



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

Unidad Zacatenco

Departamento de Bioquímica

***Bases moleculares que subyacen el impacto de pirfenidona
en el acoplamiento excitación-contracción de cardiomiocitos***

Tesis que presenta

I. F. Adrián Monsalvo Villegas

Para obtener el grado de

Doctor en ciencias

En la especialidad de

Bioquímica

Director de tesis

Dr. Guillermo Ávila Flores

Ciudad de México

Septiembre 2020

Agradecimientos

Agradezco a mi madre porque sin ella, no hubiera llegado hasta este punto, por sacarme adelante 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; a mi hermano, por ayudarme a conllevar los días difíciles de nuestras vidas; a mi esposa, por su paciencia, apoyo incondicional y por permitirme formar una familia a su lado.

Doy gracias al Dr. Ávila, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por estar siempre dispuesto a compartir su tiempo y apoyarme no solo de manera teórica, práctica, y económica durante estos años, si no también por exigirme y creer en mi. Y por darme la confianza de compartir momentos ajenos al laboratorio. Ha sido todo un honor aprender de usted.

Doy gracias a mis asesores por aceptar formar parte de mi jurado y por todo el tiempo que invirtieron para pulir este trabajo a través de sus sugerencias durante las reuniones de comité como fuera de ellas.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio por tantos momentos de alegría. A Juan por siempre estar dispuesto a ayudarme cuando me encontraba en apuros con el análisis de datos o durante la parte experimental, tu ayuda y compañía siempre fue valorada. A Lupe, por siempre tener tema de conversación y prestarme libros que nunca hubiera leído sino fuera por ti. A Erick por ser tan ocurrente y resolver pacientemente mis dudas cuando recién llegué al laboratorio. A Maricela por demostrarme que con paciencia y perseverancia se puede llegar lejos. A Salvador que más allá de ser nuestro técnico, llegaste para convertirte en un gran amigo, gracias por permitirme convivir con tu familia y compartir muchos momentos de alegría. A Marcelino Flores y a su hijo Javier Flores por apoyarme con el material del laboratorio, por ser ambos tan ocurrentes y por permitirme seguir en contacto con ustedes aún en la lejanía.

A mis compañeros de generación por acompañarme al inicio del posgrado. Gracias a aquellos que siguieron estando a mi lado pese a nuestras personalidades tan diferentes.

Doy gracias a las secretarias por todo su apoyo brindado a lo largo de la maestría. A Angélica por tantas risas compartidas y por nunca descuidar las requisiciones del laboratorio. A Priscila por todo su apoyo y orientación en el área de documentación. A Leticia y Rocío por toda su ayuda y asesoría en el área de control escolar.

También, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt), al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (Cinvestav-IPN) y al departamento de Bioquímica por las becas otorgadas (CVU 555232) y por permitirme realizar mi investigación en sus instalaciones.

CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN	4
Anatomía cardiaca.....	4
Ultraestructura de los cardiomiocitos.....	5
Mecanismo de activación de la maquinaria contráctil	11
Electrofisiología del corazón y canales iónicos	13
Acoplamiento excitación-contracción.....	20
Sistemas que remueven Ca ²⁺ del citoplasma	22
Modulación del AEC por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.....	23
Remodelación cardiaca	27
Aspectos generales de pirfenidona	29
ANTECEDENTES	31
PFD como antioxidante	31
Acción antiinflamatoria de PFD.....	32
Efectos antifibróticos de PFD	32
Posible uso de PFD para tratar enfermedades virales	33
Papel de PFD en el tejido cardiaco.	33
Regulación de canales iónicos por PFD	35
Efectos de pirfenidona en las propiedades contráctiles de cardiomiocitos ventriculares	41
JUSTIFICACIÓN	45
HIPÓTESIS	45
OBJETIVO GENERAL	45
OBJETIVOS PARTICULARES	46
MATERIALES Y MÉTODOS	47
Cultivo primario de cardiomiocitos de rata Wistar adulta.....	47
Experimentos de fijación de voltaje y epifluorescencia.....	49

<i>Recaptura de Ca²⁺ intracelular por la bomba SERCA.....</i>	51
<i>Contenido de Ca²⁺ del RS disponible para ser liberado, actividad del NCX y contribución de sistemas lentos a la remoción de Ca²⁺.....</i>	51
<i>Soluciones de registro.....</i>	52
Contractilidad y transitorios de Ca ²⁺	52
Producción intracelular de NO y ROS.....	55
Ensayos de Western-blot.	55
Análisis estadístico	57
RESULTADOS.....	58
DISCUSIÓN	74
Mecanismos moleculares.....	74
Relevancia fisiopatológica	80
CONCLUSIONES.....	81
PERSPECTIVAS.....	82
REFERENCIAS.....	83

RESUMEN

La pirfenidona (PFD) es un fármaco que ejerce efectos benéficos en el corazón de animales con enfermedad cardíaca. En consecuencia, actualmente se encuentran en marcha ensayos clínicos enfocados a evaluar su uso en pacientes con afecciones cardíacas. Debido a su casi inexorable uso clínico, es sorprendente que el preciso mecanismo de acción subyacente sea altamente desconocido.

Hace algunos años, nuestro laboratorio comenzó a investigar si PFD afecta la electrofisiología de los miocitos cardíacos. Por ejemplo, al acoplamiento excitación-contracción (AEC), el cual es un proceso fundamental en estas células. Lo que ocurre, es que un potencial de acción (PA) abre canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L, provocando una entrada de Ca^{2+} al citoplasma (I_{Ca}). Subsecuentemente, la I_{Ca} activa receptores de rianodina, lo que ocasiona una liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (RS). Los niveles de Ca^{2+} citosólico se elevan, activando la maquinaria contráctil y un acortamiento muscular. De hecho, el aumento en los niveles de Ca^{2+} citosólico es transitorio debido a que la ATPasa de Ca^{2+} del RS (SERCA) reincorpora Ca^{2+} a ese organelo. El intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) también participa en dicha remoción de Ca^{2+} citosólico (hacia el medio extracelular), aunque en menor proporción.

En cardiomiocitos, las isoformas endotelial y neuronal de la óxido nítrico sintasa (eNOS y nNOS) son las responsables de generar óxido nítrico (NO). Éste activa a la guanilato ciclasa (GC), la cual estimula la síntesis de cGMP, modulándose la actividad de fosfodiesterasas e incrementándose la concentración de cAMP. Al final de esta vía de señalización se presenta una mayor actividad de PKA, la cual a su vez regula proteínas que participan en el AEC.

En este trabajo se pretende determinar si PFD afecta al AEC y de ser así, decidir si eso se debe a una regulación de los sistemas que controlan el Ca^{2+} citosólico, así como a una posible interferencia en la vía de señalización del NO y PKA. Con este fin, se desarrollaron experimentos de fijación de voltaje, microfluorometría, western blot y contractilidad. Nuestro modelo celular son cardiomiocitos de rata adulta, cultivados 1-2 días en ausencia (Control) y presencia de PFD.

De esta manera se logró demostrar que PFD regula no sólo a $\text{Ca}_v1.2$ (Ramos-Mondragón et al., 2012) sino también al AEC y la liberación de calcio inducida por calcio (CICR). Adicionalmente, los datos indican que PFD: mejora el nivel y cinética de contractilidad, atenúa el estrés oxidativo, e inhibe la extrusión del Ca^{2+} citosólico a través del NCX y otros mecanismos secundarios. También se encontró que el nivel de expresión del NCX no resulta afectado. De hecho, tampoco se modificó la cantidad de eNOS, mientras que la correspondiente a nNOS mostró un doble efecto, que consistió en incremento y disminución, en miocitos auriculares y ventriculares, respectivamente. Otro efecto interesante fue que, en miocitos auriculares, la mayor cantidad de nNOS se acompañó de una mayor tasa de producción de NO.

Estas acciones de PFD podrían ser un elemento clave para entender cómo es que PFD atenúa las alteraciones que se observan frecuentemente en modelos animales con afecciones cardíacas. Los resultados y secciones esenciales de esta tesis fueron publicados previamente (Monsalvo-Villegas et al., 2018).

ABSTRACT

Pirfenidone (PFD) is a drug that exerts beneficial effects on the heart of animals with heart disease. As a result, clinical trials focused on evaluating its use in patients with cardiac conditions are currently underway. Given its almost inexorable clinical use, it is surprising that the accurate mechanism of action remains highly unknown.

During the past few years, our lab has been investigating whether PFD affects the electrophysiology of cardiac myocytes. For example, the excitation-contraction (EC) coupling, which is a critical process in these cells. What happens is that an action potential (PA) opens voltage-gated Ca^{2+} channels (L-type), and thus originates an influx of Ca^{2+} to the cytoplasm (I_{Ca}). Subsequently, the I_{Ca} activates ryanodine receptors which cause the release of Ca^{2+} from the sarcoplasmic reticulum (RS). Then, the levels of cytosolic Ca^{2+} rise, activating the contractile machinery and muscle contraction. The increase in cytosolic Ca^{2+} is transitory because the RS Ca^{2+} ATPase (SERCA) returns Ca^{2+} into this organelle. The $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) also contributes albeit in smaller proportion and transporting Ca^{2+} towards the extracellular medium.

In cardiomyocytes, the endothelial and neuronal isoforms of nitric oxide synthase (eNOS and nNOS) are responsible for generating nitric oxide (NO). This activates the guanylate cyclase (GC), which stimulates the synthesis of cGMP and modulates phosphodiesterases activity. Subsequently, the concentration of cAMP is increased, and the activity of PKA is stimulated (which, in turn, regulates proteins involved in EC coupling).

