2005) y corazón (Mirkovic et al. 2002; Van Erp et al. 2006). A grandes rasgos, la mayoría de estos estudios atribuyó la actividad antifibrótica de la PFD a su capacidad de inhibir la expresión del TGF- β 1 a nivel transcripcional, el cual como ya se mencionó es una de las citosinas profibrogénicas por excelencia.

Es en el tejido pulmonar y a nivel clínico donde más se ha investigado la capacidad de PFD para combatir la fibrosis. Eso ha llevado a que actualmente ya se comercializa un medicamento casi a nivel mundial para tratar la fibrosis pulmonar idiopática (FPI). La cual, se caracteriza por un aumento en la producción de diversas citosinas y factores de crecimiento (causado por un estímulo aún desconocido), implicados en la activación y proliferación de fibroblastos, lo que ocasiona una deposición excesiva de la ECM, que eventualmente conduce a la destrucción progresiva del epitelio alveolar y posteriormente a la destrucción del tejido pulmonar (Schaefer et al. 2011).

Efectos secundarios de pirfenidona

Al igual que todos los fármacos, este también puede generar efectos secundarios, (aunque no todas las personas los sufren). Los efectos secundarios más comunes provocados por PFD son: náuseas, diarrea, indigestión, cansancio, fotosensibilidad, dolor torácico (no asociado a patologías cardíacas), elevación de enzimas hepáticas, alteraciones de sueño e infecciones en la garganta. De forma menos frecuente se presenta: dificultad para respirar e hinchazón de rostro, labios y/o lengua (Carter 2011).

ANTECEDENTES

En esta sección se exponen evidencias experimentales que relacionan a la pirfenidona con acciones electrofisiológicas, lo cual es de sumo interés, ya que como se mencionó anteriormente los daños crónicos al corazón generan remodelación estructural y eléctrica, lo que conlleva a alteraciones crónicas o descompensadas.

Efectos de la pirfenidona en la función cardíaca

Los pioneros en extrapolar la acción antifibrótica de pirfenidona hacia un agente antiarrítmico fue el grupo de Jeffrey Olgin, del cual en seguida se describen brevemente dos trabajos. En el 2006 dicho grupo (Lee et al. 2006), generó un modelo de remodelación estructural y eléctrico auricular, trabajando en un modelo canino de insuficiencia cardíaca inducida por taquicardia ventricular. Las alteraciones auriculares consistieron en un incremento en los niveles de expresión de la citocina TGF- β 1 (*Fig. 8A*), mayor índice de fibrosis (*Fig. 8B y C*) y un aumento en la vulnerabilidad a desarrollar FA (*Fig. 8D*). Interesantemente, cuando a los perros se les administró PFD por vía oral (800 mg tres veces al día) durante la inducción de la insuficiencia cardíaca, se encontró que dicho tratamiento inhibe prácticamente por completo el desarrollo de los marcadores de remodelación ya mencionados (*Fig. 8*). Todos los efectos se atribuyeron a su actividad antifibrótica del fármaco.

El segundo trabajo en el que ahondaremos se publicó en el 2010. En éste se indujo infarto al miocardio a ratas, mediante una obstrucción de 20 min de las arterias coronarias. Una semana después del procedimiento quirúrgico, las ratas se dividieron en dos grupos y sólo a uno de ellos se le administró la PFD (1.2% p/p en el alimento) durante las 4 semanas subsiguientes (Nguyen et al. 2010). Al final del tratamiento se evaluó la función y estructura ventricular. Los resultados indicaron que el grupo tratado con pirfenidona presenta una menor probabilidad de desarrollar taquicardia ventricular, menor tamaño del área de infarto y menos fibrosis (*Fig. 9A, B, y C respectivamente*). También se observó una mayor velocidad de conducción eléctrica en el borde de las lesiones (*Fig. 9D*) y un mayor porcentaje de sangre que expulsa el ventrículo izquierdo (*Fig. 9E*).

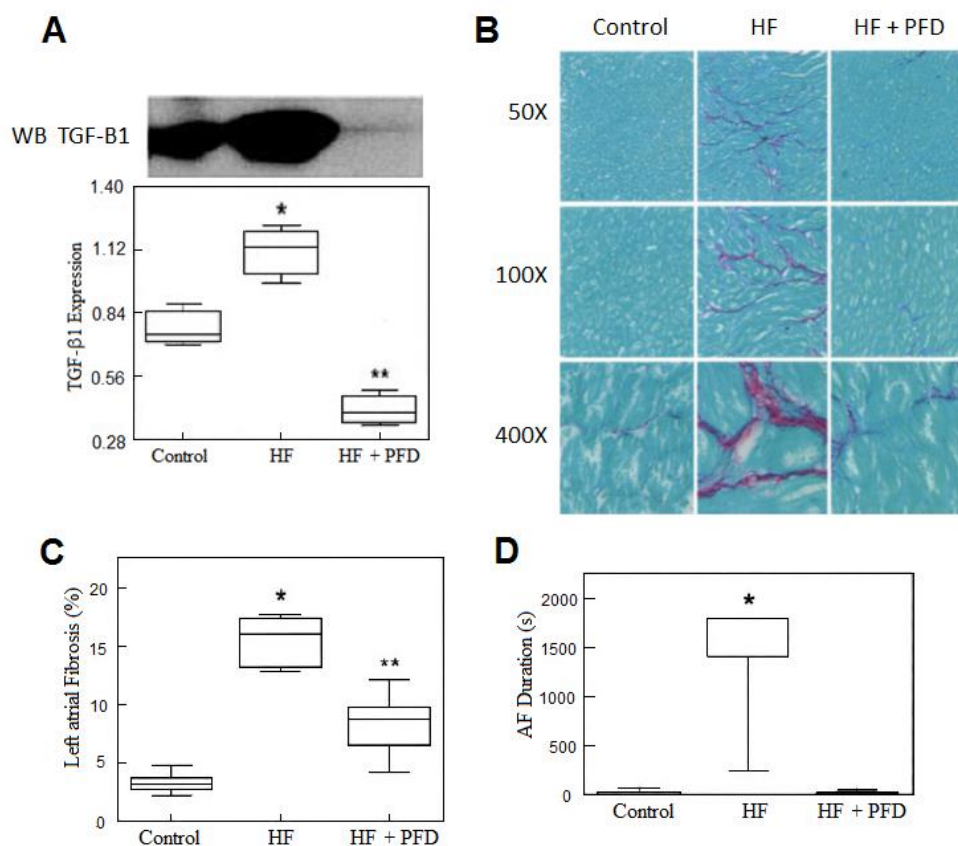


Figura 8. Efectos benéficos de pirfenidona en un modelo canino de insuficiencia cardiaca. Se estudiaron 3 grupos de perros (raza mongrel, con peso de 25 a 32 Kg): control, insuficiencia cardiaca (HF) y el grupo donde además de inducir la insuficiencia cardiaca se administró pirfenidona (HF+PFD). La insuficiencia cardiaca se indujo mediante taquicardia ventricular (tres semanas), y la pirfenidona se administró de forma oral durante la inducción de la insuficiencia cardiaca (800 mg tres veces al día). (A) Estimación de los niveles de TGF-β1 que fueron obtenidos a partir de inmunoblots como el que se muestra en la parte superior; (B) Cortes histológicos de aurícula izquierda que fueron teñidos con “rojo de Sirius”, obsérvense de color rojo los cúmulos de colágena; (C) Niveles de fibrosis que fueron estimados digitalmente a partir de imágenes como las que se observan en A; D) Duración de los episodios de fibrilación auricular (AF) que se lograron inducir mediante ráfagas de sobre-estimulación eléctrica auricular. Datos tomados de Lee et al. 2006.

Tomando en conjunto los resultados descritos en estas dos publicaciones, queda claro que PFD optimiza la función cardiaca y por lo tanto podría desempeñar un papel importante en el tratamiento de arritmias, al menos en parte debido a que inhibe el desarrollo de alteraciones estructurales debidas a procesos fibróticos.

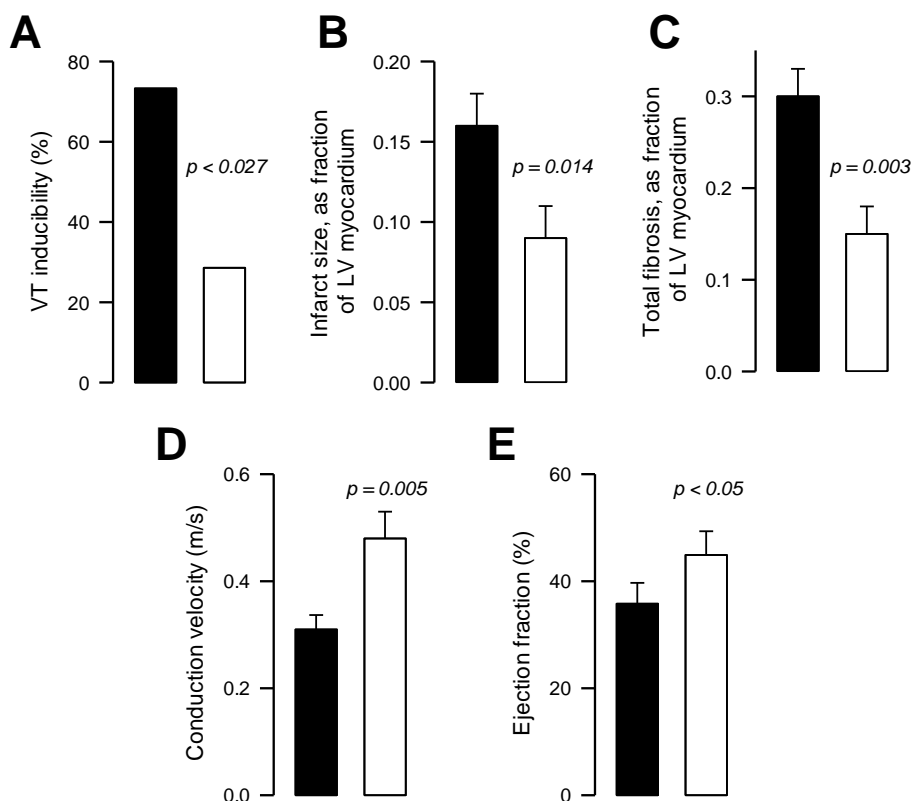


Figura 9. Efectos de pirfenidona en un modelo animal de infarto al miocardio. A los animales se les indujo un infarto mediante la obstrucción de las arterias coronarias por 20 min. Una semana después, las ratas se dividieron en dos grupos: aquellas a las que se les administraría pirfenidona (1.2 % en dieta) durante las 4 semanas posteriores al procedimiento quirúrgico (infarto + pirfenidona, barras blancas) y aquellas que no recibirían tratamiento (grupo infarto, barras negras). (A) Porcentaje de animales en los que se presentó taquicardia ventricular. (B) y (C) muestran el tamaño relativo de las áreas con infarto y niveles de fibrosis, respectivamente, ambos estimados a partir del análisis digital de imágenes de cortes histológicos de tejido ventricular (teñidos con rojo de Sirius y fast green). (D) Velocidad de conducción eléctrica en el borde de las áreas de infarto, el estímulo eléctrico tenía una duración de 130 ms. (E) Porcentaje de sangre que expulsa el ventrículo izquierdo, estimado mediante ecografía. Barras negras infarto, barras blancas infarto + pirfenidona. *Datos tomados de Nguyen et al., 2010.*

Efectos de pirfenidona en las propiedades electrofisiológicas de cardiomiocitos.

En nuestro laboratorio estamos interesados en investigar posibles acciones de PFD a nivel de la fisiología celular. Para ello, Ramos-Mondragón y colaboradores, mediante experimentos de fijación de voltaje realizados en miocitos auriculares aislados de rata adulta, evidenciaron que un tratamiento crónico con PFD (1-2 días) estimula canales de calcio tipo L sin modificar a canales de Ca^{2+} tipo T (Fig. 10A). De hecho, el efecto en canales L también se observa en miocitos ventriculares, tal como se representa en el curso temporal mostrado en la Fig 10B.

Como podremos observar, el efecto de PFD en cardiomiocitos ventriculares se evidencia a partir de 10 h de iniciado el tratamiento, y tiende a alcanzar un valor máximo entre las 20 h y 36 h. El lento curso temporal sugiere que el fármaco ejerce sus efectos a través de modificar la expresión proteica. Sin embargo, como se verá más adelante, sorprendentemente el fármaco no modifica la expresión de $Ca_v1.2$. Por lo tanto, es posible que el efecto se deba a cambios en la expresión de alguna otra proteína que a su vez regule la actividad del canal (Ramos-Mondragón et al. 2012).

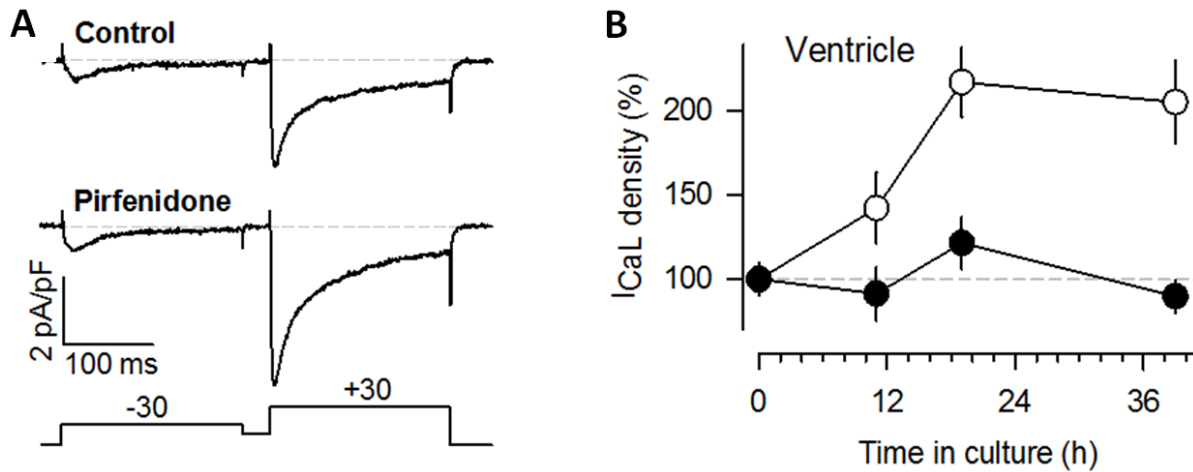


Figura 10. Pirfenidona regula canales de Ca^{2+} tipo L en miocitos de rata adulta. (A) Trazos representativos de corrientes de Ca^{2+} tipo T y tipo L —evocadas a -30 mV y +30 mV, respectivamente— que fueron registradas en miocitos auriculares cultivados en ausencia (Control) o presencia de pirfenidona (Pirfenidone). Nótese que pirfenidona solamente incrementa la corriente tipo L (i.e. a +30 mV). (B) Curso temporal del incremento en la densidad de corriente de Ca^{2+} tipo L (I_{CaL}) inducido por pirfenidona en miocitos ventriculares. La I_{CaL} se estimó a +20 mV, partiendo de potencial de mantenimiento de -50 mV. Los miocitos fueron cultivados en ausencia (círculos blancos) o presencia (círculos negros) de pirfenidona, durante los periodos de tiempo indicados. Los registros se hicieron a temperatura ambiente, en presencia de una solución salina libre de pirfenidona. *Datos tomados de Ramos-Mondragón. et al., 2012.*

Por otra parte, debido a que en miocitos auriculares de rata neonata, el TGF- β inhibe la expresión del $Ca_v1.2$ (Avila et al. 2007) y a que la PFD inhibe la expresión del TGF- β en tejido auricular (Fig. 8A), Ramos-Mondragón y colaboradores, se aventuraron a investigar si el TGF- β 1 podría estar involucrado en el efecto estimulador del fármaco en los canales L de los miocitos auriculares de rata adulta.

Los resultados indicaron que en miocitos auriculares de rata adulta el TGF- β 1 no modifica ni los niveles basales de I_{CaL} ni el aumento producido por pirfenidona (Fig. 11, izq). Una posible explicación para esa ausencia de efectos era que los canales L se encontraran inhibidos por TGF- β 1 endógeno, por lo que se empleó un inhibidor del receptor de esa citosina (SB431542). Sin embargo, el inhibidor no logró mimetizar el efecto de la PFD (Fig. 11, der.). Por lo que se puede concluir que pirfenidona estimula a los LTCC por una vía de señalización independiente del TGF- β 1 (Ramos-Mondragón et al. 2012).