This work aims to determine whether PFD affects EC coupling and, if so, to decide whether this effect is due to a possible regulation of the systems that control the homeostasis of Ca^{2+} , as well as a possible interference with the signaling pathway of NO and PKA. To this end, we performed experiments of voltage-clamp, western blot, microfluorometry, and contractility. Our cell model were adult rat cardiomyocytes, grown 1-2 days in the absence (Control) and presence of PFD.

Our data show that PFD regulates not only $\text{Ca}_v1.2$ (Ramos-Mondragón *et al.*, 2012) but also the EC coupling and Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR). Additionally, it was found that PFD: improves the degree and kinetics of contractility, attenuates oxidative stress, and inhibits the extrusion of cytosolic Ca^{2+} that occurs via NCX and other secondary mechanisms. The results also show that the expression level of the NCX was unaltered. Likewise, the amount of eNOS remained unchanged, while that corresponding to nNOS showed a double effect, consisting of increase and decrease, in auricular and ventricular myocytes, respectively. Interestingly, in the former, the largest amount of nNOS occurred in parallel to a higher rate of NO generation.

These PFD actions could be of paramount relevance to understanding how PFD attenuates the adverse consequences in animal models with heart disease. *The results and essential sections of this work were previously published (Monsalvo-Villegas et al., 2018).*

ABREVIATURAS

$[Ca^{2+}]_i$	Concentración de Ca^{2+} intracelular	I_m	Corriente iónica que fluye a través de la membrana
ACA	Acetaldehído	iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
AEC	Acoplamiento Excitación-Constracción	LTCC	Canales de Ca^{2+} tipo L
cAMP	Adenosina monofostato cíclico	mb	Membrana plasmática
cAMP	Adenosina monofostato cíclico	NCX	Intercambiador de Na^+/Ca^{2+}
cGMP	Guanosina monofostato cíclico	nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
cGMP	Guanosina monofostato cíclico	NO	Óxido nítrico
CICR	Liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}	PA	Potencial de acción
CIDV	Canales iónicos dependientes de voltaje	PFD	Pirfenidona
C_m	Capacitancia membranal	PKA	Proteína cinasa dependiente de adenosina monofostato cíclico
cTnC	Troponina C cardiaca	PKG	Proteína cinasa dependiente de guanosina monofostato cíclico
cTnI	Troponina I cardiaca	P_o	Probabilidad de apertura
cTnT	Troponina T cardiaca	RC	Remodelación cardiaca
CTP	Carboxilo terminal proximal	ROS	Especies reactivas de oxígeno
ECM	Matriz extracelular	RS	Retículo sarcoplásmico
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial	RyR2	Canal de Ca^{2+} sensible a rianodina
FA	Fibrilación auricular	SERCA	ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico
FPI	Fibrosis pulmonar idiopática	TGF- β	factor de crecimiento transformante β
G_{max}	Conductancia máxima	TT	Túbulo T
GSH	Glutation reducido	VDCC	Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno	V_m	potencial de membrana
I_{cal}	Corriente de Ca^{2+} tipo L	V_m	Potencial de membrana
IL	Interleucina	β -AR	receptor β -adrenérgico

INTRODUCCIÓN

Anatomía cardiaca

Anatómicamente, el interior del corazón está dividido por una pared muscular (septum), dando origen a la sección izquierda y derecha, constituidas, en cada caso por una pequeña cámara superior denominada aurícula, cuya principal función es recolectar sangre, y otra cámara mayor llamada ventrículo, cuya función principal es el bombeo de sangre (Fig. 1). Las cuatro cámaras, junto con un sistema valvular y células especializadas capaces de contraerse, llamadas cardiomiocitos (también conocidas como miocitos cardiacos), le permiten al corazón ejercer sus principales funciones: i) recibir la sangre desoxigenada del organismo y bombearla a los pulmones (sección derecha; Fig. 1, color azul); y ii) recolectar la sangre oxigenada de los pulmones y bombearla a todos los tejidos del cuerpo (sección izquierda; Fig. 1, color morado) (Laizzo, 2010).

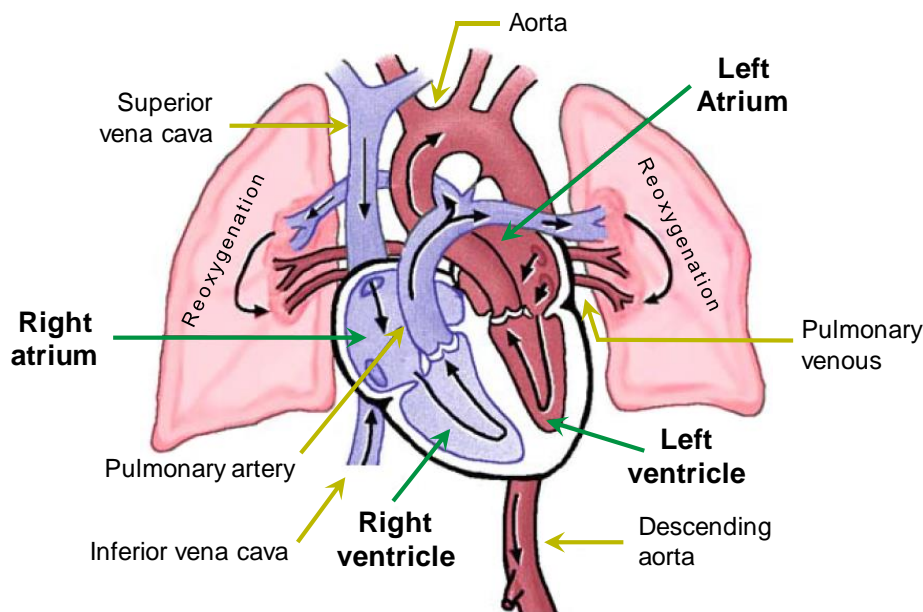


Figura 1. Flujo de sangre a través del corazón y pulmones. La sangre desoxigenada proveniente del organismo llega a la aurícula derecha, vía la vena cava superior e inferior, posteriormente pasa al ventrículo izquierdo para ser bombeada a los pulmones a través de la arteria pulmonar. Una vez reoxigenada, la sangre regresa al corazón por las venas pulmonares, llenando la aurícula izquierda y subsecuentemente pasa al ventrículo izquierdo, para ser bombeada a través de la aorta. Imagen tomada de [Laizzo, 2010].

Cabe mencionar que la etapa en la que los miocitos se encuentran relajados se conoce como diástole, mientras que su contracción da origen a la etapa denominada como sístole. (Laizzo, 2010; Fearnley, Roderick and Bootman, 2011; NIH, 2015). Actualmente, se tiene un gran

conocimiento acerca de la secuencia de eventos a nivel molecular que generan la alternancia entre sístole y diástole, siendo ampliamente aceptado que la transición de diástole a sístole requiere de un acoplamiento electromecánico (conocido como acoplamiento Excitación-Contracción; AEC), que resulta en la contracción del corazón. Por lo que hoy en día 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 cardiaco, el cual se ve alterado en múltiples patologías cardiacas.

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.

Ultraestructura de los cardiomiocitos

Con base al patrón de difracción que se observa en el microscopio, los músculos se pueden dividir en dos grandes grupos: músculo liso y estriado. A su vez, el músculo estriado se divide en esquelético y cardiaco. En todos ellos, la unidad morfológica es una célula especializada llamada “de trabajo” o “miocito”. Estas células tienen la capacidad de contraerse tras una despolarización de su membrana plasmática (potencial de acción, el cual se detallará más adelante). Cabe mencionar que, en caso del tejido cardiaco, a los miocitos también se les llama cardiomiocitos, y también se conocen como auriculares o ventriculares, dependiendo de su ubicación. Así, las fibras del miocardio están constituidas por cardiomiocitos, quienes se mantienen unidos en sitios especializados conocidos como discos intercalares, los cuales se ubican tanto en el extremo longitudinal como de forma escalonada en los extremos transversales (Sjostrand, Andersson-Cedergren and Dewey, 1958). Estas estructuras se clasifican en 3 tipos (Fig. 2): 1) fascia adherente (unión adherente), donde se insertan las terminales de los filamentos de actina a la membrana plasmática, 2) maculae adherente (desmosoma) que proporcionan anclaje a los filamentos intermedios y 3) uniones comunicantes (*gap junctions*) que a su vez participan en la comunicación eléctrica y permiten el paso de iones y moléculas pequeñas entre cardiomiocitos; Ross and Wojciech, 2008; Mezzano and Sheikh, 2012).

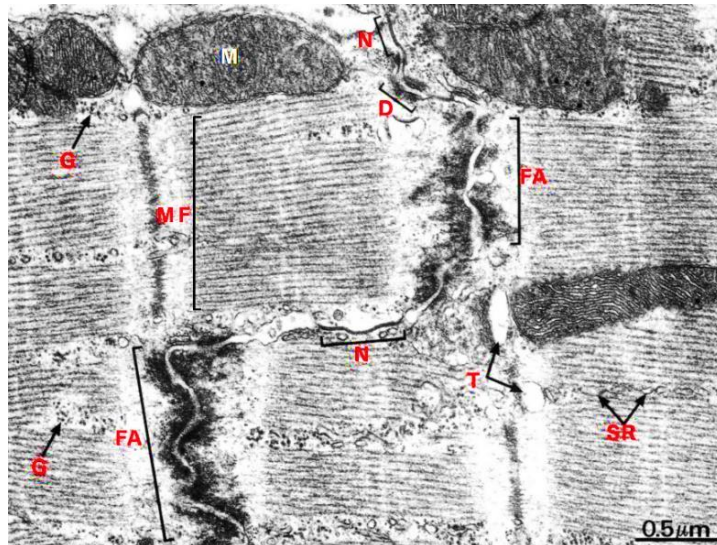


Figura 2. Los discos intercalares actúan como un sistema de unión entre cardiomiocitos. Existen 3 tipos de contacto membrana-membrana: 1) Fascia adherente (FA), 2) Desmosomas (D) y 3) uniones comunicantes (N). Dichos contactos son importantes para coordinar las funciones entre cardiomiocitos. En la micrografía se puede observar el patrón estriado de los miofilamentos (MF), numerosas mitocondrias (M) y gránulos de glucógeno (G), también se distingue el retículo sarcoplásmico (SR) y túbulos T (T). Imagen tomada de [Young, 2000].

Aunque el tamaño de los cardiomiocitos varía de acuerdo con la especie y la edad, sus dimensiones generalmente oscilan entre 25 a 35 μm de ancho, y 100 y 140 μm de largo (Bers, 2001). Al igual que las demás células eucariotas, son células mononucleadas (aunque algunos cardiomiocitos pueden ser binucleados), con aparato de Golgi, lisosomas, peroxisomas, y abundantes mitocondrias que proveen las grandes cantidades de ATP requeridas para que se lleve a cabo la contracción. Sin embargo, también presentan las siguientes peculiaridades, específicas de células contráctiles y eléctricamente excitables.

La membrana plasmática (mb) o sarcolema cuenta con un sistema de invaginaciones que se adentran en la célula, a este sistema tubular se le denomina túbulos T (TT). La morfología del sarcolema difiere no solo a lo largo de la edad del organismo, sino que varía incluso entre miocitos ventriculares y auriculares (Sedarat *et al.*, 2000; Bootman *et al.*, 2006)

En el caso del sarcolema ventricular, se observan TT que miden aproximadamente entre 100 - 300 nm. La función de estas estructuras es propagar el AEC de manera rápida y homogénea en toda la célula (Song *et al.*, 2005). En la rata constituyen aproximadamente el 33-64 % del sarcolema ventricular, ubicándose generalmente a una distancia menor de 0.5 μm de las líneas Z (Page and Surdyk-Droske, 1979; Soeller and Cannell, 1999).

En contraste, en miocitos auriculares los TT representan menos del 15% del sarcolema (Bossen, et al., 1981), y actualmente se sabe que forman una red tubular tan bien organizada como la de los ventrículos (Frisk *et al.*, 2014) cuya orientación es principalmente longitudinal (a diferencia de lo que sucede en miocitos ventriculares, cuya red es tanto longitudinal como transversal; Wagner *et al.*, 2014).

El retículo sarcoplásmico (RS) es una red tubular completamente intracelular y altamente organizada, cuya principal función es almacenar Ca^{2+} y liberarlo al citoplasma en respuesta a potenciales de acción. Dicho organelo se puede dividir conforme a sus propiedades morfológicas, en corbular, cisterna terminal y tubular (Yamasaki *et al.*, 1997). Adicionalmente, se puede nombrar en base a su distribución intracelular, en aquel que se yuxtapone con el sarcolema y en RS libre (Fig. 3).

Cuando el RS y el sarcolema se yuxtaponen dan origen a regiones altamente especializadas conocidas como “junctions”, en las cuales hay una distancia de tan solo 14 nm entre los canales de calcio tipo L del sarcolema ($\text{Ca}_v1.2$) y los receptores de rianodina (RyR2) del RS (Forbes and Sperelakis, 1982). Dicha cercanía es esencial para que se lleve a cabo un proceso denominado liberación de calcio inducida por calcio (o CICR, por sus siglas en inglés). Básicamente, este proceso consiste en que el calcio que entra por los canales L (I_{CaL}) activa una liberación de Ca^{2+} del RS a través de los RyR2.

En función del número de integrantes que conforman las *junctions*, éstas pueden dividirse en triadas o diadas: cuando sólo existe una cisterna del RS acoplada a la periferia del sarcolema es una diada, mientras que una triada se conforma por dos cisternas de RS que flanquean sendos costados de un TT (Fig. 3).

Al igual que sucede con el sarcolema, el RS de los miocitos auriculares y ventriculares también presenta ciertas peculiaridades morfológicas. Por ejemplo, en ventrículo se presentan una mayor cantidad de triadas y diadas, mientras que en miocitos auriculares se presenta más bien lo que conocemos como túbulos Z, que son regiones del RS orientadas perpendicularmente a lo largo del eje de la célula (Fig. 3; Yamasaki *et al.*, 1997). Adicionalmente, los miocitos auriculares presentan dos distribuciones de RyR2: un pequeño grupo que se localiza en la diada (*junctional*

RyR), y el resto se ubican en regiones alejadas de la periferia celular (conocido como *non-junctional RyR2*; Fig. 3), específicamente en el RS corbular y RS localizado en las profundidades del miocito (Fig. 3). Como resultado de dicha distribución, en los miocitos auriculares la señal de Ca²⁺ se inicia en la periferia celular y posteriormente (decenas de milisegundos después) se extiende transversalmente (Franzini-Armstrong, Protasi and Tijskens, 2005).

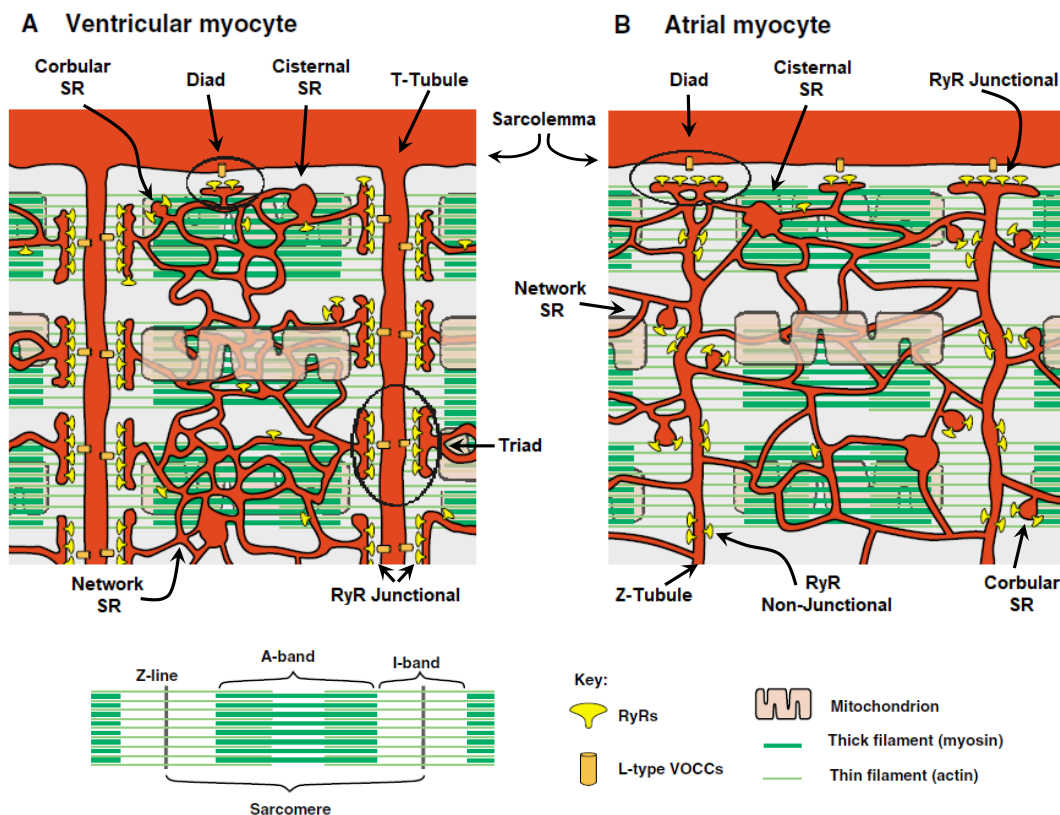


Figura 3. Diferencias estructurales entre miocitos ventriculares y auriculares. Los miocitos ventriculares (A) presentan túbulos T mientras que los miocitos auriculares (B) poseen túbulos Z. En comparación con los miocitos auriculares, los ventriculares presentan un mayor número de junctions (es decir; sitios donde se yuxtaponen el sarcolemma y el RS, también conocidas como diadas o triadas). Esquema tomado de [Bootman et al., 2006].

En ambos casos (miocitos auriculares y ventriculares), un daño en la integridad de su red tubular se traduce en transitorios de Ca²⁺ de menor amplitud y asincrónicos (Gómez et al., 1997; Louch et al., 2004; Song et al., 2005, 2006; Nivala et al., 2015). Dicho daño se llega a observar en diversas cardiopatías, tales como: fibrilación auricular (Lenaerts et al., 2009), insuficiencia cardiaca, y miocardiopatía dilatada e isquémica (He et al., 2001; Lyon et al., 2009). Lo anterior se debe a que, tras la pérdida del sistema tubular, el tamaño del área de yuxtaposición entre el sarcolemma y el RS se ve dramáticamente reducido, promoviendo que los RyR2s se queden “huérfanos”; es decir,

sin el debido control por parte de I_{CaL} . Debido a lo anterior, durante el potencial de acción dichos receptores se abren de manera irregular (Song *et al.*, 2006) afectándose la contractilidad cardiaca (Gómez *et al.*, 1997).