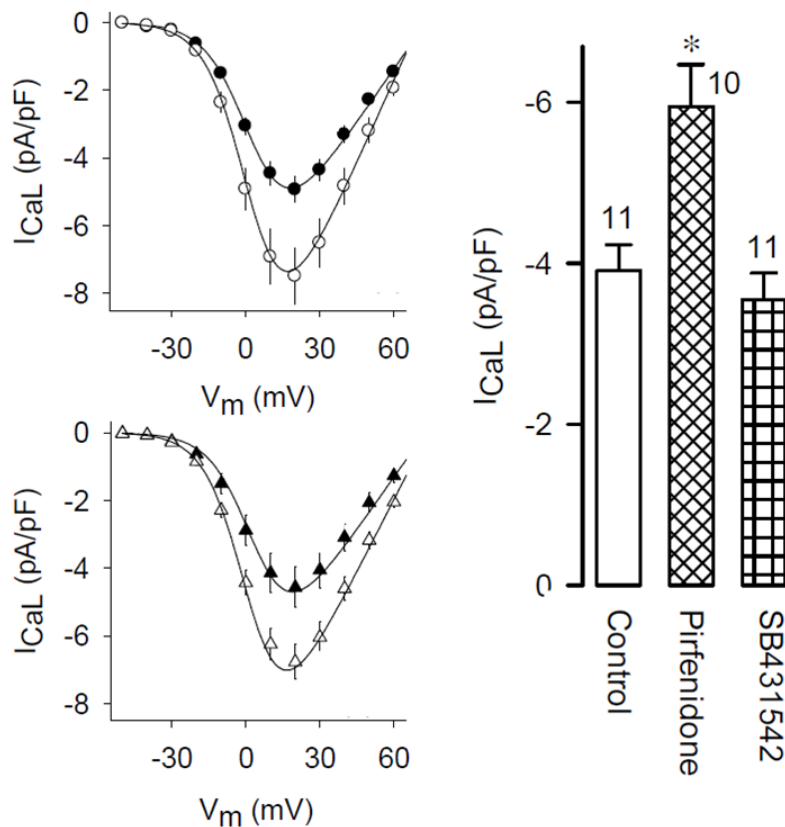


Figura 11. La vía de señalización del TGF- β 1 no participa en la modulación de canales de Ca^{2+} tipo L por PFD. A la izquierda se muestran curvas I-V de I_{CaL} que fueron obtenidas en miocitos auriculares de rata adulta mantenidos 1-2 días en condiciones control (círculos negros, n=18), o en presencia de ya sea TGF- β 1 (triángulos negros, n=24), pirfenidona (círculos blancos n=22) o pirfenidona más TGF- β 1 (triángulos blancos, n=23). La gráfica de barras de la derecha, indica la densidad de I_{CaL} en miocitos auriculares que se mantuvieron 1-2 días en condiciones control o presencia de ya sea pirfenidona o un inhibidor del receptor de TGF- β 1 (SB431542). *Datos tomados de Ramos-Mondragón et al., 2012.*

Como se mencionó anteriormente, PFD no modifica la expresión de $Ca_v1.2$. Pero ¿cuáles son las evidencias experimentales que llevaron a esa conclusión? Los niveles de $Ca_v1.2$ se analizaron midiendo el respectivo movimiento de carga intramembranal (asociado al sensor de voltaje), mRNA y proteína. En la *Fig. 12*, se muestran western-blots y sus respectivo análisis densitométrico, donde se determinaron los niveles de $Ca_v1.2$ en miocitos auriculares y ventriculares (*Fig. 12A y B*, respectivamente). Tal como se puede apreciar, los tratamientos con PFD no modifican los niveles de $Ca_v1.2$. El hecho que PFD aumente I_{CaL} sin que se presenten cambios en los niveles de expresión de $Ca_v1.2$ sugiere que el compuesto incrementa la probabilidad de apertura de esos canales.

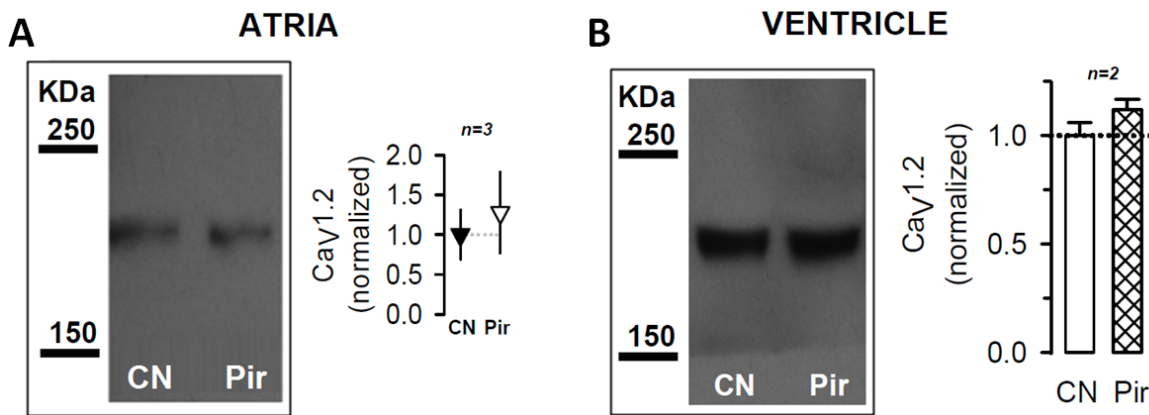


Figura 12. Niveles proteicos de $Ca_v1.2$ en miocitos auriculares y ventriculares de rata adulta. A la izquierda de (A) y (B) se muestran fotografías de *western-blots*, donde se tiñeron las bandas que corresponden a $Ca_v1.2$, en miocitos control (CN) y tratados con pirfenidona (Pir). Las muestras de proteína (15 μ g) fueron procesadas en un gel de electroforesis de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAG), posteriormente se realizó un análisis de densitometría y se promediaron los resultados. A la derecha de (A) y (B) se gráfica la media \pm el error estándar de las mediciones indicadas en cada gráfica. La intensidad de las bandas se normalizó por el espectro de proteínas totales detectadas por azul de Coomassie. Finalmente, las unidades arbitrarias obtenidas se normalizaron por la media calculada en células control. *Datos tomados de Ramos-Mondragón et al., 2012.*

Adicionalmente, mediante diversos experimentos farmacológicos, se encontraron evidencias de que el AMPc, PKA y una sintetasa de óxido nítrico (NOS) participan en la vía de señalización involucrada. En consecuencia, se plantea que el fármaco inhibe la expresión de la iNOS, tal como se ha reportado en hepatocitos (Tsuchiya et al. 2004; Nakanishi et al. 2004a; Salazar-Montes et al. 2008). Esto a su vez generaría una menor cantidad de NO, lo que podría estar provocando un aumento en los niveles de fosforilación de $Ca_v1.2$ por PKA (Ramos-Mondragón et al. 2012).

En el trabajo de Ramos-Mondragón y colaboradores, se evidenció que la PFD estimula los LTCCs, pero la pregunta ahora era ¿cumple alguna función la corriente entrante adicional de Ca^{2+} a la célula, en el proceso del acople excitación-contracción (ECC)? La respuesta la obtuvo la maestra Osornio, quién investigó la dinámica del Ca^{2+} libre intracelular en miocitos auriculares, mediante registros simultáneos de microfluorometría y de fijación de voltaje (Osornio-Garduño 2013).

Los resultados indicaron que un tratamiento crónico con la PFD (1-2 días) incrementa la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} (Fig. 13A) sin modificar el comportamiento de la ganancia del ECC (Fig. 13B), la cual se obtuvo tras dividir la amplitud de los transitorios entre su respectiva densidad de I_{CaL} . La ausencia de cambio en la ganancia indica que la I_{CaL} adicional entrante en los miocitos auriculares tratados con la PFD tiene el mismo impacto en el proceso de CICR, con relación a la I_{CaL} control.

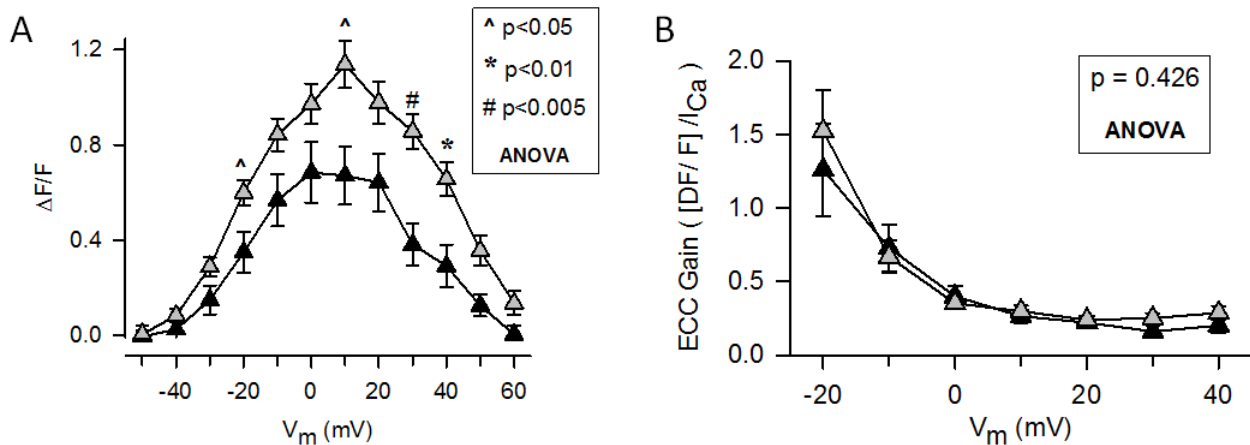


Figura 13. Pirfenidona incrementa los transitorios de Ca^{2+} sin modificar la ganancia del ECC en miocitos auriculares. En (A) se muestra la amplitud promedio de los transitorios de Ca^{2+} que fueron obtenidos simultáneamente con mediciones de I_{CaL} , mediante experimentos de fijación de voltaje. Ese enfoque permite calcular la ganancia del ECC, tal como se ilustra en (B). Células control - triángulos negros (n=11); células tratadas con pirfenidona - triángulos grises (n=17). Datos tomados de Osornio-Garduño, 2013

Adicionalmente, tras ajustar una curva exponencial a la fase de decaimiento de los transitorios de Ca^{2+} y calcular el valor de la constante de tiempo, se evidenció que el fármaco no modifica la velocidad de recaptura de Ca^{2+} al RS por la bomba SERCA (Fig. 14A).

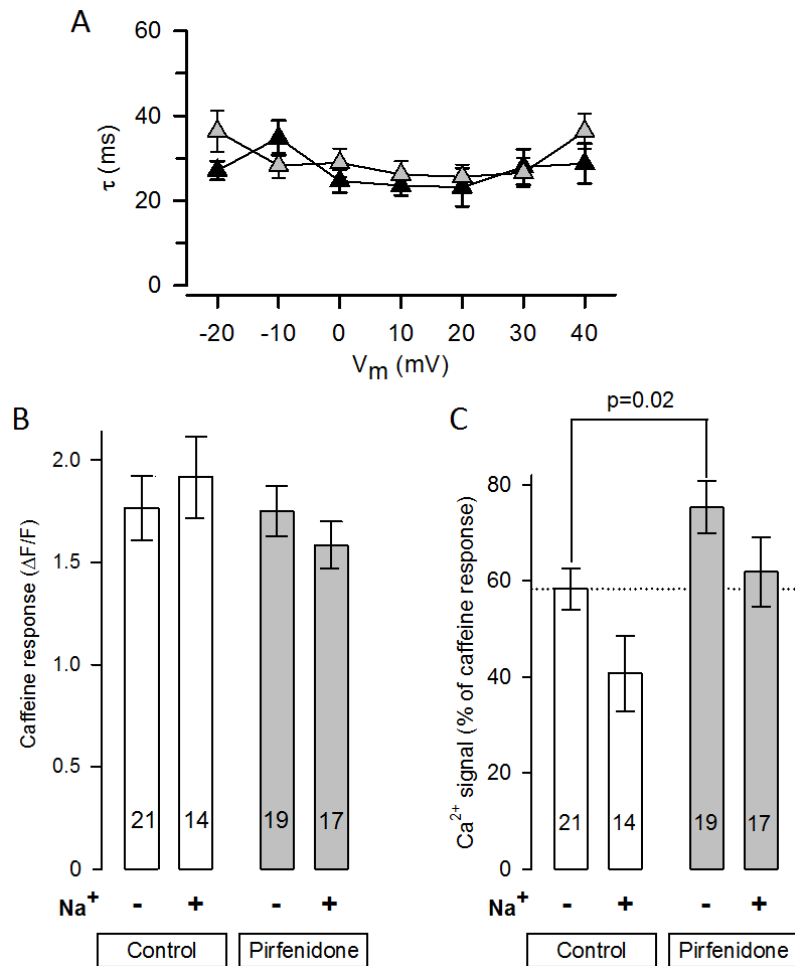


Figura 14. Estimaciones de la actividad de los sistemas que remueven Ca^{2+} del citoplasma, así como del nivel de Ca^{2+} del RS en miocitos auriculares control y pre-tratados 1-2 d con pirfenidona. En A, se estimó la velocidad de recaptura de Ca^{2+} por la bomba SERCA; indirectamente, es decir, mediante el cálculo de la constante de tiempo (τ) de decaimiento del transitorio. Células control - triángulos negros; células tratadas con pirfenidona - triángulos grises. En B se estimó el contenido de Ca^{2+} del RS sensible a cafeína (30 mM), mientras que en C se estimó la capacidad de sistemas lentos de remoción de Ca^{2+} para bajar los niveles de Ca^{2+} previamente elevados por cafeína, tanto en ausencia como en presencia de Na^+ extracelular. Nótese que el fármaco provoca una disminución de la actividad de dichos sistemas, ya que células tratadas los niveles de calcio permanecen elevados respecto al control.

Por otra parte, mediante estímulos con cafeína, tampoco se encontraron diferencias significativas en el nivel de Ca^{2+} del RS disponible para ser liberado, entre los miocitos control y tratados con el fármaco (Fig. 14B).

En contraste, pirfenidona sí inhibió la remoción lenta o secundaria de Ca^{2+} , atribuible tanto a un componente sensible como a uno insensible al Na^+ extracelular (Fig. 14C).

JUSTIFICACIÓN

Datos electrofisiológicos obtenidos en miocitos auriculares contribuyen a explicar por qué la pirfenidona inhibe el desarrollo de la fibrilación auricular.

En contraste, prácticamente no existen datos electrofisiológicos obtenidos en miocitos ventriculares que pudieran explicar la mejor función ventricular que provoca pirfenidona. En particular, consideramos necesario explorar la posibilidad de que en miocitos ventriculares pirfenidona estimule la contractilidad. Dicha posibilidad surge del hecho de que el fármaco incrementa la amplitud de I_{CaL} , la cual es crucial para el AEC. Adicionalmente, consideramos que sería interesante aportar información que ayude a decidir si pirfenidona modifica la sensibilidad de la maquinaria contráctil a la activación por Ca^{2+} .

HIPÓTESIS

Un tratamiento crónico con pirfenidona modula la contractilidad y la homeostasis del Ca^{2+} en miocitos ventriculares

OBJETIVO GENERAL

Investigar si pirfenidona modula las propiedades contráctiles y la dinámica del Ca^{2+} de los miocitos ventriculares.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar en miocitos ventriculares de rata adulta si un tratamiento de 1-2 días con pirfenidona:

1. Efectivamente incrementa la densidad de I_{CaL} .
2. Aumenta la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} evocados por I_{CaL} .
3. Modifica la ganancia del AEC.
4. Provoca cambios en la amplitud y cinética de:
 - A. *Transitorios de Ca^{2+}*
 - B. *Contracción del sarcómero*
 - C. *Contracción celular.*

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo primario de cardiomiocitos ventriculares de rata Wistar adulta.

Los cardiomiocitos fueron obtenidos de rata Wistar macho adulto con una edad promedio de 10 a 11 semanas y con un peso de entre 220 y 260 g, siguiendo el procedimiento previamente descrito por Ramos-Mondragón et al. 2012. Básicamente, lo que se hizo fue anestésiar al roedor con una combinación de clorhidrato de Ketamina-Xilazina (100:10 mg/Kg rata, vía intraperitoneal). Cuando el animal perdió completamente los reflejos, el corazón se retiró rápidamente de la caja torácica y se colocó inmediatamente en una solución tipo Tyrode libre de Ca^{2+} (Solución T) a 4 °C cuya composición es (en mM): NaCl 130, KCl 5.4, MgCl_2 0.5, HEPES 25, EGTA 0.2 mM, NaH_2PO_4 0.3, glucosa 22, lactato 1, ácido pirúvico 3, pH = 7.4. Posteriormente, el corazón fue canulado a través de la arteria aorta, con la finalidad de conectar el órgano a un sistema de perfusión de Langendorff, el cual se calibró para perfundir soluciones de manera retrograda a una temperatura de 37 °C.

Una vez canulado el corazón, se perfundió con solución T, durante ~5 minutos, lo que permitió la eliminación de sangre y la depleción del calcio extracelular. Subsecuentemente, el corazón se perfundió durante ~15 min con solución T suplementada con colagenasa tipo II (1.5 mg/mL) y proteasa XIV (40 µg/mL), con la finalidad de llevar a cabo la digestión enzimática de la matriz extracelular.

Una vez que el corazón se tornó ligeramente pálido y perdió su firmeza, se disecaron ambos ventrículos mediante un corte justo por debajo del surco coronario y se maceraron suavemente con una pipeta siliconada de boca ancha, permitiendo obtener células aisladas, las cuales se incubaron durante 60 minutos en tres diferentes soluciones T (20 min c/incubación) con concentraciones crecientes de Ca^{2+} (en µM): 83, 250 y 500 , suplementadas con BSA: 17 mg/ml, 10 mg/ml y 10 mg/ml respectivamente. La idea es reintroducir gradualmente el Ca^{2+} , lo que atenúa el daño celular.