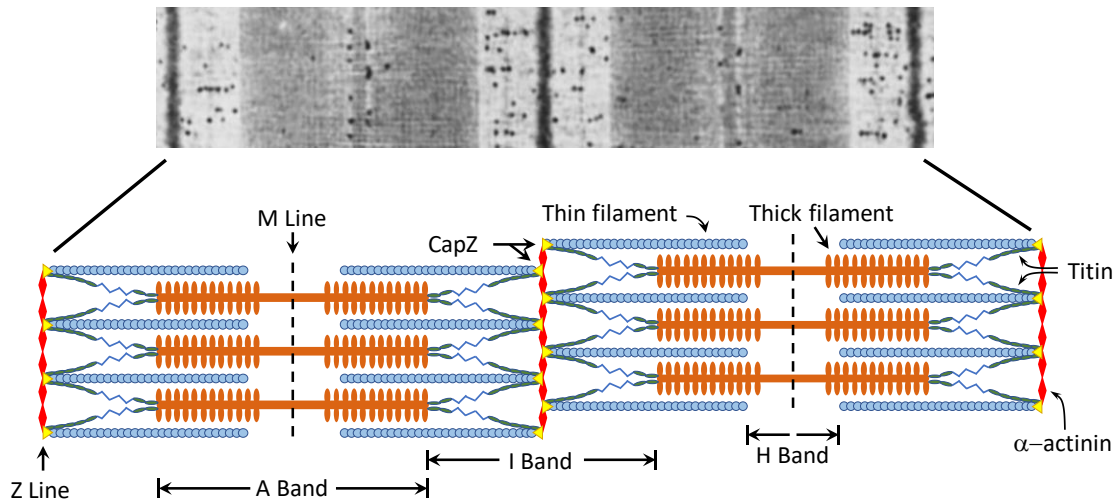
Ibrahim y colaboradores (2012) demostraron, en un modelo de infarto al miocardio, que la pérdida de los TT puede restablecerse cuando se normaliza la carga mecánica en el corazón (Ibrahim *et al.*, 2012). De hecho, el mismo grupo de trabajo demostró que la estructura de los TT depende, en gran medida, de la intensidad y duración de la carga mecánica a la que es sometida (Ibrahim *et al.*, 2012), lo cual ayuda a entender por qué la red tubular se reestablece (en miocitos ventriculares de un modelo de infarto al miocardio) tras un régimen de ejercicio, que dura 4 semanas (Kemi *et al.*, 2011).

Farmacológicamente, también es posible restablecer las alteraciones en el acoplamiento EC que provoca la pérdida de los TT. Por ejemplo usando un agonista β adrenérgico como el isoproterenol, el cual revierte una reducción y enlentecimiento de los transitorios de Ca^{2+} , provocados por la pérdida de los TT mediante un choque osmótico (Brette *et al.*, 2004).

Los miofilamentos (maquinaria contráctil) son un conjunto de proteínas altamente organizadas y clasificadas para su estudio en filamentos delgados, gruesos y proteínas accesorias. Esta maquinaria se encarga de transducir un cambio en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) en energía mecánica. Cabe resaltar que los miofilamentos son los componentes que mayor volumen celular ocupan (del 40 al 50%; Page *et al.*, 1971). De hecho, la orientación espacial que presentan los miofilamentos gruesos y delgados, al interior del cardiomiocito crea un patrón repetitivo de bandas claras y oscuras observable a través de microscopía óptica (bandas I, A, H y líneas Z y M; Fig. 4). A la región delimitada por dos líneas Z se le conoce como la unidad funcional contráctil de los miocitos o *sarcómero* (Sommer and Waugh, 1976; Ross and Wojciech, 2008; Silverthorn, 2009).

Los miofilamentos delgados están formados por actina globular (*actina G*), la cual se organiza en forma de doble hélice, o actina filamentosa (*actina F*). Este polímero está decorado por diversas proteínas accesorias, dentro de las que destacan aquellas que actúan como reguladores durante el proceso de contracción: la tropomiosina (Tm) y el complejo de troponinas. La primera consiste

en una doble α -hélice con cargas negativas (principalmente), lo que le permite interactuar con los surcos positivos de F-actina (cada 7 monómeros de actina es posible encontrar a una Tm,



anclada). De hecho, la Tm rodea y provee estabilidad a la F-actina (Von Der Ecken *et al.*, 2015).

Figura 4. Organización del sarcómero. La imagen superior muestra una imagen del sarcómero tomada por microscopía electrónica de una célula muscular cardíaca, los puntos son pequeños cúmulos de glucógeno. Tomada de (Fawcett and McNutt, 1969). Debajo se muestra un esquema del sarcómero. Las líneas Z y M representan los límites laterales y el centro del sarcómero, respectivamente. 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.

La tropomiosina, además, tiene unido un complejo de troponinas, que está formado por las siguientes subunidades: *troponina C* (cTnC, por su capacidad de unir Ca^{2+}), *troponina I* (cTnI, subunidad inhibidora) y *troponina T* (cTnT, es la que se une a la Tm). La F-actina no sólo funciona de andamiaje para otras proteínas que regulan la activación de los miofilamentos, sino también contiene sitios de unión para filamentos gruesos, que son indispensables para que se lleve a cabo la contracción (Oda *et al.*, 2009).

La *miosina II* es la proteína motora del sarcómero y el principal componente de los filamentos gruesos. Se distingue por contener una porción larga cuya función es básicamente estructural y un dominio globular que desarrolla la actividad motora (también llamado "cabeza"), gracias a que tiene actividad ATPasa. Se estima que en el músculo cardíaco ~ 300 moléculas de miosina se agrupan cola con cola para formar un filamento grueso. Cada molécula es un hexámero, formado por cuatro cadenas ligeras y dos pesadas, dando origen a una cola α -helicoidal de 150-160 nm (considerada como el eje central de los filamentos gruesos). La cabeza forma parte de las cadenas pesadas, se une a actina y convierte el ATP en energía mecánica (Sweeney and Houdusse, 2010).

La presencia de ciertas proteínas, consideradas como accesorias, logra mantener la yuxtaposición entre los filamentos gruesos y delgados, así como una correcta alineación de éstos. Dentro de las principales se encuentran: titina, α -actinina y Cap-Z (Fig. 4). La titina es una proteína flexible que funciona como resorte y regula la longitud y distensibilidad del sarcómero. Además, contiene dominios homólogos a la fibronectina-3 (Fn3) y dominios semejantes a la inmunoglobulina (dominios Ig). Estas características le permiten unirse a actina y miosina, lo que a su vez resulta en el correcto alineamiento de los miofilamentos (Castro-ferreira *et al.*, 2009). Por su parte, la α -actinina y Cap-Z (Fig. 4) actúan como anclas, que alinean a los filamentos delgados con la línea Z (Garrido Pertierra *et al.*, 2006; Silverthorn, 2009).

Mecanismo de activación de la maquinaria contráctil

Desde que los trabajos de Ebashi (1963) demostraron que una mezcla de troponina con tropomiosina era la responsable de la respuesta al Ca^{2+} en la contractilidad del músculo estriado (Ebashi, 1963), se han hecho grandes avances en la comprensión de los cambios en las interacciones proteicas originadas durante la activación de los miofilamentos. De hecho, para los años 1990's ya se tenía una idea bastante precisa (pero incompleta) de lo que ocurría durante la contracción muscular. Sin embargo, no fue hasta inicios del siglo XXI que los avances en la cristalografía, rayos-X, criomicroscopía electrónica, etc., ayudaron a caracterizar profundamente los cambios en las interacciones del complejo actina-Tn-Tm y miosina que se llevan a cabo en la contracción. Sin embargo, para comprender de mejor manera lo que ocurre al activarse la maquinaria contráctil, se mencionarán algunas características del estado relajado.

Durante la diástole, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es relativamente baja (~ 100 nM), por lo que el sitio de la cTnC que une calcio se encuentra ocupado por magnesio. Adicionalmente, la porción COOH-terminal de la cTnI (región inhibitoria) se encuentra unida a actina. Como consecuencia, el complejo Tn-Tm está localizado en una región periférica de los filamentos de actina y eso impide que la cabeza de miosina interaccione con actina (Fig. 5A; Potter and Gergely, 1974).

El ATP por su parte, se encuentra unido a la cabeza de miosina, la cual hidroliza al ATP; sin embargo, la energía no se utiliza inmediatamente, ya que ni el ADP ni el P_i es liberado (estado conocido como "miosina activada", o *pre-powerstroke*, (configuración M-ADP- P_i , Fig. 5B; Sweeney and Houdusse, 2010).