Bajo condiciones de esterilidad, las células fueron sembradas sobre cubreobjetos de vidrio pretratados con laminina (0.1mg/mL). Las dimensiones de los cubreobjetos fueron de 25x25 mm para experimentos de contractilidad y de 7x7 mm para experimentos de fijación de voltaje. Dichos cubreobjetos se colocaron en cajas Petri de 100 mm o 35 mm de diámetro, respectivamente. Tras esperar 10 min se adicionó medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de FBS, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Las células fueron incubadas durante 2 h a 37 °C y en presencia de una atmosfera saturada de humedad y con 5% de CO₂. Una vez transcurridas las 2 h de incubación, el medio se reemplazó por medio DMEM con una composición similar al anterior, salvo que estaba suplementado con 10% de FBS inactivado por calor (56°C por 30 minutos).

Tratamiento

Las células fueron cultivadas durante 1 ó 2 días en ausencia (control) o presencia de pirfenidona 1 mM (SIGMA-ALDRICH, catálogo: 53179-13-8, lote 112M4608V), la cual fue agregada inmediatamente tras el cambio a medio DMEM suplementado con 10% de FBS inactivado (tiempo 0). A esa concentración el fármaco ejerce su mayor efecto en la I_{CaL} (Ramos-Mondragón et al. 2012). DMSO fue utilizado como vehículo para disolver a la pirfenidona. Previamente se demostró que este vehículo no afecta a I_{CaL} (Ramos-Mondragón et al. 2012).

Experimentos de contractilidad y transitorios de Ca²⁺

Se registraron propiedades contráctiles y transitorios de Ca²⁺ de forma simultánea, usando un sistema de grabación de contractilidad y fluorescencia (IonOptix, Co., Milton, EUA). La velocidad de muestreo fue 250 Hz y 1 KHz, para la contractilidad y fluorescencia respectivamente. Para obtener los registros, las células se incubaron a temperatura ambiente con la forma pentaacetoximetil ester (AM) del fluoróforo de cociente Fura-2 (6 µM, Fura-2 AM) durante 15 min en solución Tyrode suplementada con 2 mM de Ca²⁺ y 10 mM de glucosa. Subsecuentemente se realizó un lavado de 10 min, en la misma solución pero carente de Fura-2AM, con la finalidad de retirar el exceso de fluoróforo y permitir la desesterificación. Una vez

finalizado el lavado, las células se transfirieron a una cámara de registro (FHD, IonOptix) y se agregaron 600 μL de solución Tyrode con 2 mM de Ca^{2+} . La cámara se montó en un microscopio invertido (Motic AE31). Posteriormente, las células fueron transiluminadas con luz roja (para evitar la interferencia con la medición de epifluorescencia del Fura 2-AM) y visualizadas con un objetivo 40X/0.95.

Las propiedades contráctiles de las células se evaluaron mediante un sistema de video de detección de límite (IonOptix). Para ello, el miocito a ser estudiado se visualizó en la computadora usando una cámara digital de campo variable (Myocam-S, IonOptix), que escanea el área a 380 Hz. Subsecuentemente, la imagen se centró y se alineó horizontalmente con la ayuda de un adaptador (CFA300, IonOptix). La longitud celular se obtuvo tras ajustar líneas de referencia para el análisis de video digital, tanto en el extremo izquierdo como derecho del miocito (donde el contraste era el óptimo). Una vez ubicados los límites celulares el sistema calcula los cambios dinámicos en la longitud celular, mediante un software denominado SoftEdge (Ionoptix).

Para cada célula, la longitud promedio de sus sarcómeros se obtuvo utilizando un software llamado SarcLen (Ionoptix), que tras promediar la periodicidad de las bandas A e I del sarcómero (determinadas por el cambio de contraste debido al patrón estriado de los sarcómeros), dentro de un área definida por el usuario (ROI, por sus siglas en inglés), realiza una transformada rápida de Fourier. Ese enfoque permite resolver cambios de 10-20 nm en la longitud del sarcómero. Una vez identificados los límites celulares, y establecida la ROI, las células se estimularon durante 75 s con una intensidad de 20 V, a una frecuencia de 0.2 Hz (cada pulso con una duración de 20 ms). Dichos estímulos eléctricos se aplicaron mediante cables de platino ubicados en la cámara de registro, los cuales se conectaron a un estimulador (MyoPacer, IonOptix), estando el último conectado a una interfase (FSI700, IonOptix) que sincroniza los estímulos eléctricos con la señal digital visualizada en la computadora.

Para registrar transitorios de Ca^{2+} se empleó un sistema de epifluorescencia de doble excitación (μStep , IonOptix) acoplado al microscopio invertido ya mencionado. Dicho sistema excitó al Fura-2 con un haz de luz generado por una lámpara de Xenón de 75 W, que pasó a través de filtros de 360 nm y 380 nm. La longitud de excitación de 360 nm (punto isobéptico de Fura-2)

únicamente se utilizó por periodos breves de 500 ms, al inicio y al final del protocolo de estimulación. Durante el tiempo restante, el fluoróforo se excitó a 380 nm ya que a esa longitud de onda la fluorescencia de emisión depende de la $[Ca^{2+}]_i$. La fluorescencia de emisión (tanto de 360 nm como de 380 nm), se filtró a 510 ± 20 nm, antes de ser detectada por un tubo fotomultiplicador (PMT400, IonOptix) el cual fue controlado por una interfase o convertidor analógico-digital (FSI700, IonOptix). Los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ se reportan como el cociente de fluorescencia entre las longitudes de onda que se utilizaron para excitar al fluoróforo (F_{360}/F_{380}).

Cabe mencionar que las mediciones sólo se llevaron a cabo en miocitos que presentaron las siguientes características morfológicas: sin ampollas, con bordes y estrías bien definidos, y sin contracciones espontáneas.

El análisis de los datos se llevó a cabo mediante el programa IonWizard 6.4 (IonOptix). Una vez iniciado el protocolo de estimulación, para cada célula se promediaron los trazos correspondientes al periodo del tercero al séptimo estímulo. Posteriormente a partir de dicho promedio se estimaron varios parámetros (cinéticos y magnitudes de diástole y sístole) mediante un ajuste a una función teórica. Los parámetros estimados para la contracción celular y del sarcómero fueron: longitud diastólica y sistólica, porcentaje máximo de acortamiento con respecto a la longitud diastólica, tiempo al pico (tiempo al que se alcanzó el máximo acortamiento), velocidad máxima de contracción y de relajación (las cuales son definidas como la pendiente máxima de la fase de contracción y relajación), así como duración al 50% de la contracción, que se obtuvo mediante la diferencia del tiempo al 50% de la relajación y el tiempo al 50% de la contracción (*Fig. 15A*). Los parámetros evaluados para el transitorio de calcio fueron los siguientes: niveles de Ca^{2+} diastólico y sistólico, amplitud del transitorio, tiempo al pico (tiempo al cual se alcanza el máximo nivel de Ca^{2+}), velocidad máxima de crecimiento y decrecimiento del transitorio (definidas como las pendientes máximas de signo positivo y negativo, respectivamente) y la duración al 50% del transitorio (es la diferencia del tiempo al 50% de crecimiento respecto al 50% de decrecimiento, *Fig. 15B*).

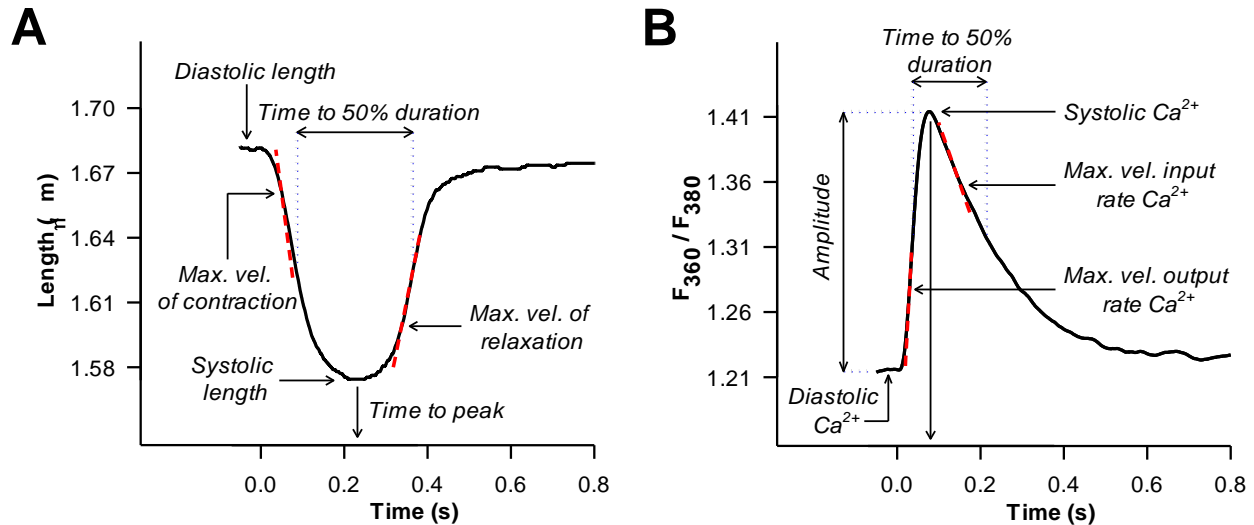


Figura 15. Ejemplo de parámetros obtenidos a partir de trazos de contractilidad y transitorios de Ca^{2+} utilizando el software *Ion Wizard 6.4*. A, B) Comportamiento representativo de acortamiento celular (A) y transitorio de Ca^{2+} (B). Ambas imágenes A y B se construyeron a partir de los mismos datos que se muestran en la siguiente figura (Fig. 16)

Experimentos de fijación de voltaje

La actividad de los canales iónicos se investigó mediante experimentos de fijación de voltaje, utilizando la técnica de “patch-clamp” en su modalidad de célula completa. En dichos experimentos, se pretende conocer a V_m en función del tiempo, mientras se registra la corriente iónica que fluye a través de la membrana (I_m) a un voltaje determinado. Esto se logra con un circuito de retroalimentación que mide constantemente V_m e inyecta corriente a la célula a través de un electrodo, manteniendo el voltaje de membrana fijo, aplicando lo que se conoce como voltaje comando (V_c). La corriente inyectada es proporcional a la diferencia de $V_m - V_c$, evitando de esa manera que I_m interfiera sobre V_m y su retroalimentación.

El nivel de V_c es proporcionado por un amplificador (Axopatch 200B) el cual está controlado por una computadora que se comunica con el amplificador a través de una interface (Digidata 1322) que convierte las señales analógicas a digitales y viceversa. En la computadora y en un osciloscopio se reciben las señales de salida del amplificador, es decir I_m y la señal de fluorescencia (véase la siguiente sección, *Registros de transitorios de calcio*).

El material de los electrodos que utilizamos es borosilicato (tubo capilar de KIMAX, 0.8-1.1x100 mm, catálogo 34502) y la resistencia eléctrica que presentaron fue de 4-6 M Ω . La composición de las soluciones de registro internas y externas se describe más adelante.

El día del experimento se transfirió un cubreobjetos con células de 7X7 mm a una caja de registro (C-Stim, Cell MicroControls) con solución externa control. Los electrodos fueron llenados con una solución interna y montados a un electrodo de plata clorurado conectado al amplificador y a un micromanipulador que nos permitió acercar el electrodo lentamente a una célula aislada (que poseía las mismas características morfológicas a las descritas en la sección anterior). Cuando el electrodo tocó la célula se aplicó presión negativa para formar un sello de alta resistencia (giga sello, >1 G Ω) y alcanzar el estado conocido como *cell-attached*. Después se mantuvo V_m a -80 mV y se aplicó un pulso hiperpolarizante que llevó V_m a -90 mV durante 30 ms, lo que nos permitió estimar la corriente capacitiva del electrodo y otras corrientes capacitivas (parásitas). Posteriormente se aplicó nuevamente presión negativa hasta romper el parche de membrana bajo el electrodo y acceder a la célula (estado *whole-cell*). En este punto se repitió el pulso hiperpolarizante, que ahora nos da información sobre las corrientes capacitivas totales, incluyendo la correspondiente al sarcolema. La diferencia de corrientes capacitivas totales menos las de *cell-attached* se integró y se dividió por el cambio de voltaje (-10 mV). El valor resultante es la capacitancia membranal o C_m .

La I_{CaL} se registró mediante la aplicación de pulsos breves de voltaje, con una duración de 100 ms. Dichos pulsos se aplicaron a partir de un potencial de mantenimiento de -50 mV. Este voltaje contribuye a garantizar que se haya eliminado cualquier contribución de I_{CaT} (Hirano et al. 1989) e I_{Na} (Bean & Rios 1989), en el remoto caso de que pirfenidona induzca expresión de canales T y haya quedado Na^+ contaminante en la solución externa. El software Clampfit 10.2 (Axon) se utilizó para cuantificar el valor máximo de I_{CaL} (valor al pico) a diferentes valores de V_m y en cada célula. Posteriormente, el valor de I_{CaL} se normalizó por su respectiva C_m , obteniendo la densidad de corriente (expresada en pA/pF). Los valores se promediaron y graficaron en función del voltaje (curvas corriente-voltaje o I-V).

Finalmente, las curvas I-V se ajustaron conforme a la siguiente ecuación tipo Boltzmann:

$$I = G_{\max} (V_m - V_{\text{rev}}) / \{1 + \exp [(V_{G1/2} - V_m) / K_G]\} \quad (1)$$

Donde G_{\max} representa la conductancia máxima macroscópica de los canales de calcio tipo L, V_m es el potencial de membrana durante el pulso de prueba, V_{rev} es el potencial de inversión extrapolado de la corriente, $V_{G1/2}$ es el voltaje al cual se obtiene el 50 % de G_{\max} y K_G es un factor que determina el grado de inclinación de la pendiente negativa de las curvas.

Registros de transitorios de calcio

En todas las células investigadas se registró simultáneamente I_{CaL} y la intensidad de fluorescencia de un fluoróforo sensible a Ca^{2+} , mediante la técnica de *patch-clamp* descrita en la sección anterior. El fluoróforo que utilizamos fue la sal de pentapotasio de Fluo-4 (Fluo-4 k_5). Este es impermeable a la membrana, por lo que se incorporó a la célula mediante la solución interna contenida en la micropipeta de *patch-clamp*. El fluoróforo se excitó usando una lámpara de mercurio de 100 W, un filtro de excitación de 470-490 nm, y un espejo dicróico centrado a 505 nm. La emisión de fluorescencia (F) se registró utilizando un filtro de 515-550 nm, así como un fotomultiplicador Hamamatsu (R1527P).

Los transitorios de Ca^{2+} fueron calculados conforme a la siguiente ecuación:

$$\Delta F/F = (F_{(t)} - F_b) / F_b \quad (2)$$

Donde $F_{(t)}$ significa el nivel de fluorescencia en función del tiempo, y F_b su basal correspondiente registrada justo antes de la aplicación del pulso de voltaje. La amplitud máxima (o al pico) de los transitorios de calcio se midió durante los pulsos de prueba y se graficó en función de V_m .

Para calcular lo que se conoce como la ganancia del acople excitación-contracción, en cada célula investigada se dividió la amplitud del transitorio de Ca^{2+} por su respectiva densidad de corriente de Ca^{2+} . Finalmente, la ganancia se graficó en función del voltaje.

Soluciones de registro

Las mediciones simultáneas de I_{CaL} y transitorios de Ca^{2+} se llevaron a cabo en presencia de la siguiente solución externa control (en mM): Ácido metasulfónico 116, HEPES ácido 8.3, $CaCl_2$ 10, $MgSO_4$ 1.7, 4-Aminopiridina 4.2, antraceno 9-carboxílico 0.8, 2,3-Butanediona monoxima 1.8, TEA-OH 136, NaCl 8.3, KCl 0.8, 2-aminoetoxidifenil borato 8.3, Creatina 20.8 y glucosa 10, pH 7.4. La osmolaridad fue de ~ 306 mOsm/kg.

La solución interna que utilizamos contenía (en mM): Cs-Asp 161, TEA-Cl 25, Cs-Cl 11, EGTA-Cs 6.5, $CaCl_2$ 1.3, MgCl 1.25, HEPES 11, GTP-TRIS 0.06, ATP-Mg 5.5, GTP- Na_2 0.05, Fluo-4 K_5 0.05 y glucosa 8; pH 7.3 y ~ 276 mOsm/kg de osmolaridad.

Análisis estadístico

Los datos derivados de experimentos de patch-clamp se muestran como la media \pm el error estándar, excepto por los trazos representativos de I_{CaL} y transitorios de Ca^{2+} . Éstos se obtuvieron de 15 células control y 17 tratadas con pirfenidona. Por su parte, los resultados de mediciones simultáneas de calcio y contractilidad se obtuvieron del número de experimentos que se ilustran en la tabla 1. La comparación estadística consistió en aplicar pruebas de t de Student para muestras no pareadas, excepto para la ganancia del ECC en cuyo caso se utilizó análisis de varianza (ANOVA).

Tabla 1. Número total de experimentos a partir de los cuales se obtuvieron los parámetros correspondientes a mediciones de transitorios de Ca^{2+} y contractilidad en células intactas; es decir, no sujetas a *patch-clamp*.

	<i>Control</i>	<i>Pirfenidone</i>
<i>Ca²⁺ transients</i>	82	68
<i>Cell length</i>	64	48
<i>Sarcomere length</i>	69	62

RESULTADOS

Registros simultáneos de contractilidad y transitorios de Ca^{2+}

Como se mencionó en los antecedentes, Ramos-Mondragón y colaboradores demostraron, mediante experimentos de fijación de voltaje, que un tratamiento crónico con PFD aumenta la densidad de I_{CaL} en cardiomiocitos ventriculares. Además, datos derivados de diversos experimentos farmacológicos sugirieron que la iNOS, el cAMP y la PKA participan en la regulación de LTCCs (al menos en miocitos de aurícula). Por otra parte, se sabe que tanto la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ como la PKA modulan tanto la amplitud de la contracción como la sensibilidad de la maquinaria contráctil a la activación por Ca^{2+} . Por todo lo anterior, se decidió investigar en primera instancia si un tratamiento crónico con PFD modifica la contractilidad y transitorios de Ca^{2+} en miocitos ventriculares intactos (es decir, no sometidos a *patch-clamp*).

En la *figura 16* se muestran trazos representativos de mediciones simultáneas de contractilidad y transitorios de Ca^{2+} de una célula control. Los paneles de la izquierda ilustran transitorios de Ca^{2+} y las correspondientes contracciones del sarcómero y de la célula. Por su parte, las figuras de la derecha representan el promedio de dichas mediciones. Nótese como la longitud celular y del sarcómero disminuyen después del estímulo eléctrico (simbolizado con líneas rojas en el eje horizontal), mientras que el cociente de fluorescencias emitidas por fura-2 AM (F_{360}/F_{380}) aumenta con el estímulo, indicando un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En los trazos promedio, se puede observar más claramente que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumenta rápidamente tras el estímulo eléctrico, mientras que las longitudes de la célula y del sarcómero disminuyen de manera relativamente más lenta. Lo anterior genera un retardo de ~ 150 ms entre la máxima amplitud de las mediciones de contractilidad y el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (tiempo al pico). Como se discutirá más adelante, eso se debe a que a diferencia de lo que sucede durante la relajación, en el AEC los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la unión de éste a la maquinaria contráctil no se encuentran en equilibrio.

A través del software Ion Wizard 6.4 fue posible obtener numerosos parámetros de cada célula registrada (ver metodología). Sin embargo, en esta sección solo se mostrarán aquellos parámetros que pirfenidona modificó de manera significativa ($p < 0.05$). Los demás parámetros se localizan en el apéndice (*tabla A1*).

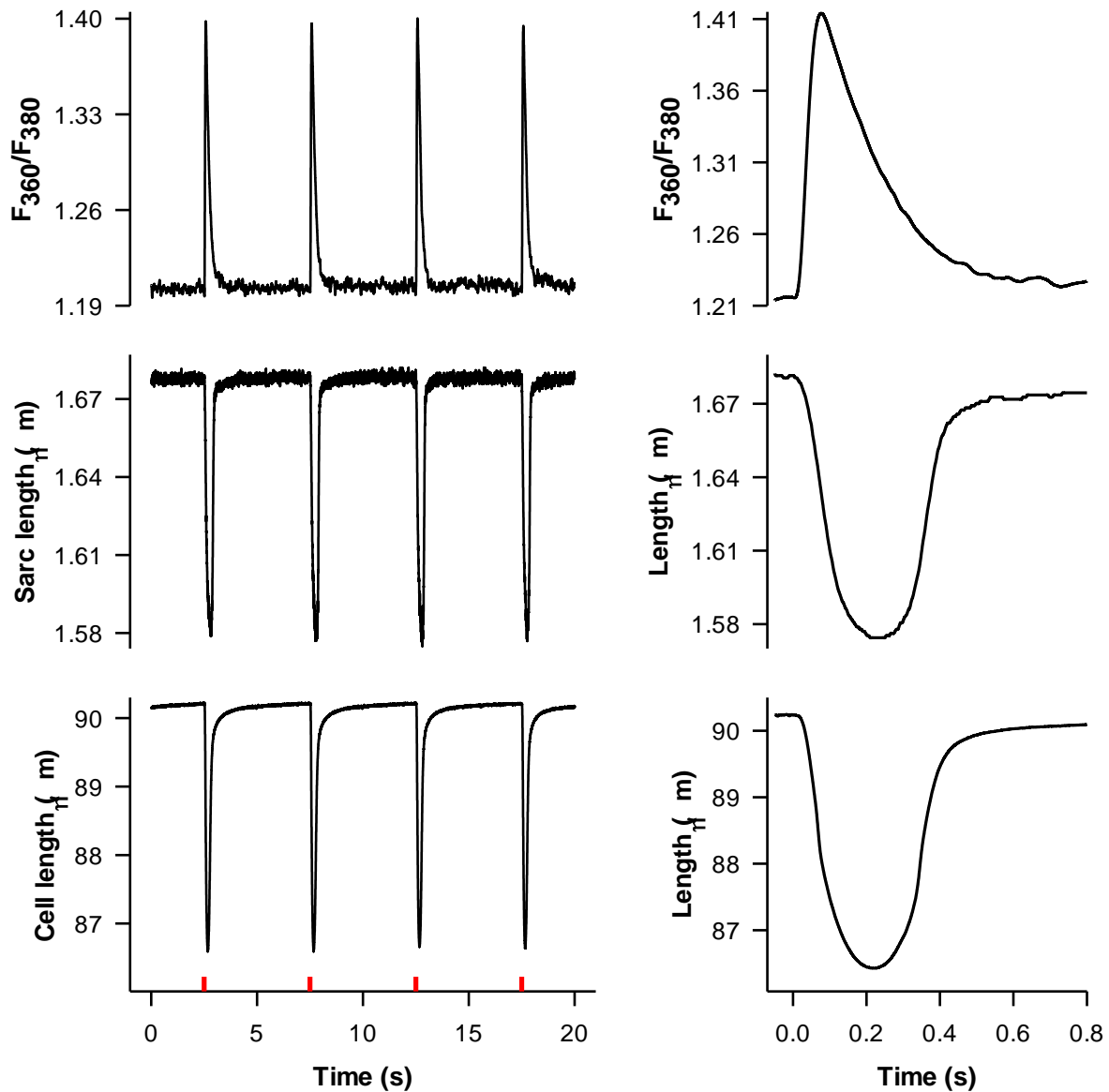


Figura 16. Trazos representativos de transitorios de Ca^{2+} y contractilidad. En la izquierda (de arriba hacia abajo) se muestran transitorios de Ca^{2+} , acortamientos del sarcómero y acortamientos de un cardiomiocito ventricular control. Los episodios fueron inducidos por estimulación eléctrica de campo (líneas rojas en el eje horizontal). A la derecha se muestran los promedios de los trazos mostrados a la izquierda.

Por otra parte, con la finalidad de facilitar la visualización del comportamiento del transitorio de Ca^{2+} y la contractilidad tanto del sarcómero como del miocito, las figuras 17A, 18A y 19A, solamente muestran *la media* de los datos obtenidos de miocitos ventriculares control y tratados con PFD (1-2 días). Las gráficas que contienen los errores estándar, se ubican tanto en el anexo como en los diagramas de fases (Fig. 20).

Pirfenidona incrementa el Ca^{2+} sistólico sin modificar el Ca^{2+} diastólico

En la Fig. 17A se observa una tendencia a que PFD incremente los niveles diastólicos y sistólicos de Ca^{2+} . Sin embargo, solamente el Ca^{2+} sistólico sufrió un cambio significativo (Fig. 17B). Esto sugiere que la potenciación de los LTCCs de los miocitos ventriculares de rata adulta reportada por Ramos-Mondragón y colaboradores (2012) resulta en mayor liberación de Ca^{2+} del RS.

Adicionalmente, en la figura 17 se puede observar que el fármaco aumenta en aproximadamente 13 ms el tiempo al pico del transitorio (Fig. 17A y C). Una interpretación de este resultado es que células tratadas con PFD podrían estar liberando Ca^{2+} por un periodo más prolongado.

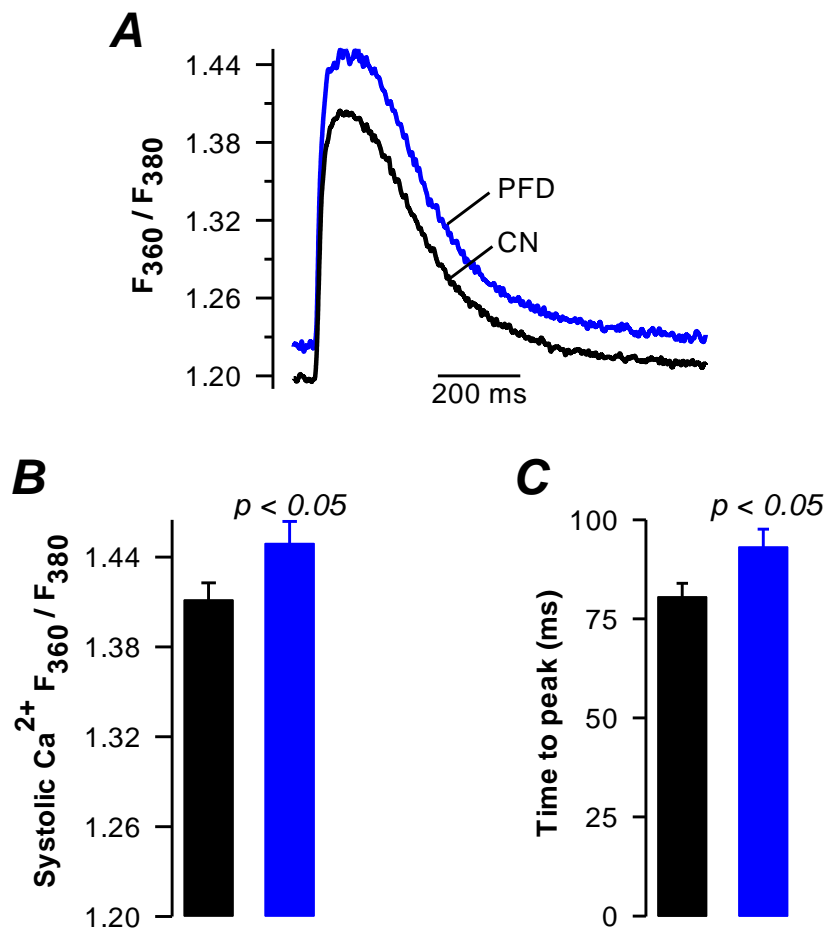


Figura 17. Impacto del tratamiento crónico de pirfenidona en los transitorios de Ca^{2+} de miocitos ventriculares de rata adulta. En (A) se muestra la media del comportamiento de los transitorios de Ca^{2+} de células control (línea negra) y tratadas con pirfenidona (línea azul). Las gráficas de barras representan el promedio del Ca^{2+} sistólico (B) y el tiempo al que se alcanza dicho valor de Ca^{2+} (C) de células control (barras negras) y tratadas con pirfenidona (barras azules). En esta al igual que en las siguientes gráficas de barras, el nivel de significancia se indicará sobre la barra de pirfenidona y las barras de error representan la media \pm SEM.

Otra posible explicación es que el tratamiento crónico con PFD resulta en un enlentecimiento de la remoción de Ca^{2+} (siendo la bomba SERCA la que contribuye mayormente (~70%) en miocitos ventriculares de rata (Bers 2002)). Sin embargo, la constante de tiempo de decaimiento del transitorio (τ) no mostró diferencias significativas (*tabla A1*), indicándonos que la rapidez con que se remueve el Ca^{2+} es similar. Esto sugiere que PFD no modifica en gran medida la actividad de la bomba SERCA.

En resumen, los datos de la figura 17 sugieren que un tratamiento crónico con PFD promueve mayor liberación de Ca^{2+} del RS, sin que se modifique la velocidad de remoción del ion del citoplasma.

Pirfenidona modifica la cinética de contractilidad a nivel de sarcómero y a nivel celular

Una vez que se libera el Ca^{2+} del RS por la apertura del canal RyR, el ion se une a la cTnC, lo que provoca cambios conformacionales en los filamentos delgados del sarcómero que permiten que se lleve a cabo la contracción.

La cinética de la contracción puede modificarse por diversos factores, por mencionar algunos ejemplos: la amplitud puede modularse por la cantidad de Ca^{2+} disponible para unirse a la maquinaria contráctil y las velocidades de relajación y contracción se pueden modificar tras fosforilar a cTnl.

En la *Fig 18A*, se observa claramente cómo el tratamiento con PFD provoca un incremento en la amplitud de la contracción del sarcómero, lo cual se evidencia cuantitativamente en la *Fig. 18B*, donde se muestra una diferencia estadísticamente significativa en el % máximo de acortamiento.

Un aspecto interesante de la contracción es que a pesar de existir una diferencia significativa en el acortamiento, el tiempo en el que se alcanza la mayor amplitud de la contracción no se modifica (*tabla A1*). Esto sugiere que en células tratadas con el fármaco la velocidad de contracción es mayor. Conforme a dicha interpretación, la PFD efectivamente incrementa (en un 54 %) la velocidad de contracción (*Fig. 18C*). De hecho, el fármaco también aumenta significativamente la velocidad de relajación del sarcómero (*Fig. 18D*).

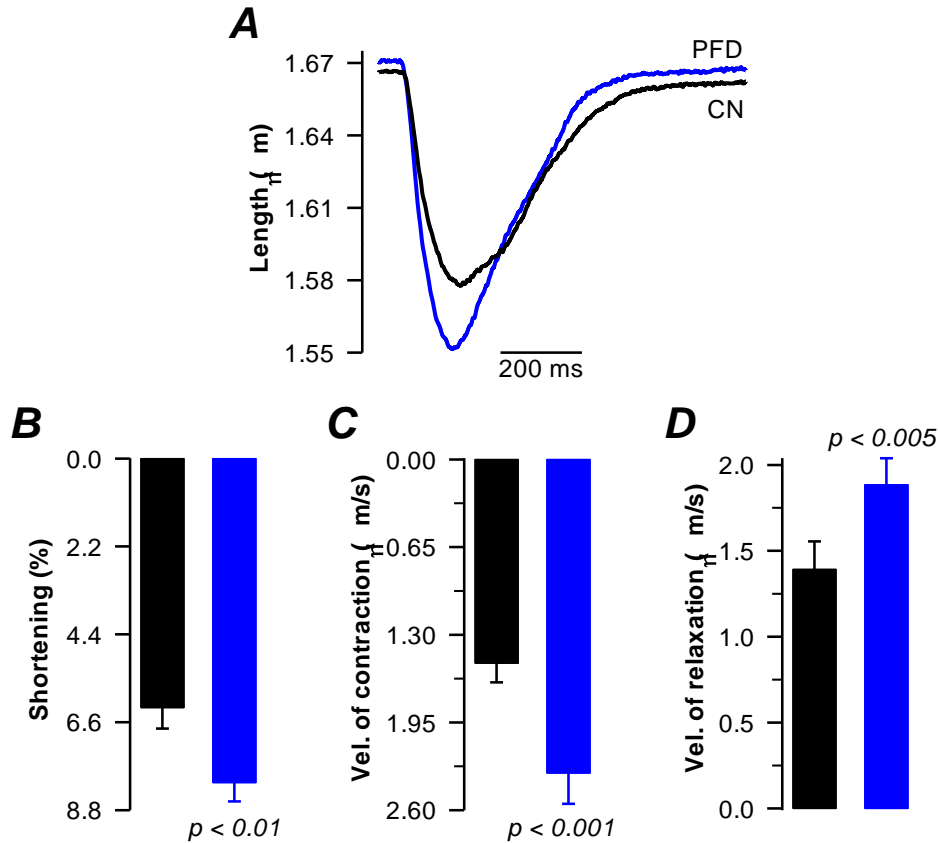


Figura 18. Efectos de pirfenidona en la contractilidad del sarcómero. En (A) se muestra la media de los registros obtenidos para la contracción del sarcómero, a partir de células control (línea negra) y tratadas con pirfenidona (línea azul). Las gráficas de barras representan: B) el promedio del porcentaje de acortamiento máximo con respecto a la basal, y C-D) la velocidad máxima de contracción (C) y relajación (D). Células control - barras negras; células tratadas con pirfenidona - barras azules.

Los efectos de PFD en la contracción celular se ilustran en la figura 19. Tal como se puede apreciar, las células tratadas presentan una mayor longitud diastólica (Figs. 19A y 19B).

Interesantemente, al igual que sucedió en el sarcómero, el tratamiento con el fármaco no solo resultó en un incremento del porcentaje máximo de acortamiento celular (del 36 %, Fig. 19C), sino que también aumentó las velocidades máximas de contracción y relajación (en un 51 % y 34 %, respectivamente; Figs. 19D y E).