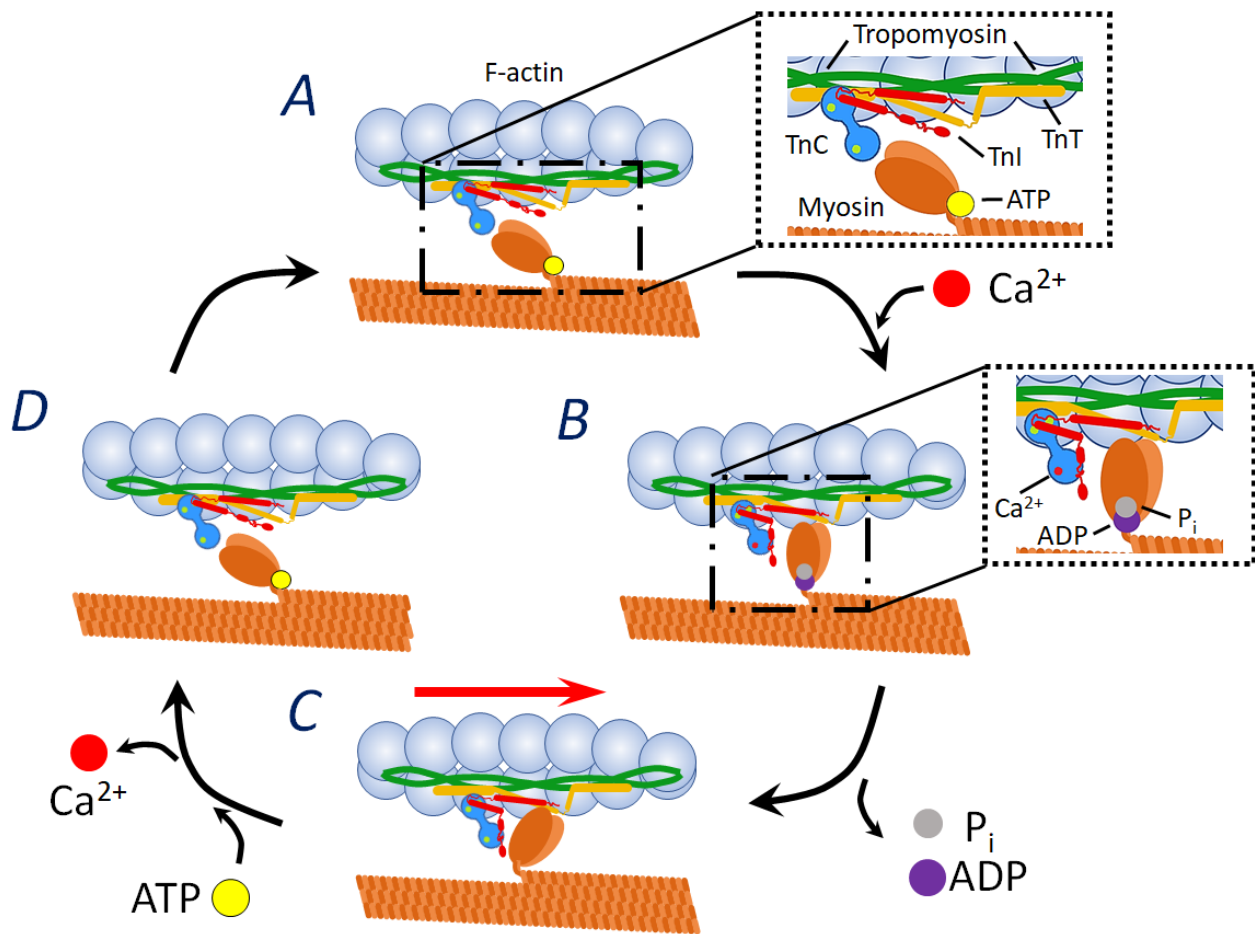


Figura 5. Ciclo de activación y desactivación de la maquinaria contráctil. A) Cuando la $[Ca^{2+}]_i$ es baja (diástole), cTnC se encuentra en su conformación cerrada y cTnI unida a F-actina, impidiendo la formación de los puentes cruzados, B) Durante un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, el ion se une al sitio modulador de cTnC, modificándose la estructura de éste y provocando una unión de cTnI y cTnC. Esto, a su vez, desplaza el complejo Tn-Tm al interior del “surco” de F-actina, permitiendo la unión de miosina con actina (actomiosina). Nótese que la hidrólisis de ATP provoca una modificación espacial de la cabeza de miosina, y que en ésta todavía se mantienen unidos los productos de la hidrólisis (ADP y fósforo inorgánico o P_i). C) El P_i se libera, fortaleciéndose los lazos del complejo actomiosina. Subsecuentemente se libera el ADP y la cabeza de la miosina desplaza hacia el centro del sarcómero a los filamentos delgados (línea roja). D) Cuando la $[Ca^{2+}]_i$ regresa a valores diastólicos, el ion se disocia de cTnC y la cTnI se une nuevamente a actina. Adicionalmente una nueva molécula de ATP se une a la cabeza de miosina, disociándose el complejo actomiosina. Figura basada en las referencias señaladas en el texto.

Cuando la $[Ca^{2+}]_i$ aumenta, este ion se une al sitio regulador II de cTnC, provocando cambios conformacionales que desestabilizan la interacción del complejo cTnI-actina. De esa manera se favorece la unión de cTnI con el extremo COOH-terminal de cTnC (Fig. 5B; Takeda, 2005). Esta unión genera, a su vez, cambios estructurales que provocan un desplazamiento de la Tm hacia el interior de actina-F. De esa manera se elimina un bloqueo estérico que basalmente ejerce el

complejo Tn-Tm. Adicionalmente, se libera la región de actina que posee los sitios de unión a miosina, permitiendo una unión entre miosina con actina (complejo denominado actomiosina, Fig. 5B; Behrmann *et al.*, 2012).

Una vez formado el complejo actomiosina, se libera el P_i que hasta ese entonces se encontraba unido a la miosina, provocando que la interacción Actina-Miosina se fortalezca. Subsecuentemente, se libera el ADP, y eso provoca una flexión de la cabeza de miosina (de $\sim 45^\circ$), desplazando a los filamentos delgados hacia el centro del sarcómero (movimiento conocido como *powerstroke*, Fig. 5C).

Finalmente, se reincorpora ATP a la miosina y eso provoca que se disocie el complejo actomiosina (Fig. 5D). El ciclo se repite ya sea hasta que la $[Ca^{2+}]_i$ disminuya a niveles diastólicos o bien hasta agotarse el ATP (estado conocido como *rigor mortis*; Sweeney and Houdusse, 2010).

Electrofisiología del corazón y canales iónicos

El corazón es una bomba rítmica electromecánica, cuyo funcionamiento depende de la generación y propagación del potencial de acción (PA), ya que éste es el evento inicial que genera la contracción y por ende la irrigación sanguínea. El sistema de conducción del PA, se detalla en la Figura 6.

El PA de cardiomiocitos auriculares y ventriculares, parte de un potencial de reposo cercano a -85 mV ó -90 mV y se compone de cinco fases (Fig. 7). La fase 0 (o despolarización rápida), se origina por una entrada de sodio a través de canales de Na^+ dependientes de voltaje ($Na_v1.5$). Posteriormente, los canales de Na^+ se inactivan, a la vez que se activan canales de K^+ . Se presenta una corriente saliente transitoria de K^+ (I_{to}) que lleva el potencial de membrana a un valor cercano a +20 ó +10 mV (fase 1).

La fase 2 o de meseta, es el resultado de un balance entre corrientes repolarizantes de rectificación tardía de K^+ (ej. I_{Ks} e I_{Kr}) y una corriente despolarizante de Ca^{2+} (I_{CaL}), originada por la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (LTCC). Dicha entrada de Ca^{2+} activa lo que conocemos como CICR y por ende, la contracción. Los LTCCs se inactivan y eso permite que predomine el efecto repolarizante de las corrientes de K^+ (fase 3 o de repolarización tardía).

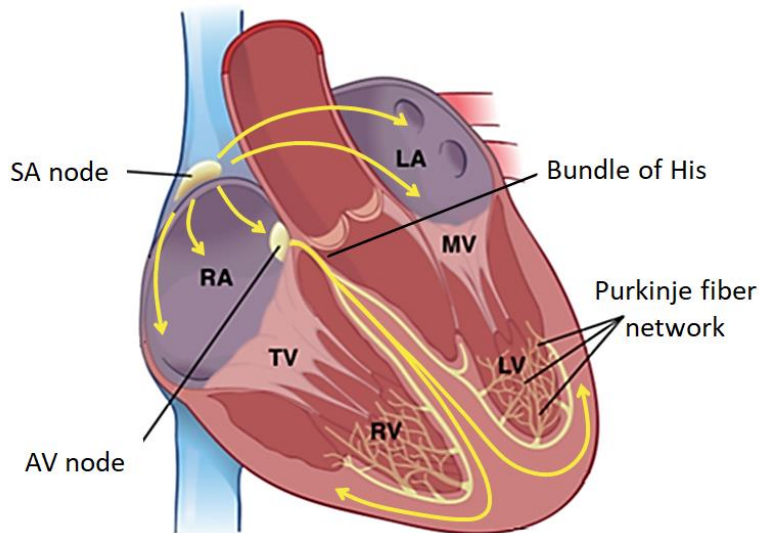


Figura 6. Sistema de conducción del potencial de acción cardíaco. El PA se genera por las células marcapasos del nodo seno-auricular (SA node) y se propaga rápidamente (flechas amarillas) a través de las aurículas derecha e izquierda (RA y LA, respectivamente) propiciando su contracción. Subsecuentemente, llega al nodo auriculoventricular (AV node), sufre un ligero retardo, y luego continúa su recorrido por el haz de His y las fibras de Purkinje. Finalmente, se dispersa a través de los ventrículos derecho e izquierdo (RV y LV, respectivamente) provocando contracción en estos tejidos y dando por terminado el latido cardíaco. [Tomada de Munshi, 2012].

Finalmente, la fase 4 representa el potencial de reposo, dictado en gran medida por una alta conductancia a K^+ (debida a canales de rectificación entrante o I_{K1} ; Nerbonne and Kass, 2005; Amin, Tan and Wilde, 2010; Santana, Cheng and Lederer, 2010).

Cabe resaltar tres aspectos del PA cardíaco: *i)* su capacidad de propagarse a través de las uniones comunicantes, lo que permite despolarizar a células adyacentes con sincronía, provocando que el corazón funcione como un sincitio, tanto eléctrico como mecánico (De Bakker and Van Rijen, 2006); *ii)* su duración de ~ 300 ms no sólo previene lo que se conoce como re-excitación eléctrica, sino que también da tiempo para que se lleve a cabo la contracción y relajación antes del siguiente estímulo (Bers, 2001) y *iii)* debido a una expresión diferencial de subtipos de canales iónicos, su forma varía con la edad, especie e incluso entre regiones del corazón (Huang *et al.*, 2017). Lo anterior puede apreciarse en la Fig. 7, donde se observa que en miocitos auriculares la fase 2, es más corta con respecto a la de los miocitos ventriculares (Nerbonne and Kass, 2005).