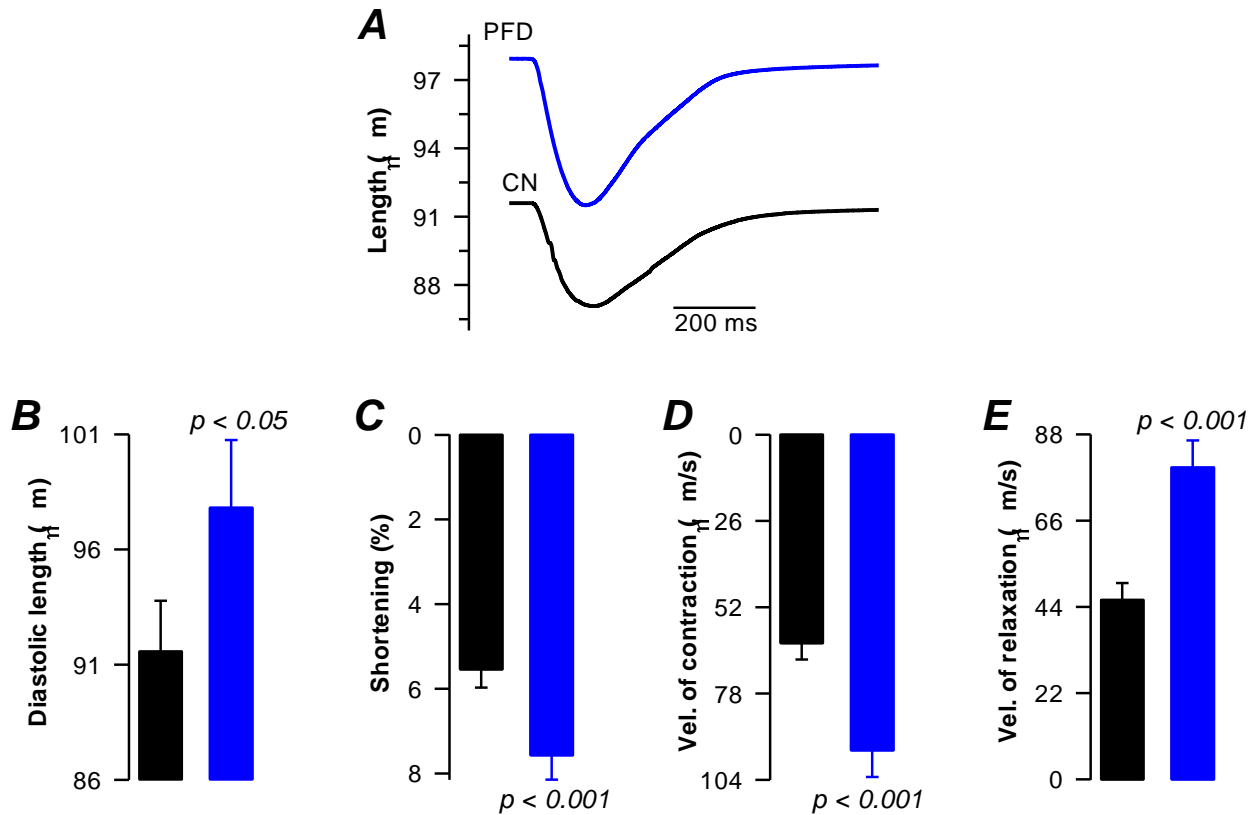


Figura 19. Efectos en la longitud y parámetros cinéticos de la contractilidad celular. En (A) se muestra la media del comportamiento de los datos obtenidos para la longitud de miocitos control (línea negra) y tratados con pirfenidona (línea azul). Por su parte, las gráficas de barras representan los promedios estimados para la longitud celular (B), el acortamiento máximo con respecto a la basal (C), y las velocidades máximas de contracción (D) y relajación (E). Células control - barras negras; células tratadas con pirfenidona - barras azules.

El tratamiento con pirfenidona altera el comportamiento de los diagramas de fases de contracción versus $[Ca^{2+}]_i$

Dado que las mediciones de transitorios de Ca^{2+} y contractilidad se realizaron de manera simultánea, fue posible generar diagramas de fases (gráficas de $[Ca^{2+}]_i$ vs porcentaje de acortamiento), mismos que se presentan en la figura 20. Concretamente, las figuras 20A y B, muestran diagramas de fases para el sarcómero y la longitud celular, respectivamente. En ambos casos se puede apreciar que la $[Ca^{2+}]_i$ incrementa rápidamente, mientras que los cambios en el acortamiento sólo comienzan a hacerse evidentes hasta que los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ alcanzan valores muy elevados ($\sim 1.35 F_{360}/F_{380}$). Dicho comportamiento se debe a que durante el ECC los niveles Ca^{2+}_i y la unión de éste a la maquinaria contráctil no se encuentran en equilibrio (véase también la descripción de la Fig. 16).

Básicamente, lo que sucede es que el fenómeno CICR aumenta los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ con mayor velocidad de lo que la maquinaria contráctil une Ca^{2+} y desarrolla fuerza.

Una vez alcanzado el máximo acortamiento, la fase de relajación comienza. A diferencia de la fase de contracción, en dicha fase el cambio en los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ y la relajación varían linealmente (nótese una línea con pendiente negativa casi constante). Tal como lo describieron Spurgeon y colaboradores (1992), esta linealidad se debe a que en la relajación la $[Ca^{2+}]_i$ y la unión de Ca^{2+} a los miofilamentos se encuentran en equilibrio.

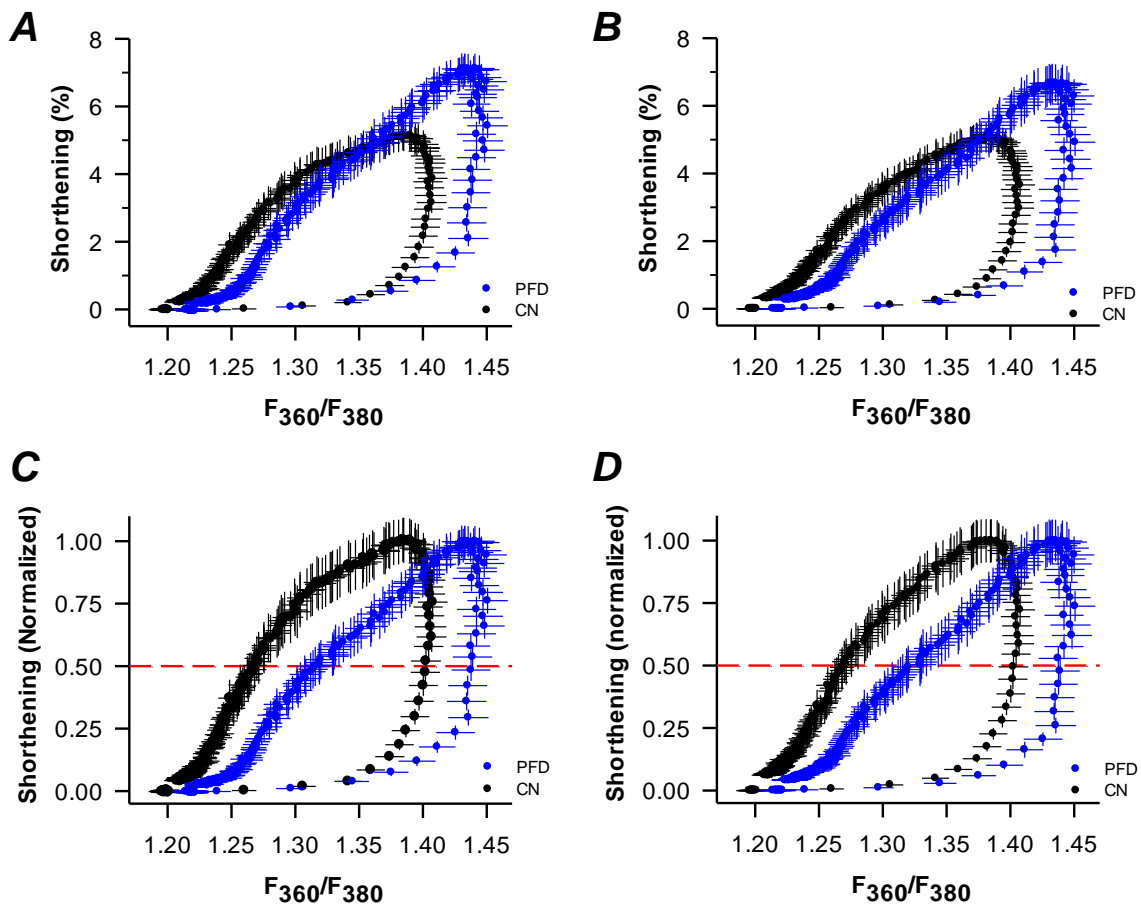


Figura 20. Pirfenidona modifica diagramas de fases construidos a partir de valores de contracción y $[Ca^{2+}]_i$. En (A) y (B) se muestran diagramas de fases relativos al sarcómero y al miocito, respectivamente. Por su parte, los diagramas de (C) y (D) se construyeron tras normalizar, por el porcentaje de acortamiento máximo, los datos mostrados en A y B, respectivamente. Los diagramas representan la media \pm el ES del número de mediciones que se indican en la Tabla 1.

Adicionalmente, en las *Figs. 20A y B* se puede observar que el tratamiento con PFD resulta en un desplazamiento de los diagramas de fases hacia la derecha. Este efecto es aún más evidente cuando los diagramas se muestran normalizados (*Figs. 20C y D*).

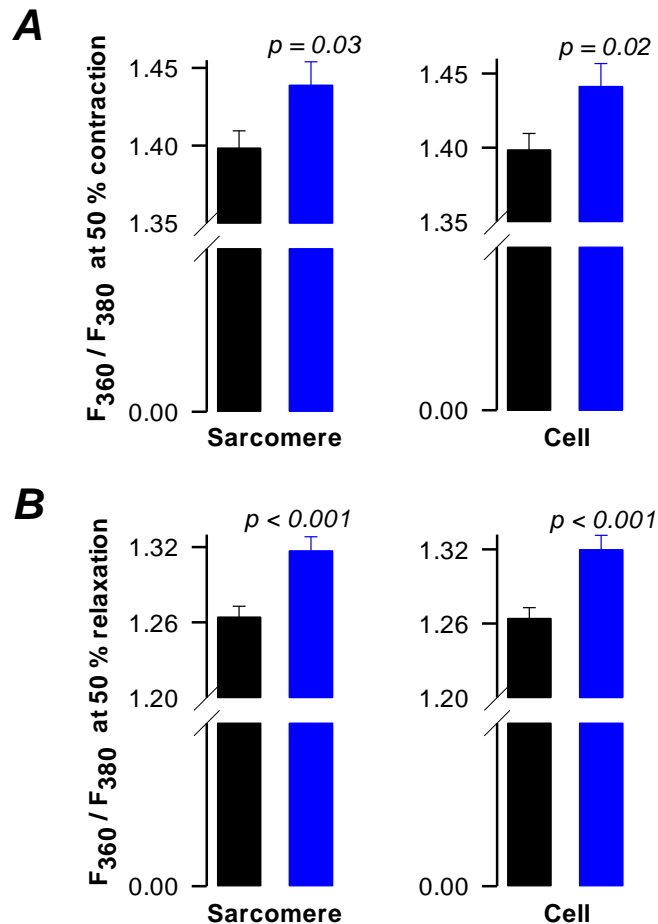


Figura 21. Pirfenidona incrementa la $[Ca^{2+}]_i$ requerida para alcanzar el 50% de los cambios en la maquinaria contráctil. Las barras indican los valores de $[Ca^{2+}]_i$ a los que se observa el 50% de (A) contracción y (B) relajación, ya sea del sarcómero (izquierda) o celular (derecha). Los datos se obtuvieron a partir de los diagramas de fases que se ilustran en la figura 20A y B.

Exceptuando un escenario complejo, en el que la adhesión al sustrato (laminina) represente un factor mecánico relevante, los diagramas de fases mostrados en la figura 20 reflejan el grado de sensibilidad de la maquinaria contráctil a la activación por Ca^{2+} (Spurgeon et al. 1992). Por lo tanto, el corrimiento que se observa hacia la derecha en células tratadas sugiere fuertemente que el fármaco disminuye dicha sensibilidad.

Para cuantificar la desensibilización mencionada, se estimó la $[Ca^{2+}]_i$ requerida para alcanzar el 50% ya sea de la contracción máxima o de la relajación, tanto para el sarcómero como para el miocito. Los resultados correspondientes se muestran en la figura 21. Tal como se puede observar, en todos los casos el tratamiento con pirfenidona resulta en un aumento pequeño pero significativo en la $[Ca^{2+}]_i$ que provoca un 50% de efecto en la maquinaria contráctil.

Pirfenidona aumenta el tamaño celular medido por C_m

En seguida se investigaron miocitos ventriculares con la técnica de *patch-clamp* en su configuración de *whole-cell*. La idea fue tratar de corroborar que pirfenidona incrementa la actividad de los canales L y si eso se traduce en mayor liberación de calcio inducida por calcio (CICR). Lo primero que se comparó fue la capacitancia membranal o C_m , pues ésta es un indicador de la cantidad de membrana plasmática y ayuda a determinar la densidad de corriente L (I_{CaL} , en pA/pF).

La *Fig. 22* muestra que el tratamiento con la PFD incrementa significativamente la C_m , en aproximadamente un 20 %. Es importante aclarar que los datos que se muestran en seguida no se explican por este aumento en C_m , puesto que ya fueron corregidos para cada célula por su respectiva C_m ; es decir, se muestran como densidad de corriente.

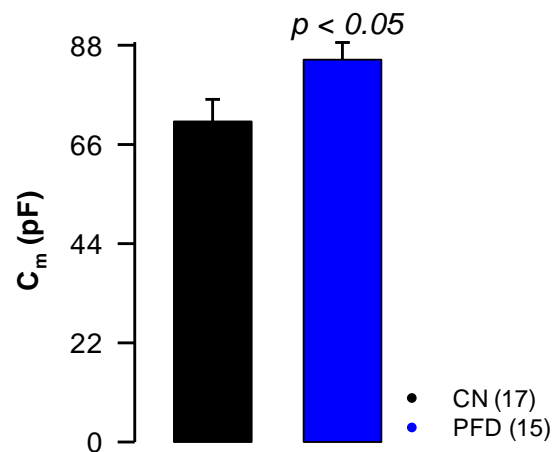


Figura 22. Las células tratadas con pifenidona presentan mayor capacitancia membranal (C_m). Las barras representan valores de C_m que fueron estimados con la técnica de patch-clamp en su configuración de célula completa, tal como se describe en Métodos. Células control – barra negra; Células tratadas con PFD – barra azul.

Registros simultáneos de transitorios de calcio y corrientes de calcio tipo L

Como se ha mencionado a lo largo de este trabajo, resultados obtenidos por nuestro laboratorio han evidenciado que PFD estimula la densidad de I_{CaL} en miocitos de aurículas y ventrículos. Sin embargo, los posibles efectos en los transitorios de Ca^{2+} solo fueron estudiados en cardiomiocitos auriculares (Osornio-Garduño 2013). Por lo tanto, en este trabajo se investigó el posible impacto que podría ejercer el aumento de I_{CaL} en los transitorios de Ca^{2+} y el AEC de miocitos ventriculares.

En la *Fig. 23* se muestran trazos representativos de los registros simultáneos de I_{CaL} y transitorios de Ca^{2+} que se obtuvieron a partir de una célula control.

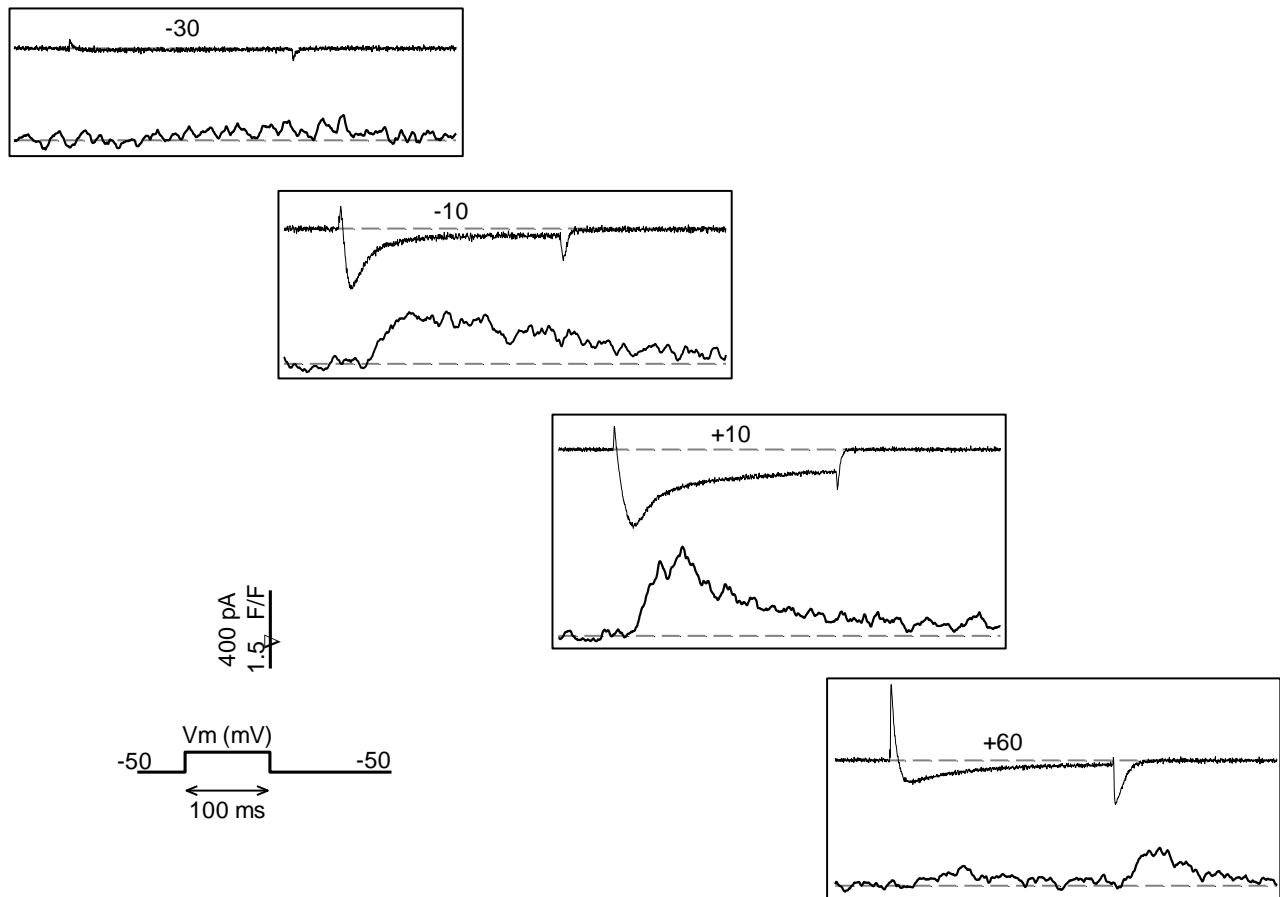


Figura 23. Trazos representativos de I_{CaL} y transitorios de Ca^{2+} . Los registros de I_{CaL} (trazos superiores de cada recuadro) y los niveles de fluorescencia ($\Delta F/F$, trazos inferiores) que se grafican en función del tiempo se obtuvieron de forma simultánea, mediante la aplicación de pulsos despolarizantes de voltaje que llevaron a V_m a los valores que se (en mV). El protocolo de despolarización se muestra en el inserto (abajo a la izquierda). Datos fueron obtenidos de un cardiomiocito ventricular control.