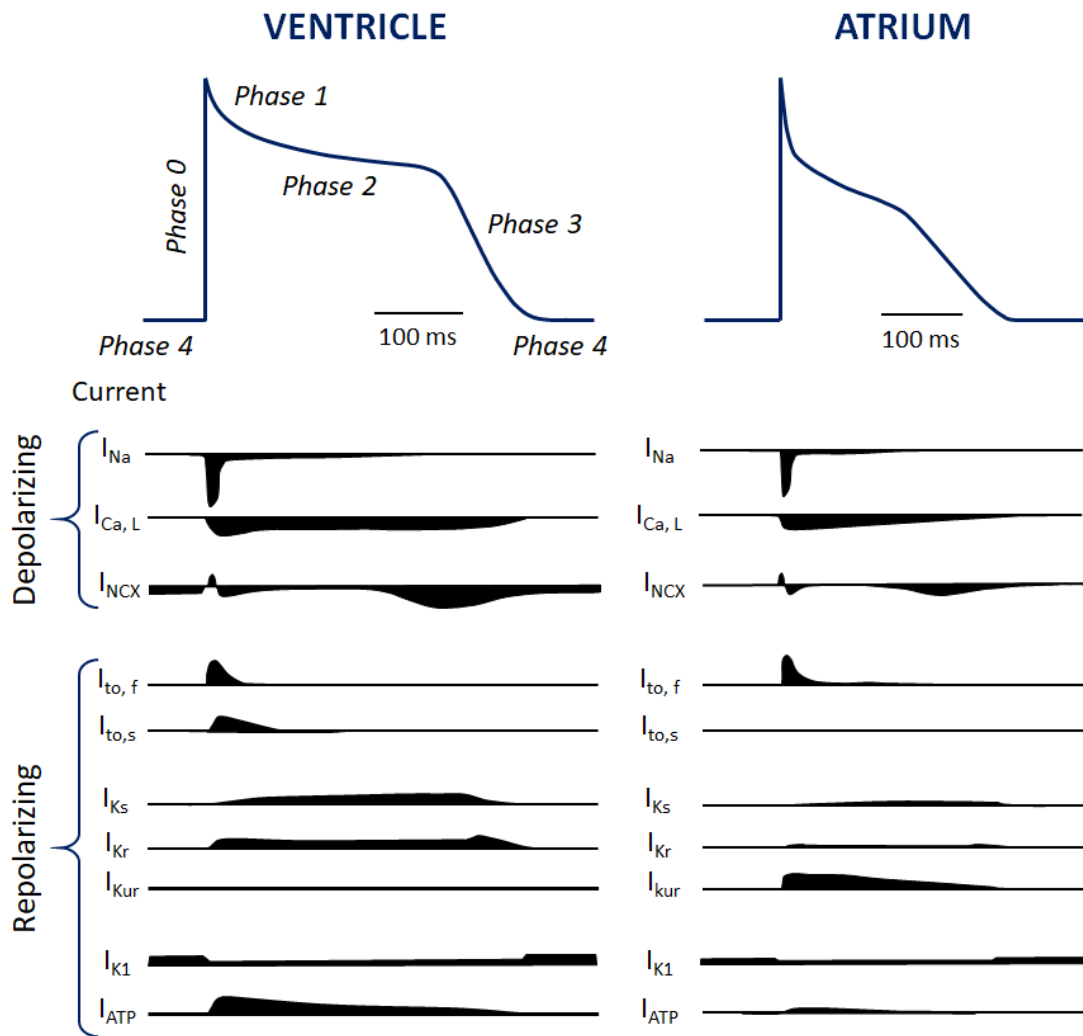


Figura 7. Corrientes iónicas que subyacen el potencial de acción. Las figuras superiores esquematizan las cinco fases del PA ventricular (Izquierda) y auricular (Derecha). En la parte inferior se ilustran las corrientes iónicas involucradas. Dichas corrientes pueden ser entrantes (provocando despolarización) o salientes (provocando repolarización). Las corrientes de K^+ se pueden dividir en corrientes transitorias ($I_{to,f}$ e $I_{to,s}$), sostenidas (I_{Ks} , I_{Kr} , e I_{Kur}), y de rectificación entrante (I_{K1} e I_{KATP}). Modificada de Nerbonne and Kass, 2005.

El PA depende en gran medida, de la actividad de canales iónicos dependientes de voltaje (CIDV). Éstos se agrupan en una superfamilia, que a su vez se divide en familias de canales de Na^+ , Ca^{2+} y K^+ (Fig. 8).

Los CIDV son proteínas transmembranales formadoras de un poro, conocidas como subunidades “ α ”. Las subunidades α de los canales de Na^+ y Ca^{2+} , poseen cuatro dominios homólogos (D1-D4), cada uno formado por 6 segmentos transmembranales (S1-S6), siendo los segmentos S5 y S6 de cada dominio, los responsables formadores del poro y la región que une dichos segmentos forma el filtro de selectividad del canal. La capacidad de responder a los cambios del E_m es conferida por

el segmento S4, el cual contiene amino ácidos cargados positivamente, dando origen al sensor de voltaje (Huang *et al.*, 2017).

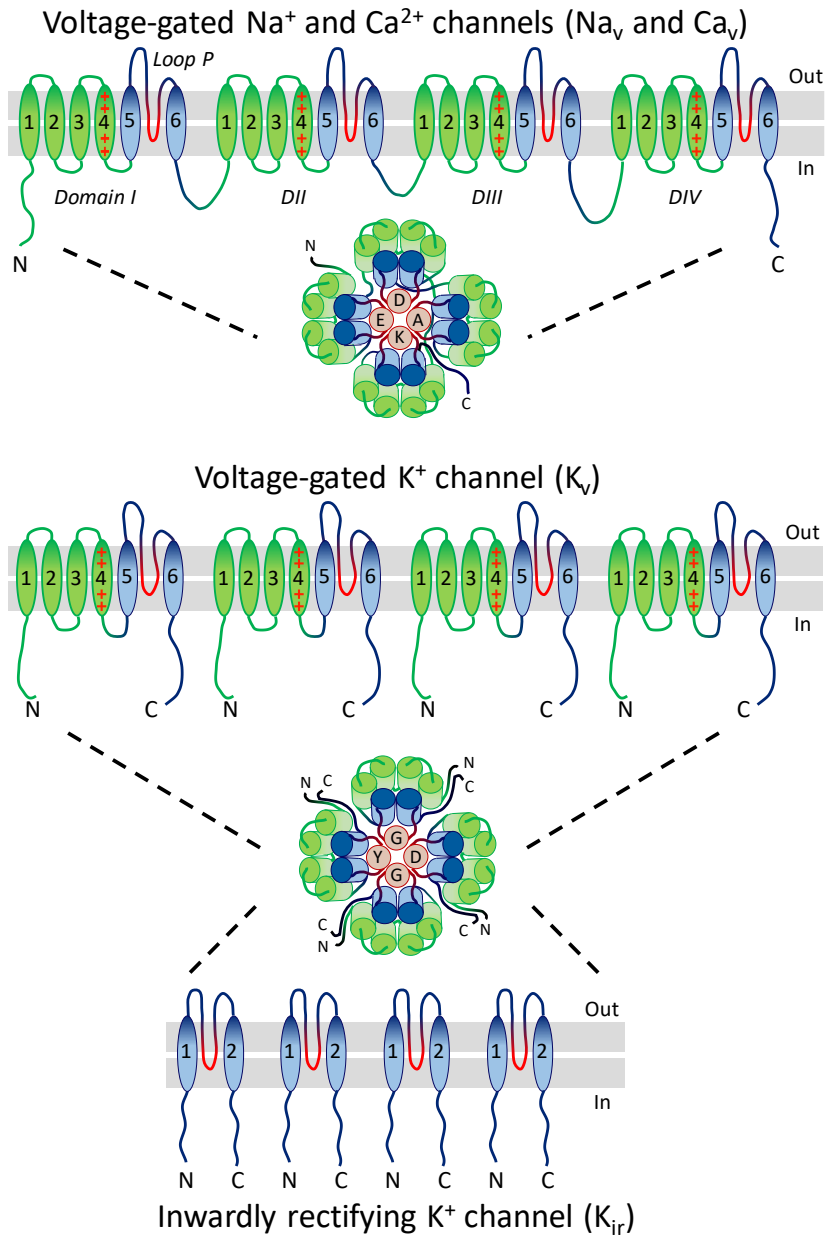


Figura 8. Esquema que ilustra propiedades estructurales básicas de los canales iónicos dependientes de voltaje. Los canales de Na⁺ y Ca²⁺ se forman a partir de una subunidad principal o α , que consiste en cuatro dominios repetidos homólogos (DI-IV). Cada uno de ellos contiene, a su vez, seis segmentos transmembranales (S1-S6). Por su parte, los canales de K⁺ son tetrámeros de subunidades α formadas por ya sea seis o dos segmentos transmembranales. Los segmentos S4 funcionan como sensores de voltaje, mientras que los segmentos S5-S6 forman el poro del canal y el loop transmembranal que los une (loop P) confiere selectividad iónica. El filtro de selectividad a Na⁺ está formado básicamente por los aminoácidos DEKA. Mientras que la selectividad a Ca²⁺ está dada por la secuencia EEEE (canales de alto umbral o HVA), o bien DDEE (de bajo umbral o LVA). En el caso de los canales K el filtro de selectividad esta dado por los aminoácidos TVGYGD. Basada en Moczydlowski, 2017.