En los trazos representativos, se pueden apreciar las siguientes características: i) la I_{CaL} y los transitorios de Ca^{2+} aumentan conforme aumenta el nivel de despolarización de V_m , ii) no obstante, si la despolarización es muy elevada (como a + 60 mV), entonces el valor de ambas mediciones disminuye debido a que a ese voltaje la fuerza que impulsa el Ca^{2+} al interior celular (o *driving force*) es baja, y iii) cuando V_m se repolariza después del pulso a + 60 mV se presenta un pequeño transitorio de Ca^{2+} que se debe a aumento súbito de I_{CaL} , provocado a su vez por el aumento respectivo en *driving force*.

Pirfenidona estimula canales de calcio tipo L en miocitos ventriculares

La figura 24 ilustra el comportamiento de la densidad de la I_{CaL} en función del voltaje (curvas I-V), tanto para miocitos control como tratados con PFD.

Tal como se puede apreciar, las células tratadas con PFD presentan valores de I_{CaL} de mayor magnitud, con respecto a los que se observan en células control (*Fig. 24 izq.*). Esto sugiere que el fármaco efectivamente estimula canales L, tal como se había reportado anteriormente (Ramos-Mondragón et al., 2012).

Para cuantificar el efecto en los LTCCs, las curvas I-V se ajustaron a una ecuación tipo Boltzmann (Eqn. 1). Dicha ecuación proporciona, entre otros parámetros biofísicos, el valor de la conductancia máxima o G_{max} , el cual nos permitió observar que PFD solamente aumenta el parámetro de G_{max} en aproximadamente 60% (*Fig 24 der.*), lo cual está de acuerdo con lo reportado por Ramos-Mondragón et al. 2012.

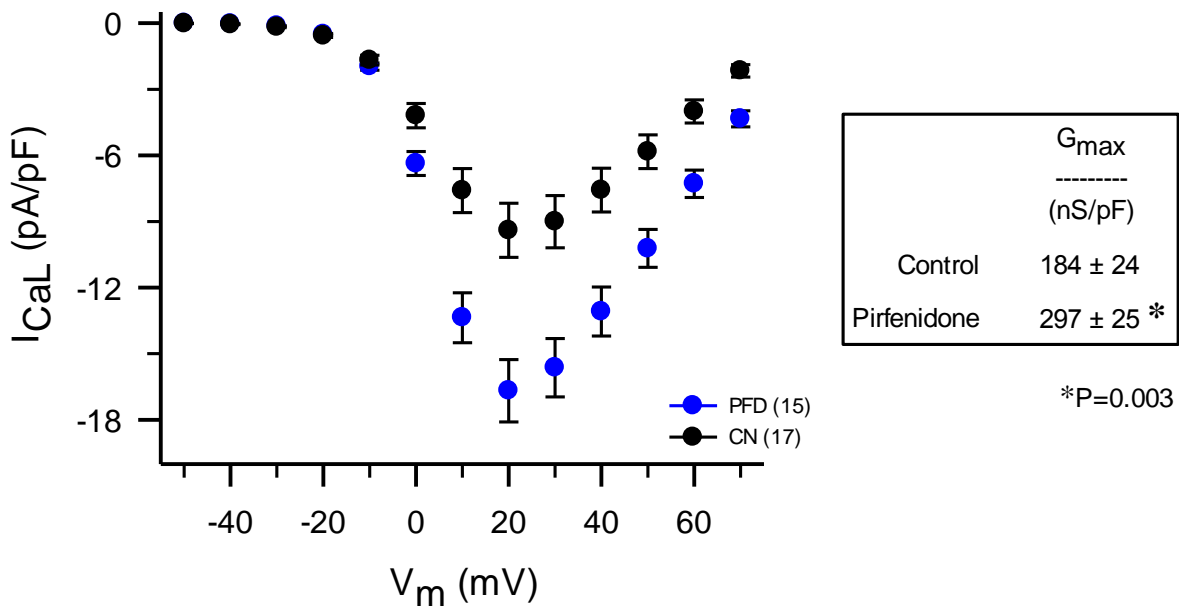


Figura 24. Pirfenidona estimula canales L en cardiomiocitos ventriculares. En la izquierda se muestran curvas I-V promedio que fueron obtenidas a partir de miocitos control (círculos negros) y tratados con pirfenidona (círculos azules). A la derecha se muestran los valores de conductancia máxima o G_{max} que fueron obtenidos después de ajustar las curvas I-V a la ecuación 1. El número de registros se indica entre paréntesis y es el mismo que para las siguientes figuras.

La pirfenidona incrementa la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} inducidos por Ca^{2+}

Los datos obtenidos en células intactas, indican que PFD aumenta la amplitud de los transitorios de calcio inducidos por estimulación eléctrica de campo extracelular. En esta sección se estudió la posibilidad de que el efecto se deba a la mayor actividad de los canales L.

Lo primero que se hizo fue determinar si PFD aumenta la magnitud del transitorio en el mismo grupo de células en las que estimuló a los canales L.

La *Fig. 25* muestra el comportamiento de la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} en función del voltaje, tanto en cardiomiocitos ventriculares control como tratados con PFD. En ambas condiciones experimentales, se observa que el transitorio de Ca^{2+} crece a partir de aproximadamente -30 mV, la amplitud máxima se alcanza a +10 mV y tiende a disminuir a valores más positivos.

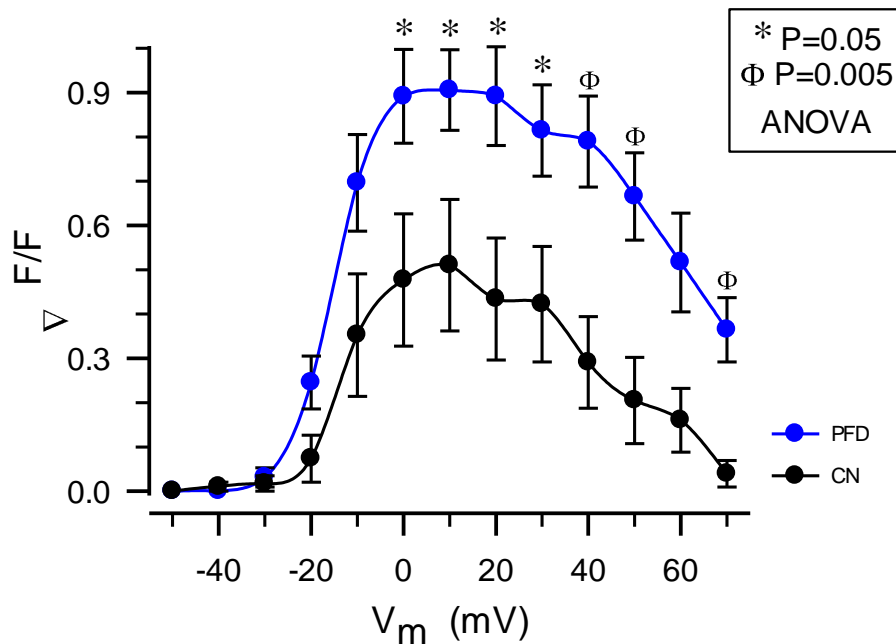


Figura 25. Pirfenidona incrementa la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} . La figura muestra el comportamiento de la amplitud promedio de transitorios de Ca en función del voltaje de células control (círculos negros) y células tratadas con pirfenidona (círculos azules). Los datos fueron adquiridos a partir de registros simultáneos de I_{CaL} y transitorios de Ca^{2+} . La amplitud de los transitorios se calculó conforme a la ecuación 2 (véase sección de métodos).

Con relación a la pirfenidona, se encontró que el fármaco incrementa significativamente la amplitud de los transitorios, en una amplia gama de voltajes. Dicho aumento es similar al observado en I_{CaL} ; es decir, de aproximadamente un 75%.

Estos resultados sugieren fuertemente que la mayor magnitud de los transitorios de Ca^{2+} se debe a una liberación de calcio inducida por calcio (CICR) que se encuentra exacerbada por la mayor densidad de I_{CaL} .

El tratamiento con pirfenidona no afecta la ganancia del acople excitación-contracción.

Es ampliamente aceptado que la entrada de Ca^{2+} a través de los LTCC provoca la liberación de Ca^{2+} del RS, dando origen de esa manera al proceso de CICR; sin embargo, ¿cómo cuantificar el factor de amplificación de I_{CaL} en CICR? la respuesta se encuentra en el cálculo de la ganancia del acople excitación-contracción (ECC).

Existen diversas maneras de estimar dicho factor. En este trabajo se calculó como el resultado de dividir la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} entre su respectiva densidad de I_{CaL} .

En la Fig. 26 se muestra el comportamiento de la ganancia del ECC en función del voltaje.

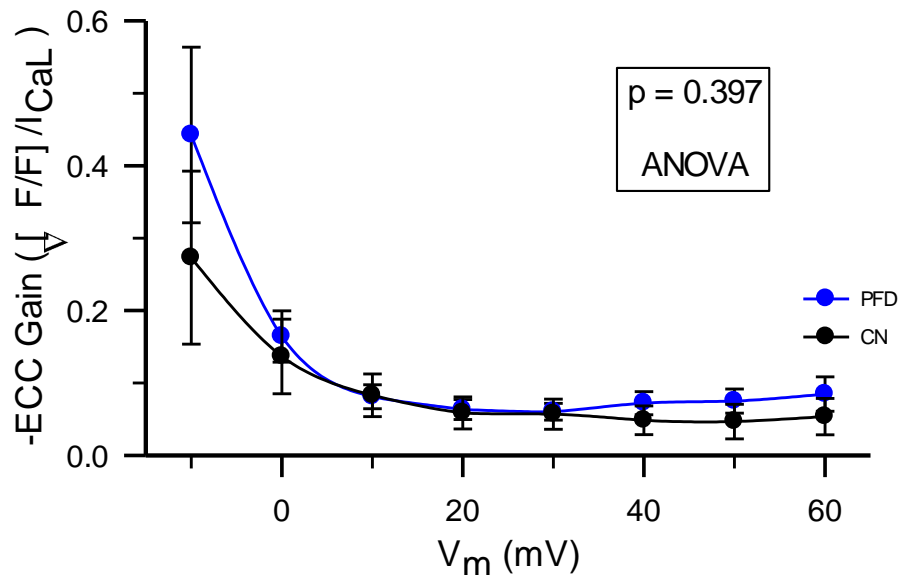


Figura 26. **Pirfenidona no modifica la ganancia del acople excitación-contracción en miocitos ventriculares.** La gráfica muestra valores de ganancia del acople excitación-contracción que fueron obtenidos al dividir la amplitud de los transitorio de Ca^{2+} entre su respectiva densidad de I_{CaL} . Posteriormente, dicha ganancia se graficó en función del voltaje. Células control - círculos negros; células tratadas con pirfenidona - círculos grises.

Nótese que la gráfica comienza en los -10 mV y no en -50 mV como las gráficas anteriores. Esto se debe a que a voltajes más negativos el valor de la ganancia es indeterminable en algunas células, pues implica división por cero. Tal como se puede apreciar, el tratamiento con PFD no provocó cambios significativos en la ganancia del ECC. Este resultado indica que la I_{CaL} adicional que es generada por el tratamiento con la PFD no es redundante. En otras palabras, dicha I_{CaL} logra provocar el mismo factor de amplificación de CICR que la I_{CaL} control.

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo indican que en miocitos ventriculares de rata adulta, pirfenidona incrementa la corriente de Ca^{2+} , la amplitud del transitorio, el porcentaje máximo de acortamiento y las velocidades de contracción y relajación; sin modificar la ganancia del ECC ni el nivel de Ca^{2+} diastólico. Adicionalmente, a partir de un análisis de diagramas de fase, contracción *versus* niveles de Ca^{2+} , se puede añadir que el compuesto disminuye la sensibilidad de los miofilamentos a la activación por Ca^{2+} . Excepto por el efecto en canales de Ca^{2+} tipo L, que fue descrito previamente por Ramos-Mondragón et al., 2012, y que de hecho sirvió como motivación para esta tesis, los resultados son originales. En seguida, se discuten algunos aspectos relacionados con las posibles bases moleculares así como la posible relevancia fisiopatológica de los mismos.

El tratamiento crónico con pirfenidona provoca un efecto inotrópico y lusitrópico positivo.

Los experimentos realizados con el sistema IonOptix permitieron descubrir que un tratamiento crónico con pirfenidona incrementa no solo la amplitud de la contracción (efecto inotrópico positivo), sino también la velocidad de relajación (efecto lusitrópico positivo) tanto a nivel de sarcómero como a nivel celular. El incremento en el porcentaje de acortamiento probablemente se podría explicar por el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ sistólica (*Fig. 17A*) debido a que la mayor cantidad de Ca^{2+} libre intracelular estaría activando de manera exacerbada a la maquinaria contráctil y por ende generando mayor fuerza y contracción. Adicionalmente, este efecto inotrópico estaría siendo reforzado por el incremento en el tiempo al pico de los transitorios (*Fig. 17C*), ya que dicho incremento sugiere que la liberación de Ca^{2+} del RS es no solo de mayor magnitud, sino que también es más prolongada.

En teoría, el efecto lusitrópico se podría explicar por un aumento en ya sea el grado de fosforilación de cTnI (Yasuda et al. 2007) o el nivel de fosforilación de fosfolamban (PLB, (Li et al. 2000). En este sentido, es importante mencionar que PKA es capaz de llevar a cabo ambas fosforilaciones. PLB es un inhibidor constitutivo de la bomba SERCA y cuando se fosforila se remueve dicha inhibición. En consecuencia, la bomba SERCA incrementa su afinidad por Ca^{2+} ,

conllevando a un incremento en la velocidad de recaptura del ion al RS, lo que acelera la relajación. Por su parte, la fosforilación de cTnI se traduce en una disminución de la afinidad que tiene la maquinaria contráctil por Ca^{2+} . Básicamente, se acelera la disociación del complejo cTnI—cTnC, por lo que pequeñas disminuciones en la $[\text{Ca}^{2+}]$ sistólica se traducen rápidamente en relajación.

Pero ¿cómo ligar un posible incremento en niveles de fosforilación de éstas proteínas (i.e LTCCs, PLB y cTnI) con el tratamiento crónico (de 1-2 días) con PFD? Esto no es trivial, sobre todo si se toma en cuenta que los procesos de fosforilación - desfosforilación son altamente dinámicos; es decir, una vez aplicado un estímulo se observan en cuestión de minutos o incluso unos cuantos segundos. Ramos-Mondragón y colaboradores (véase también Ávila et al., 2014) sugieren que el fármaco incrementa los niveles de fosforilación constitutiva de los canales L por PKA, únicamente hasta después de 10 – 12 h, cuando ya ha logrado modificar la expresión de proteínas que a su vez inciden en la actividad de PKA en microdominios cercanos a los canales, como pudieran ser las *junctions*. Una de las proteínas que se podría estar regulando a nivel génico, es la sintasa de óxido nítrico, cuyo producto el óxido nítrico que modula negativamente la actividad de PKA (Ramos-Mondragón et al., 2012; Ávila et al., 2014). Los datos de esta tesis apoyan indirectamente la noción de que PFD recluta a largo plazo una mayor actividad de PKA, pues se podrían explicar por una supuesta fosforilación de cTnI por esta cinasa.

En relación a PLB, queda la siguiente duda ¿si PLB también es blanco de PKA, por qué no se incrementó la rapidez de decaimiento del transitorio de Ca^{2+} ? Una posible explicación es que en células control las moléculas de PLB ya estén fosforiladas en su totalidad y en tal escenario sería irrelevante la supuesta mayor actividad de PKA. Alternativamente, es probable que PLB sí se encuentre hiperfosforilado y la consecuente hiperactividad de SERCA haya pasado desapercibida. Los datos indican que no hay cambios significativos en la constante de tiempo de decaimiento del transitorio (τ , *tabla A1*), que si bien refleja la velocidad de recaptura de Ca^{2+} al RS por SERCA, también está influenciada por la actividad de otros sistemas de transporte, tales como el NCX.

Interesantemente, PFD inhibe a dicho transportador, al menos en miocitos auriculares. Por lo tanto, en el decaimiento de los transitorios se pudo haber contrarrestado el posible estímulo en

SERCA por una inhibición en el NCX. Evidentemente, se requiere más investigación para disociar tales posibles efectos en miocitos ventriculares.

La pirfenidona provoca una disminución en la sensibilidad de la maquinaria contráctil a la activación por Ca^{2+} .

Los diagrama de fases que se grafican en la *Fig. 20* muestran claramente que el tratamiento crónico con PFD desplaza la distribución de los mismos hacia la derecha, lo cual según Spurgeon y colaboradores, es un claro indicio de una disminución en la sensibilidad de la maquinaria contráctil a la activación por Ca^{2+} (Spurgeon et al. 1992). Tal como lo sugieren estos investigadores, el único factor de interferencia que podría obscurecer dicha interpretación es la presencia de fuerzas extrañas; es decir, ajenas a un miocito aislado, como las que se presentan en el tejido completo. En nuestro sistema, el único factor de interferencia que se podría tomar en consideración es la fuerza con que los miocitos se adhieren al sustrato (laminina). En un caso extremo, y a reserva de confirmar la validez respectiva, se podría plantear que los miocitos tratados con PFD presentan mayor retardo para contraerse debido a que están adheridos con mayor firmeza a la laminina y no necesariamente porque exista desensibilización de la maquinaria contráctil a Ca^{2+} . Por lo tanto, sería interesante tratar de corroborar que PFD resulta en menor sensibilidad de la maquinaria contráctil a Ca^{2+} , realizando las mediciones de este trabajo en células que no estén adheridas a algún tipo de sustrato (únicamente sedimentadas). Además de la fosforilación de cTnI por PKA, existen otros factores que logran disminuir dicha sensibilidad y por ende, no hay que descartarlos como otros posibles intermediarios en los efectos de PFD (por ejemplo, incrementos en el pH, en la concentración de Mg^{2+} y PO_4 (Bers 2001).

La interpretación de que la sensibilidad de la maquinaria contráctil está disminuida y se presenta concomitantemente con mayor velocidad de contracción pareciera ser una aparente contradicción. Concretamente, si la maquinaria se encuentra desensibilizada, ¿cómo puede provocar una contracción acelerada? Estos efectos aparentemente contradictorios se han observado previamente en respuesta a un incremento en la actividad de PKA. Concretamente, se ha reportado que además de disminuir la sensibilidad de la maquinaria contráctil, PKA

aumenta la velocidad de contracción en ya sea miocitos ventriculares o trabéculas cardiacas (Strang et al. 1994; Saeki et al. 1997; Fentzke et al. 1999). Como ya se mencionó la desensibilización de la maquinaria contráctil se atribuye a fosforilación de cTnI. Lo interesante aquí, es que dicha fosforilación también provoca una cinética acelerada del ciclo de formación de puentes cruzados (que a su vez también explica, al menos en parte, la respectiva aceleración de la relajación; (Kentish et al. 2001). Pero no solo eso, la mayor rapidez de contracción también se podría explicar por la mayor cantidad de Ca^{2+} sistólico. Más específicamente, una vez superado el mayor retardo en el umbral de activación de la maquinaria contráctil —por desensibilización— los niveles de Ca^{2+} en células tratadas son más elevados que en células control; y en este punto es importante recordar la ley de acción de masas, la cual establece que la velocidad de una reacción química es directamente proporcional al producto de las concentraciones de las especies reaccionantes (Canales et al. 1999). Es decir, que una vez superado el umbral, la concentración exacerbada de Ca^{2+} activa con mayor rapidez a la maquinaria contráctil.

La pirfenidona incrementa el tamaño de los miocitos ventriculares.

El hecho de que los miocitos tratados con PFD presentan mayor longitud diastólica se podría interpretar en el sentido de que el fármaco provoca relajación de la maquinaria contráctil, probablemente por menor sensibilidad de la misma a la activación por Ca^{2+} (véase el párrafo anterior). Sin embargo, dos evidencias se contraponen a dicha interpretación: i) en ambas condiciones experimentales los niveles diastólicos de Ca^{2+} están muy por debajo de los requeridos para iniciar la contracción ($\sim 1.20 F_{360}/F_{380}$ vs $\sim 1.35 F_{360}/F_{380}$, respectivamente; *Figs. 17A y 20*), y ii) conforme al punto anterior, el fármaco no modifica la longitud diastólica del sarcómero (*Fig. 18 A, tabla A1*).

Otra posible explicación es que las células tratadas con PFD fuesen más grandes. En apoyo a esta interpretación, al dividir la media de los valores de longitud celular por sus respectivas dimensiones del sarcómero, resulta que las células tratadas cuentan, en promedio, con aproximadamente 4 sarcómeros más que las células control (i.e. 59 vs 55, respectivamente). Más aún, las células tratadas con el fármaco exhiben ~ 20 % más cantidad de superficie

membranal (estimada como C_m) respecto al control. No obstante, hay que tomar en cuenta que Ramos-Mondragón y colaboradores (2012) reportaron que sus células tratadas no presentan cambios en C_m respecto al control.

Por todo anterior, en un futuro cercano sería interesante intentar corroborar el efecto morfológico reportado en esta tesis, tal vez utilizando marcadores fluorescentes que se incorporan a la membrana y microscopía confocal. Idealmente, dichos ensayos deberían aplicarse a toda la población celular; es decir, sin implementar criterios de exclusión. Esto eliminaría los filtros que naturalmente utiliza el investigador cuando elige cardiomiocitos en óptimo estado para mediciones electrofisiológicas.

La pirfenidona estimula la salida de Ca^{2+} del RS durante el acople excitación-contracción.

Debido a que existía la posibilidad de que el incremento en los transitorios de los cardiomiocitos tratados con PFD, no fuera proporcional al incremento de I_{CaL} , era importante calcular la ganancia del ECC, el cual es un factor que nos habla del grado de liberación de Ca^{2+} del RS inducida por la I_{CaL} entrante a la célula. Los resultados de dicho factor indicaron que no hay diferencias significativas entre los miocitos ventriculares control y los tratados con la PFD (*Fig. 26*), lo cual nos está indicando que la corriente adicional entrante en las células que recibieron el tratamiento crónico con el fármaco tiene el mismo impacto de amplificación de la CICR, es decir, no es redundante.

El hecho de que la ganancia del ECC presente una disminución conforme V_m se hace más positivo es bien conocido (Bers, 2001). Ese comportamiento se debe a un fenómeno conocido como control local de liberación de Ca^{2+} , el cual establece que la $[Ca^{2+}]$ que rodea a los RyR, es la encargada de activarlos (Stern 1992). De hecho, el control local no solo explica la ganancia del acople, sino que también esclarece la dependencia al voltaje que presentan la I_{CaL} macroscópica. La clave está en que en realidad es la corriente unitaria de I_{CaL} (i) la que controla localmente a los RyR aledaños y de hecho las dependencias al voltaje de i y el acople son muy similares, ya que i también disminuye a voltajes muy positivos, debido a que el *driving force* es de menor magnitud (Santana et al. 1996).

Dentro de este contexto, el hecho de que PFD no modifique ni la magnitud ni la dependencia a V_m de la ganancia del acople sugiere fuertemente que el fármaco de alguna manera aumenta el número de *junctions* en las que se logra reclutar CICR. Esa posibilidad va de acuerdo con la idea de que la I_{CaL} macroscópica crece debido a un aumento en la fracción de canales L funcionales (al menos en aurícula, Ávila et al., 2012). Así, aparentemente PFD no solo recluta más canales L funcionales, sino también a las respectivas unidades funcionales de liberación de Ca^{2+} .

Es importante aclarar que la ganancia del ECC también depende, indirectamente, de los niveles de Ca^{2+} disponibles para ser liberados del RS. Por lo tanto, en un futuro cercano sería interesante investigar si esos niveles se modifican en miocitos ventriculares tratados con PFD.

Relevancia fisiológica

Los trabajos realizados por el grupo de Jeffrey Olgin, muestran que la pirfenidona es capaz de optimizar el funcionamiento del corazón, a nivel de tejido auricular y ventricular (Lee et al., 2006; Nguyen et al., 2010). Eso se atribuyó principalmente a que el fármaco es capaz de disminuir niveles de fibrosis (*Figs. 8C y 9C*). Sin embargo, otros grupos han reportado que pirfenidona mejora la función ventricular aún en ausencia de cambios estructurales; concretamente, en ausencia de efectos a nivel de fibrosis ni de acartonamiento tisular (Van Erp et al. 2006). Quizás más importante, nuestro laboratorio demostró que la potenciación de canales L no depende de la vía de señalización de TGF- β , el principal promotor de fibrosis (Ramos-Mondragón et al. 2012). Esto sugiere que PFD ejerce sus acciones electrofisiológicas independientemente de las morfológicas.

Los resultados de este trabajo indican que la I_{CaL} adicional en miocitos ventriculares tratados con pirfenidona se traduce en mayor liberación de Ca^{2+} del RS. Ello se traduce en mayor porcentaje de acortamiento, que se acompaña de contracciones y relajaciones aceleradas. Todo esto contribuye a comprender por qué el fármaco logra mejorar el funcionamiento del corazón. Concretamente, ahora tenemos un mejor entendimiento de cómo PFD logra aumentar la fracción de expulsión de sangre de los ventrículos (*Fig. 9E*).

PERSPECTIVAS

Algunas de las perspectivas del trabajo se han ido mencionado a lo largo de la discusión. Aquí se presentan de manera resumida.

1. **A corto plazo se podría determinar en miocitos ventriculares de rata adulta si un tratamiento de 1-2 días con pirfenidona:**
 - a) Modifica los niveles de Ca^{2+} del RS disponible para ser liberado.
 - b) Regula a los sistemas lentos de remoción de Ca^{2+} (e.g. NCX).
 - c) Recluta a PKA para provocar efectos en proteínas que son blanco de dicha cinasa (e.g. cTnI, PLB y LTCC).
 - d) Cambia los niveles de NOS y NO, y de ser así investigar si tales efectos participan como intermediarios en las acciones mencionadas.

2. **Investigar si el empleo de inhibidores de PKA (como H-89 o PKI), son capaces de revertir los efectos inducidos por pirfenidona en las cinéticas de contracción y relajación.**

3. **A más largo plazo se podría investigar si el compuesto revierte la remodelación eléctrica celular que se observa en modelos animales de fibrilación auricular e infarto al miocardio.**

CONCLUSIONES

En miocitos ventriculares de rata adulta, pirfenidona:

1. Aumenta los niveles de Ca^{2+} sistólico.
2. Provoca mayor velocidad de contracción y relajación.
3. Incrementa el porcentaje de acortamiento.
4. Resulta en menor sensibilidad de la maquinaria contráctil a la activación por Ca^{2+} .
5. Estimula a los canales de calcio tipo L.
6. Aumenta la magnitud de los transitorios de Ca^{2+} .
7. No modifica la ganancia del AEC.

REFERENCIAS

- Amin, A.S., Tan, H.L. & Wilde, A. a M., 2010. Cardiac ion channels in health and disease. *Heart Rhythm*, 7(1), pp.117–126. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hrthm.2009.08.005>.
- Armoundas, A. a. et al., 2001. Electrical and structural remodeling of the failing ventricle. *Pharmacology and Therapeutics*, 92(2-3), pp.213–230.
- Avila, G. et al., 2014. Functional and structural impact of pirfenidone on the alterations of cardiac disease and diabetes mellitus. *Cell Calcium*, 56(5), pp.428–435.
- Avila, G. et al., 2007. Transforming growth factor b1 decreases cardiac muscle L-type Ca²⁺ current and charge movement by acting on the Cav1. 2 mRNA. , pp.622–631.
- De Bakker, J.M.T. & Van Rijen, H.M. V, 2006. Continuous and discontinuous propagation in heart muscle. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 17(5), pp.567–573.
- Bassani, B.Y.R.A., Bassani, J.W.M. & Bers, D.M., 1992. Mitochondrial and sarcolemmal Ca²⁺ transport reduce [Ca²⁺]_i during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. *Journal of Physiology*, 453, pp.591–608.
- Bean, B.P. & Rios, E., 1989. Nonlinear charge movement in mammalian cardiac ventricular cells. Components from Na and Ca channel gating. *The Journal of general physiology*, 94(1), pp.65–93.
- Benitah, J.-P., Alvarez, J.L. & Gómez, A.M., 2010. L-type Ca²⁺ current in ventricular cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 48(1), pp.26–36. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.07.026>.
- Bers, D.M., 2002. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*, 415(January).
- Bers, D.M., 2001. *Excitation-Contraction coupling and cardiac contractile force* 2nd ed., Dordrecht: Kluwer academic.
- Bootman, M.D. et al., 2006. Calcium signalling during excitation-contraction coupling in mammalian atrial myocytes. *Journal of cell science*, 119, pp.3915–3925.
- Brook, N.R. et al., 2005. The experimental agent pirfenidone reduces pro-fibrotic gene expression in a model of tacrolimus-induced nephrotoxicity. *Journal of Surgical Research*, 125(2), pp.137–143.
- Canales, M. et al., 1999. *Fisicoquímica I* 2nd ed. UNAM, ed., México.

- Cannell, M.B., Cheng, H. & Lederer, W.J., 1994. Spatial Non-Uniformities in $[Ca^{2+}]_i$ during Excitation-Contraction Coupling in cardiac myocytes. *Biophysical Journal*, 67(5), pp.1942–1956.
- Carter, N.J., 2011. Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis. *Drugs*, 71(13), pp.1721–1732.
- Castro-ferreira, R. et al., 2009. Papel de la Titina en la Modulación de la Función Cardíaca y sus Implicaciones Fisiopatológicas. *Sociedade brasileira de cardiologia*, 96(4), pp.332–339.
- Catterall, W. a., 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(8), pp.1–23.
- Cheng, H., Lederer, W.J. & Cannell, M.B., 1993. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science*, 262(5134), pp.740–744.
- Craig, R. & Lehman, W., 2001. Crossbridge and tropomyosin positions observed in native, interacting thick and thin filaments. *Journal of molecular biology*, 311(5), pp.1027–1036.
- Dosanjh, a et al., 2002. Pirfenidone: A novel anti-fibrotic agent and progressive chronic allograft rejection. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*, 15(5), pp.433–437.
- Van Erp, C., Irwin, N.G. & Hoey, A.J., 2006. Long-term administration of pirfenidone improves cardiac function in mdx mice. *Muscle & nerve*, 34(3), pp.327–334.
- Ertel, E.A. et al., 2000. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, 25(3), pp.533–535.
- Fabiato, A., 1983. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *The American journal of physiology*, 245(1), pp.C1–C14.
- Fabiato, A., 1985. Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *The Journal of general physiology*, 85(2), pp.247–289.
- Farrell, E.F. et al., 2003. Sorcin inhibits calcium release and modulates Excitation-Contraction coupling in the heart. *Journal of Biological Chemistry*, 278(36), pp.34660–34666.
- Fearnley, C.J., Roderick, H.L. & Bootman, M.D., 2011. Calcium signaling in cardiac myocytes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(11), pp.1–20.
- Fentzke, R.C. et al., 1999. Impaired cardiomyocyte relaxation and diastolic function in transgenic mice expressing slow skeletal troponin I in the heart. *Journal of Physiology*, 517(1), pp.143–157.

- Frisk, M. et al., 2014. Variable t-tubule organization and Ca²⁺ homeostasis across the atria. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 307(4), pp.H609–H620.
- Funatsu, T. et al., 1993. Elastic filaments in situ in cardiac muscle: Deep-etch replica analysis in combination with selective removal of actin and myosin filaments. *Journal of Cell Biology*, 120(3), pp.711–724.
- Gaddekar, S.M., 1974. “5-Methyl-1-phenyl-2-(1H)-pyridone compositions and methods of use” U.S. Patent No. 3,974,281. *United States Patent*.
- Garrido Pertierra, A. et al., 2006. *Fundamentos de bioquímica estructural* 2da ed., Madrid, España: Teba, S. L.
- Hille, B., 1992. Classical description of channels. In *Ion channels of excitable membranes*. Massachusetts: Sinauer associates inc, pp. 21–258.
- Hirano, A. et al., 2006. Pirfenidone modulates airway responsiveness, inflammation, and remodeling after repeated challenge. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 35(3), pp.366–377.
- Hirano, Y., Fozzard, H. & January, C., 1989. Characteristics of L- and T-type Ca²⁺ currents in canine cardiac Purkinje cells. *The American journal of physiology*, 256, pp.H1478–H1492.
- Iyer, S.N., Gurujeyalakshmi, G. & Giri, S.N., 1999a. Effects of pirfenidone on procollagen gene expression at the transcriptional level in bleomycin hamster model of lung fibrosis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 291(1), pp.367–373.
- Iyer, S.N., Gurujeyalakshmi, G. & Giri, S.N., 1999b. Effects of pirfenidone on transforming growth factor-beta gene expression at the transcriptional level in bleomycin hamster model of lung fibrosis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 291(1), pp.367–373.
- Jiménez, F. and Merchant, H., 2003. *Biología celular y molecular*, México: Pearson Education.
- De Jongh, K.S. et al., 1996. Specific phosphorylation of a site in the full-length form of the alpha 1 subunit of the cardiac L-type calcium channel by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Biochemistry*, 35(32), pp.10392–10402.
- Kentish, J.C. et al., 2001. Phosphorylation of troponin I by protein kinase A accelerates relaxation and crossbridge cycle kinetics in mouse ventricular muscle. *Circulation research*, 88(10), pp.1059–1065.
- Kobayashi, T. & Solaro, R.J., 2005. Calcium, thin filaments, and the integrative biology of cardiac contractility. *Annual review of physiology*, 67, pp.39–67.