Por otra parte, los canales K_v están compuestos por cuatro subunidades α , que forman una estructura homóloga a la de los Na_v o Ca_v , ya que cada subunidad formadora del tetrámero posee seis segmentos transmembranales, siendo los segmentos S4 los responsables del sensor de voltaje y los segmentos S5 y S6 tienen la misma función que la de los Na_v o Ca_v , (Fig. 8).

Existen canales de K^+ que si bien no son directamente dependientes del E_m , tienen un papel importante en el mantenimiento de la fase 4 del PA cardiaco. Estos canales se conocen como de rectificación entrante (K_{ir}), cuya principal característica es que permiten más fácilmente la entrada de iones K^+ (con respecto a su salida), lo cual define su carácter rectificador. Como los otros canales de K^+ , K_{ir} también es un tetrámero, pero cada dominio posee solo dos segmentos transmembranales (análogos a S5 y S6), los cuales están unidos por un lazo extracelular que en conjunto forman el poro y el filtro de selectividad (Fig. 8). Durante una despolarización K_{ir} está bloqueado por Mg^{2+} intracelular y poliaminas. Sin embargo, dicho bloqueo se elimina en la hiperpolarización permitiendo el flujo de K^+ (Kuang, Purhonen and Hebert, 2015).

De los canales antes mencionados, el canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje (VDCC, por sus siglas en inglés) cobra un interés muy particular en la fisiología cardiaca, ya que permiten la entrada de Ca^{2+} al interior de la célula y éste actúa como mensajero químico en diversas funciones celulares como: modulación de la excitabilidad de la membrana, transcripción génica, regulación enzimática, contracción muscular, etc., se podría decir que los VDCC son los puentes que enlazan las señales eléctricas de la superficie con las respuestas bioquímicas intracelulares.

Actualmente, la forma más empleada de nombrar a los canales es la sugerida por Ertel y colaboradores, donde se emplea el símbolo químico del ion que fluye principalmente (Ca), seguido (en subíndice) del principal regulador fisiológico, ej. voltaje (v). Posteriormente, se coloca el número correspondiente a la subfamilia, seguido del número que indica el orden en que se clonó 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 ser clonado dentro de su subfamilia.

En mamíferos, se han detectado 10 isoformas de la subunidad principal de los canales de calcio (α_1). Los genes respectivos se denominan CACNA1x (Fig. 9; Dolphin, 2016). Con base en el rango

de voltaje en el que se activan, a estos canales se les denomina de alto y bajo umbral de activación (HVA y LVA, respectivamente por sus siglas en inglés). Las subfamilias Ca_v1 y Ca_v2 son HVA y se encuentran principalmente en músculo esquelético, liso y cardiaco, al igual que en neuronas. A los canales Ca_v1 ($Ca_v1.1-1.4$) también se les llama de tipo L (LTCC, por sus siglas en inglés; Lacinová, 2005), debido a su alta conductancia unitaria de ~ 25 pS (*Large*) y su lenta cinética de decaimiento (*Long Lasting*). También se les conoce como receptores de dihidropiridinas (DHPRs, por sus siglas en inglés), pues son modulados por relativamente bajas concentraciones de estos fármacos (Hille, 1992).

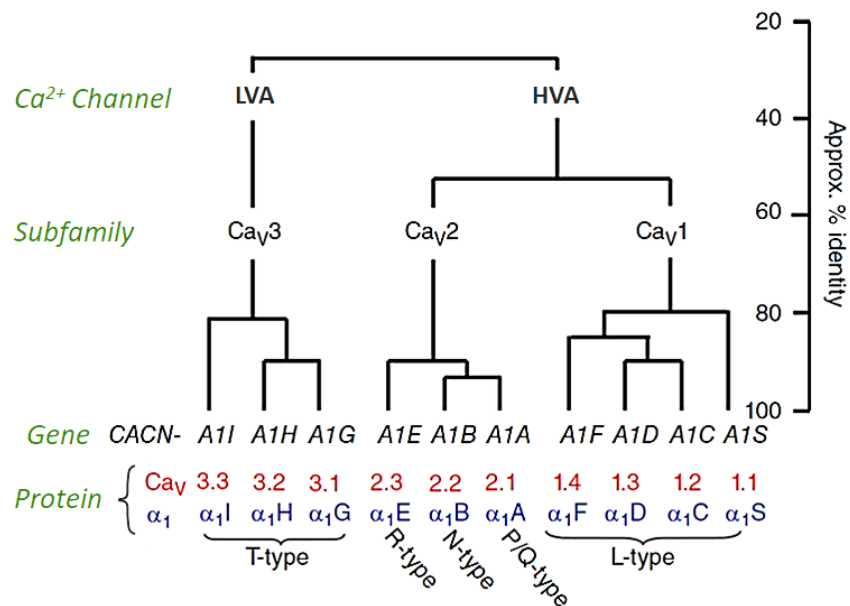


Figura 9. Homología y clasificación de las subunidades principales de los canales de calcio (α_1). Los VDCCs se dividen en LVA y HVA. También se les ha clasificado en tres subfamilias, las cuales comparten un 50% de identidad entre ellas (Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3). Por su parte, el porcentaje de identidad, al interior de una subfamilia, es cercana a un 80%. (Tomada de Dolphin, 2016).

La subunidad α_{1D} ($Ca_v1.3$) se ha detectado en los nodos sinusal, auriculoventricular y miocitos auriculares, mientras que los ventrículos de adulto expresan exclusivamente a α_{1C} ($Ca_v1.2$; Benitah, Alvarez and Gómez, 2010; Ríos-Pérez *et al.*, 2016). Aunque α_{1C} posee un peso de 250 KDa, en los *western-blots* se detecta una banda prominente de 190 kDa, que se atribuye a una escisión del extremo COOH-terminal (De Jongh *et al.*, 1996).

Además de la subunidad principal, también existen subunidades accesorias que modulan las propiedades biofísicas y del canal. Tal es el caso del dímero $\alpha_2\text{-}\delta$ (de 170 kDa) que se encuentra unido por puentes disulfuro y es codificado por un mismo gene. Sus efectos consisten en

incrementar la densidad de canales en la mb así como la velocidad de inactivación del canal (Dolphin, 2018). β , por su parte (55 kDa), promueve el tráfico del canal a la mb y lo previene la degradación proteosomal (Altier *et al.*, 2011). La otra subunidad accesoria, γ (33 kDa), se expresa principalmente en músculo esquelético y aparentemente presenta cuatro pases transmembranales (Wang *et al.*, 2004).

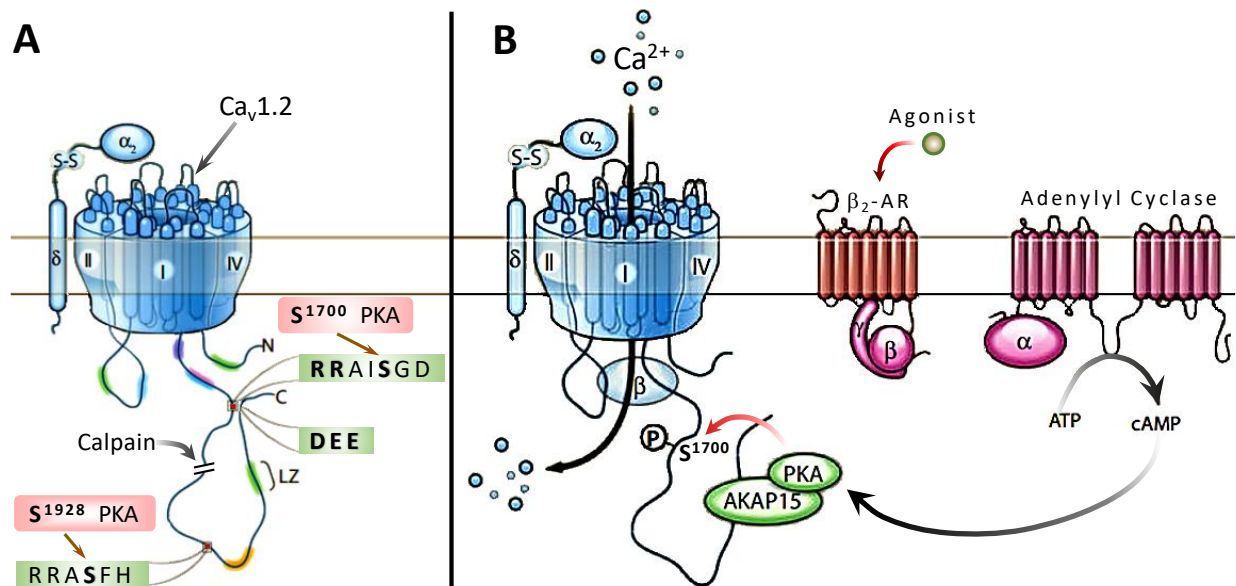


Figura 10. Regulación de $Ca_v1.2$ por PKA y agonistas betaadrenérgicos. (A) Se ilustra a α_{1C} unida con α_2 - δ , así como dos sitios a los cuales se une la subunidad β (marcas en azul cielo), uno de ellos en el loop que une los dominios I y II y otro en el carboxilo terminal proximal (CTP), el cual también posee el motivo canónico de unión a calmodulina, IQ (color rosa). En los sitios verdes se unen proteínas que anclan a PKA AKAPs (del inglés A-kinase anchor proteins), siendo el segmento conocido como zipper-like (LZ) del carboxilo terminal distal (CTD) el único bien caracterizado hasta el momento. En naranja, se muestra el sitio de unión para la fosfatasa PP2A, encargada de revertir las fosforilaciones por PKA (se esquematizan los residuos S^{1700} y S^{1928}). Nótese que calpaína escinde en el residuo 1800, sin embargo, es posible hallar unido el CTP al CTD debido a las interacciones electrostáticas de R^{1696} y R^{1697} con los aminoácidos D^{2103} , E^{1206} y E^{2110} . (B) La activación de los receptores β adrenérgicos (β -AR) recluta a una vía de señalización que promueve el anclaje de PKA a AKAP15, promoviendo una fosforilación en el residuo S^{1700} , y eventualmente, un cambio conformacional en que conlleva a un incremento en la actividad del canal (mayor probabilidad de apertura y capacidad para abrirse a potenciales de membrana más negativos). Modificada de Hell, 2010.