- Kobirumaki-Shimozawa, F. et al., 2014. Cardiac thin filament regulation and the Frank-Starling mechanism. *Journal of Physiological Sciences*, 64(4), pp.221–232.
- Lacinová, L., 2005. Voltage-dependent calcium channels. *General physiology and biophysics*, 24(Suppl 1), pp.1–78.
- Laizzo, P.A., 2010. *Handbook of cardiac anatomy, physiology and devices* 2nd ed., Minneapolis: Springer.
- Latorre, R. et al., 1996. *Biofísica y fisiología celular* F. Bezanilla & R. Llinas, eds., España: Universidad de Sevilla.
- Lee, K.W. et al., 2006. Pirfenidone prevents the development of a vulnerable substrate for atrial fibrillation in a canine model of heart failure. *Circulation*, 114(16), pp.1703–1712.
- Li, L. et al., 2000. Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 278(3), pp.H769–H779.
- Liu, H. et al., 2005. Pirfenidone inhibits inflammatory responses and ameliorates allograft injury in a rat lung transplant model. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 130(3), pp.852–858.
- Macias-Barragan, J. et al., 2014. Efecto del ácido alfa lipoico y la pirfenidona en la modulación antioxidante celular contra el daño oxidativo. *Revista médica de Chile*, 142(12), pp.1553–1564.
- Macías-Barragán, J. et al., 2010. The multifaceted role of pirfenidone and its novel targets. *Fibrogenesis & tissue repair*, 3(16).
- Margolin, S.B., 1994. “Composition and method for reparation and prevention of fibrotic lesions” U.S. patent No 5,310,562.
- Mezzano, V. & Sheikh, F., 2012. Cell-cell junction remodeling in the heart: Possible role in cardiac conduction system function and arrhythmias? *Life Sciences*, 90(9-10), pp.313–321.
- Mirkovic, S. et al., 2002. Attenuation of cardiac fibrosis by pirfenidone and amiloride in DOCA-salt hypertensive rats. *British journal of pharmacology*, 135(4), pp.961–968.
- Misra, H.P. & Rabideau, C., 2000. Pirfenidone inhibits NADPH-dependent microsomal lipid peroxidation and scavenges hydroxyl radicals. *Molecular and cellular biochemistry*, 204(1-2), pp.119–126.

- Mitani, Y. et al., 2008. Superoxide scavenging activity of pirfenidone-iron complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372(1), pp.19–23.
- Nakanishi, H. et al., 2004a. Pirfenidone inhibits the induction of iNOS stimulated by interleukin-1?? at a step of NF-??B DNA binding in hepatocytes. *Journal of Hepatology*, 41(5), pp.730–736.
- Nakanishi, H. et al., 2004b. Pirfenidone inhibits the induction of iNOS stimulated by interleukin-1b at a step of NF-kB DNA binding in hepatocytes. *Journal of Hepatology*, 41(5), pp.730–736.
- Nakazato, H. et al., 2002. A novel anti-fibrotic agent pirfenidone suppresses tumor necrosis factor- α at the translational level. *European Journal of Pharmacology*, 446(1-3), pp.177–185.
- Nattel, S. et al., 2007. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiological reviews*, 87(2), pp.425–456.
- Nerbonne, J. & Kass, R., 2005. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiological reviews*, 85, pp.1205–1253.
- Nguyen, D.T. et al., 2010. Pirfenidone mitigates left ventricular fibrosis and dysfunction after myocardial infarction and reduces arrhythmias. *Heart Rhythm*, 7(10), pp.1438–1445.
- Oku, H. et al., 2008. Antifibrotic action of pirfenidone and prednisolone: Different effects on pulmonary cytokines and growth factors in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis. *European Journal of Pharmacology*, 590(1-3), pp.400–408.
- Oku, H. et al., 2002. Pirfenidone suppresses tumor necrosis factor- α , enhances interleukin-10 and protects mice from endotoxic shock. *European journal of pharmacology*, 446(1-3), pp.167–176.
- Osornio-Garduño, D.S., 2013. *Impacto de pirfenidona en la dinámica del Ca²⁺ de cardiomiocitos auriculares*. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.
- Page, E., McCallister, L.P. & Power, B., 1971. Stereological measurements of cardiac ultrastructures implicated in excitation-contraction coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(7), pp.1465–1466.
- Page, E. & Surdyk-Droske, M., 1979. Distribution, surface density, and membrane area of diadic junctional contacts between plasma membrane and terminal cisterns in mammalian ventricle. *Circulation research*, 45(2), pp.260–267.

- Pogwizd, S.M. et al., 2001. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure. *Circulation Research*, 88(11), pp.1159–1167.
- RamachandraRao, S.P. et al., 2009. Pirfenidone is renoprotective in diabetic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 20(8), pp.1765–1775.
- Ramos-Mondragón, R. et al., 2012. Chronic potentiation of cardiac L-type Ca²⁺ channels by pirfenidone. *Cardiovascular Research*, 96(2), pp.244–254.
- Ramos-Mondragón, R., Galindo, C. a & Avila, G., 2008. Role of TGF-beta on cardiac structural and electrical remodeling. *Vascular health and risk management*, 4(6), pp.1289–1300.
- Rayment, I. et al., 1993. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science*, 261(5117), pp.58–65.
- Ringer, S., 1883. A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. *Journal of Physiology*, 3(1), pp.29–42.
- Ross, M. and & Wojciech, P., 2008. *Histología* 5ta ed., Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Rueda, A., Alba-aguayo, D.R. De & Valdivia, H., 2014. Receptor de rianodina , fuga de calcio y arritmias. *Archivos de cardiología de México*, 84(3), pp.191–201.
- Saeki, Y. et al., 1997. Protein kinase A increases the tension cost and unloaded shortening velocity in skinned rat cardiac muscle. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 29(6), pp.1655–1663.
- Salazar-Montes, A. et al., 2008. Potent antioxidant role of Pirfenidone in experimental cirrhosis. *European Journal of Pharmacology*, 595(1-3), pp.69–77.
- Sandow, A., 1952. Excitation-contraction coupling in muscular response. *The Yale journal of biology and medicine*, 25(3), pp.176–201.
- Santana, L.F. et al., 1996. Relation between the sarcolemmal Ca²⁺ current and Ca²⁺ sparks and local control theories for cardiac excitation-contraction coupling. *Circulation research*, 78(1), pp.166–171.
- Santana, L.F., Cheng, E.P. & Lederer, W.J., 2010. How does the shape of the cardiac action potential control calcium signaling and contraction in the heart? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 49(6), pp.901–903.
- Di Sario, A. et al., 2002. Effect of pirfenidone on rat hepatic stellate cell proliferation and collagen production. *Journal of Hepatology*, 37(5), pp.584–591.

- Di Sario, A. et al., 2004. The anti-fibrotic effect of pirfenidone in rat liver fibrosis is mediated by downregulation of procollagen alpha1(I), TIMP-1 and MMP-2. *Dig. Liver Dis.*, 36(11), pp.744–751.
- Schaefer, C.J. et al., 2011. Antifibrotic activities of pirfenidone in animal models. *European Respiratory Review*, 20(120), pp.85–97.
- Services, D. of H.& H., 2015. Anatomy of the Heart. Available at: <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/hhw/anatomy>.
- Silverthorn, D.U., 2009. *Fisiología Humana. Un enfoque integrado* 4ta ed., Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Sjostrand, F.S., Andersson-Cedergren, E. & Dewey, M.M., 1958. The ultrastructure of the intercalated discs of frog, mouse and guinea pig cardiac muscle. *Journal of ultrastructure research*, 1(3), pp.271–287.
- Soeller, C. & Cannell, M.B., 1999. Examination of the transverse tubular system in living cardiac rat myocytes by 2-photon microscopy and digital image-processing techniques. *Circulation research*, 84(3), pp.266–275.
- Solaro, R.J., Rosevear, P. & Kobayashi, T., 2009. The unique functions of cardiac troponin I in the control of cardiac muscle contraction and relaxation. *Biochemical and biophysical research communications*, 369(1), pp.82–87.
- Sommer, J.R. & Waugh, R. a, 1976. The ultrastructure of the mammalian cardiac muscle cell - with special emphasis on the tubular membrane system. *The American Journal of Pathology*, 82(1), pp.192–232.
- Song, L.S. et al., 2005. Calcium biology of the transverse tubules in heart. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1047, pp.99–111.
- Spurgeon, H.A. et al., 1992. Cytosolic calcium and myofilaments in single rat cardiac myocytes achieve a dynamic equilibrium during twitch relaxation. *Physiology*, 447, pp.83–102.
- Stern, M.D., 1992. Theory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Biophysical journal*, 63(2), pp.497–517.
- Strang, K.T. et al., 1994. Beta-adrenergic receptor stimulation increases unloaded shortening velocity of skinned single ventricular myocytes from rats. *Circulation research*, 74(3), pp.542–549.
- Takeda, S. et al., 2003. Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca(2+)-saturated form. *Nature*, 424(6944), pp.35–41.

- Tsuchiya, H. et al., 2004. Pirfenidone prevents endotoxin-induced liver injury after partial hepatectomy in rats. *Transplantation Proceedings*, 36(7), pp.1975–1976.
- Visner, G.A. et al., 2012. Pirfenidone Inhibits T Cell Activation, proliferation, cytokine and chemokine production, and host alloresponses. *Transplantation*, 88(3), pp.330–338.
- Weber, K., 1997. Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation*, 96(11), pp.4065–4082.
- Welsh, U., 2008. *Histología* 2da ed. J. H. Negrete, ed., Madrid, España: Médica Panamericana.
- Yasuda, S.I. et al., 2007. Cardiac transgenic and gene transfer strategies converge to support an important role for troponin I in regulating relaxation in cardiac myocytes. *Circulation Research*, 101(4), pp.377–386.
- Zahradníková, a et al., 1999. Rapid activation of the cardiac ryanodine receptor by submillisecond calcium stimuli. *The Journal of general physiology*, 114(6), pp.787–798.
- Zhou, H. et al., 2005. Pirfenidone inhibits obliterative airway disease in mouse tracheal allografts. *the journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International society for Hert Transplantation*, 24(10), pp.1577–1585.

APÉNDICE

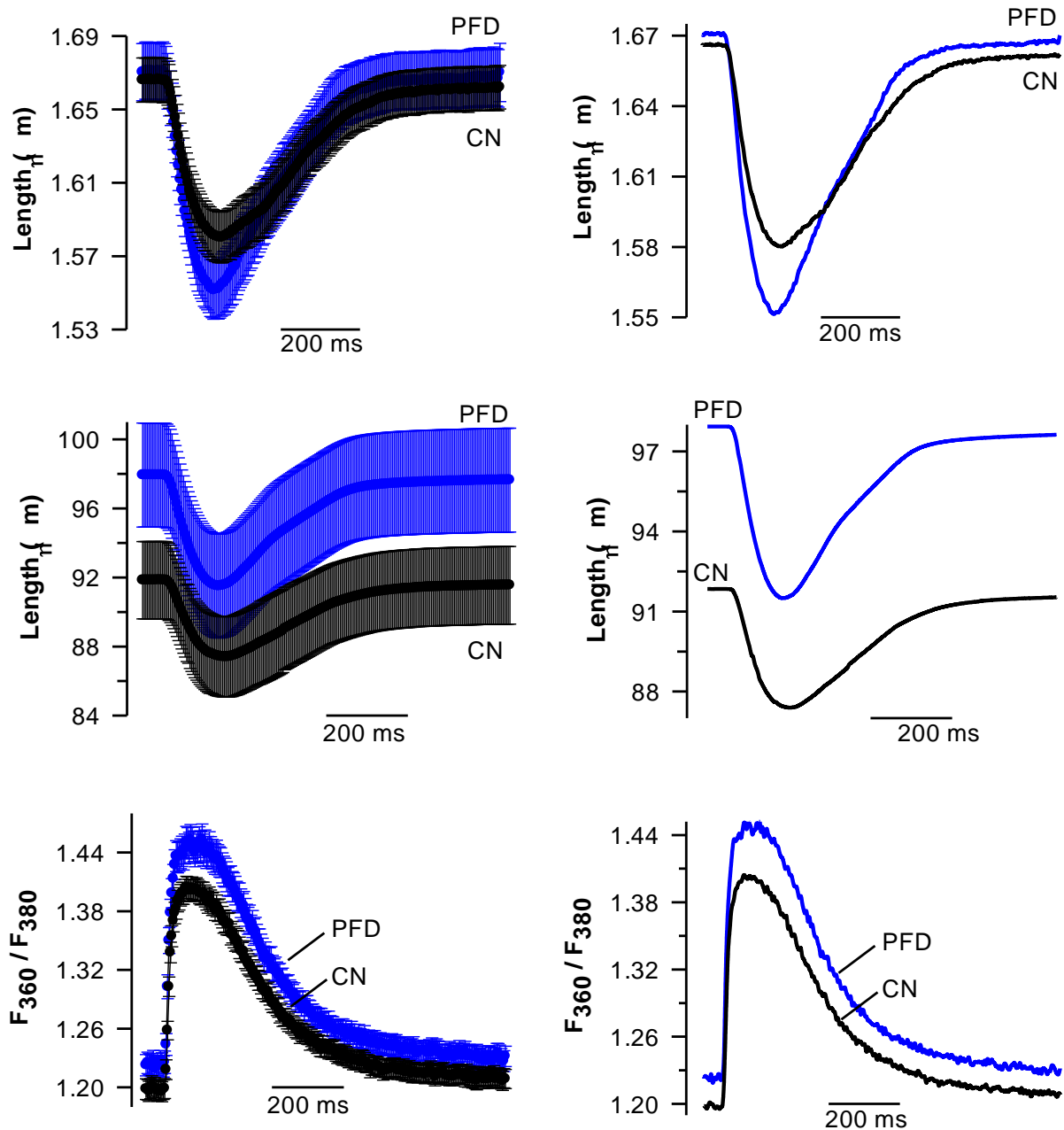


Figura A1. **Comportamiento promedio de las mediciones realizadas con el equipo Ionoptix.** En la izquierda (de arriba hacia abajo) se muestran la media \pm el SE de las todas las mediciones de longitud del sarcómero, longitud celular y transitorios de Ca^{2+} , digitalizadas a una frecuencia de 250 Hz (longitud del sarcómero y celular) y 1000 Hz (transitorio de Ca^{2+} , detalles en Metodología). En la derecha se muestra solamente la media de dichas mediciones.

Tabla A1. Parámetros obtenidos a partir de mediciones de contractilidad y transitorios de Ca^{2+} que no mostraron cambios significativos ($p > 0.05$) en respuesta a pirfenidona. AU (*arbitrary units*)

PARAMETERS	Ca^{2+} TRANSIENT		
	Control	Pirfenidone	P
Diastolic F_{360} (AU)	11958 ± 905	9080 ± 1185	0.12
Diastolic F_{360}/F_{380}	1.20 ± 0.01	1.23 ± 0.01	0.08
Max. vel. output rate of Ca^{2+} (Δ Ratio s^{-1})	19.4 ± 2.61	19.7 ± 2.98	0.63
Transient amplitude (Δ Ratio)	0.21 ± 0.011	0.23 ± 0.013	0.26
Max. vel. input rate of Ca^{2+} (Δ Ratio s^{-1})	0.88 ± 0.04	0.97 ± 0.08	0.07
Time to 50% duration (ms)	255 ± 7	257 ± 7	0.75
Tau (ms)	242 ± 11	232 ± 11	0.52
	SARCOMERE LENGTH		
Diastolic length (μm)	1.67 ± 0.01	1.68 ± 0.02	0.71
Systolic length (μm)	1.56 ± 0.01	1.55 ± 0.02	0.43
Time to peak (ms)	184 ± 9	177 ± 9	0.64
Time to 50% duration (ms)	223 ± 14	213 ± 12	0.94
	CELL LENGTH		
Systolic length (μm)	87 ± 2.27	91 ± 2.96	0.201
Time to peak (ms)	179 ± 8	171 ± 8	0.593
Time to 50% duration (ms)	233 ± 13.9	206 ± 13.0	0.248