La actividad de los LTCC también es modulada por otras proteínas, tales como calmodulina (CaM) y una cinasa dependiente de adenosín monofostato cíclico (cAMP), o PKA. En cuanto a CaM, se sabe que funciona como un sensor de Ca^{2+} y se encuentra unida a la región del COOH-terminal proximal (CTP) de los canales de Ca^{2+} , en un dominio conocido como IQ (Fig. 10A). Cuando el ion

se une a la proteína, ésta sufre un cambio conformacional que se transmite al CTP, provocando que se inactiven los canales LTCC (Peterson *et al.*, 1999). A este fenómeno se le conoce como inactivación dependiente de Ca^{2+} y también se presenta en canales de la subfamilia Ca_v2 (Liang *et al.*, 2003).

Por otra parte, la fosforilación de los canales por PKA resulta en una mayor actividad de los mismos. En el caso particular de $\text{Ca}_v1.2$, la PKA fosforila los siguientes residuos: Ser^{1700} , Thr^{1704} y Ser^{1928} (De Jongh *et al.*, 1996; Fuller *et al.*, 2010). Este tipo de modulación se recluta en respuesta a una aplicación de agonistas β adrenérgicos. Brevemente, lo que sucede es que una vez que un agonista activa al receptor β -adrenérgico (β -AR), la subunidad α de la proteína G, se disocia del dímero $\beta\gamma$, uniéndose a la enzima adenilato ciclasa (AC), lo que incrementa la producción del cAMP, el cual a su vez se une a PKA, permitiendo que sus dos subunidades catalíticas sean liberadas, las cuales se unen a la proteína 15 de anclaje de la cinasa A (AKAP15, por sus siglas en inglés) favoreciendo la fosforilación del residuo Ser^{1700} , esto promueve la disociación del efecto autoinhibitorio del CTP y aumenta la probabilidad de apertura del canal (P_o), provocando un aumento en la I_{CaL} (Fig. 10B) (Fuller *et al.*, 2010).

Acoplamiento excitación-contracción

En 1883 Ringer demostró que el corazón de rana sólo se contrae en presencia de Ca^{2+} extracelular (Ringer, 1883). Mucho tiempo después, se observó en fibras de músculo esquelético, que el Ca^{2+} que proviene del medio extracelular actúa como agonista para provocar liberación de Ca^{2+} del RS, proceso actualmente llamado liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} o CICR por sus siglas en inglés (Endo, Tanaka and Ogawa, 1970; Ford and Podolsky, 1970). Fabiato caracterizó este fenómeno en cardiomiocitos y sus resultados están resumidos en un artículo de revisión (Fabiato, 1983).

La CICR se recluta río abajo de un potencial de acción, gracias a que éste provoca que se activen los LTCCs, generándose una corriente de Ca^{2+} tipo L (I_{CaL} , Fig. 8), que no logra activar a la maquinaria contráctil pero sí a la liberación de Ca^{2+} del RS o CICR (Bers, 2002). Como consecuencia, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se incrementa al grado de disparar la activación de la maquinaria contráctil. A este fenómeno se le llama *acoplamiento excitación-contracción* (AEC; Fig 11).

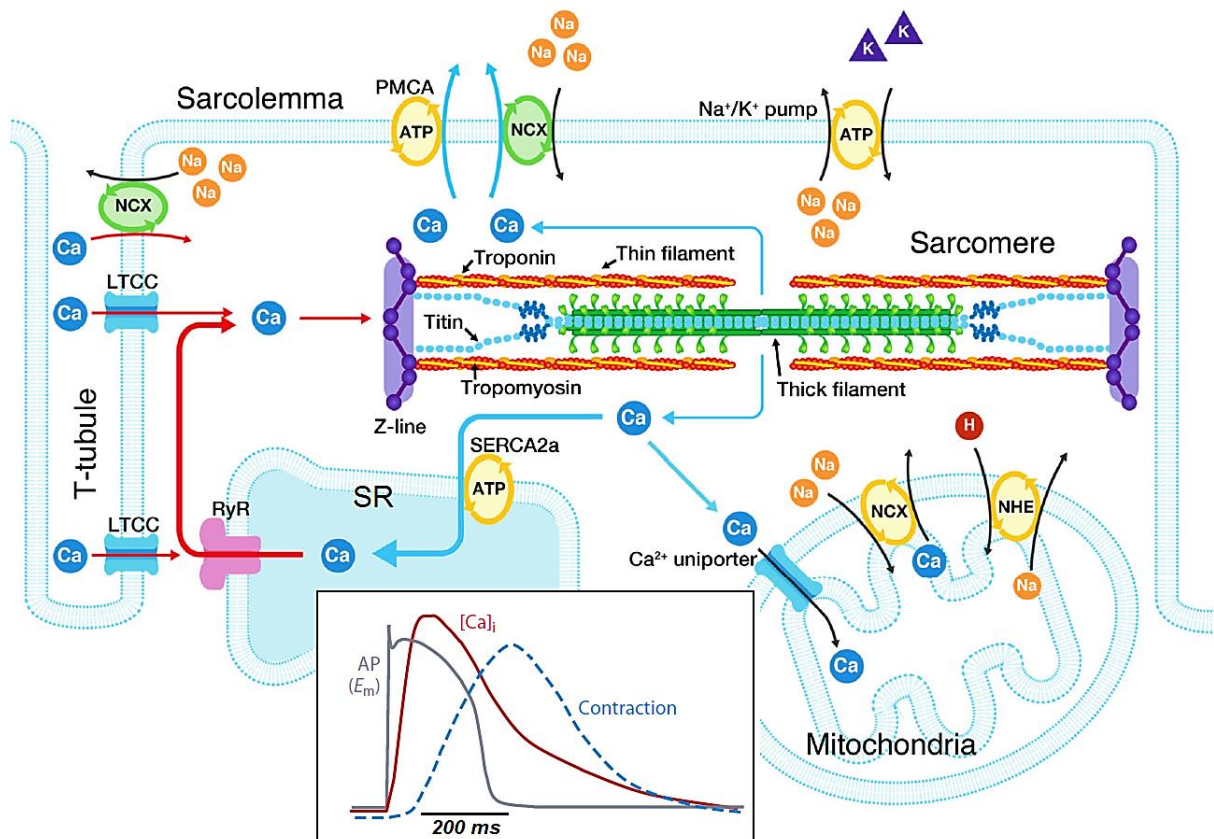


Figura 11. Esquema que representa al acoplamiento excitación-contracción (AEC) cardíaco. Las líneas rojas ilustran la entrada de Ca^{2+} a la célula, mientras que las azules representan la expulsión del Ca^{2+} del citoplasma, lo que conlleva a la relajación. [Tomada de Kobirumaki-Shimozawa et al. 2014]. El recuadro inferior (inserto) ilustra el retardo que existe entre el potencial de acción (AP), el transitorio de calcio ($[\text{Ca}]_i$) y el ciclo de contracción y relajación. [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. SERCA, ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico.

En este punto cabe resaltar algunos puntos del CICR: *i)* la unidad funcional del CICR, es conocida como “Couplon” la cual está formada por un cluster de RyRs que colocaliza con uno o varios LTCCs (Stern, Pizarro and Ríos, 1997; Franzini-Armstrong, Protasi and Ramesh, 1999) y la activación de cada RyR2 requiere de la unión de cuatro iones Ca^{2+} (Zahradníková et al., 1999). *ii)* la liberación de Ca^{2+} producida por un couplon se considera como un evento cuántico del CICR, al cual también se le conoce como chispa de calcio o *spark*. En ausencia de un potencial de acción, la incidencia de *sparks* es mínima y aleatoria (o estocástica; Cheng et al., 1993; Cannel et al., 1994). Sin embargo, durante un potencial de acción la I_{CaL} activa de manera sincronizada a una gran cantidad de *sparks*, y eso provoca un aumento global y uniforme en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Cannell et al., 1995). *iii)* la CICR involucra evidentemente una retroalimentación positiva, por lo que necesariamente existen

mecanismos que acaban con su propagación. Tal es el caso de un posible agotamiento de la concentración de Ca^{2+} del RS ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$) (aunque su contribución es probablemente muy limitada, ya que sólo se libera un 24-65% del Ca^{2+} total; Shannon, Guo and Bers, 2003; Picht *et al.*, 2011). También se presenta un proceso conocido como inactivación o adaptación, en el que los RyRs dejan de conducir calcio en respuesta tanto al vaciamiento del $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ como a niveles elevados del calcio citosólico (Györke and Fill, 1993; Yasui *et al.*, 1994; Zima *et al.*, 2008, 2010).

Sistemas que remueven Ca^{2+} del citoplasma

Como se puede observar en el inserto de la Fig. 11, el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es transitorio. Esto se debe a que el mismo incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ activa a los sistemas que remueven Ca^{2+} del citoplasma, tales como: *i)* el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU, que introduce Ca^{2+} al interior de la mitocondria), *ii)* la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA) ambos son considerados como sistemas lentos de remoción de Ca^{2+} , *iii)* el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), y *iv)* la ATPasa de Ca^{2+} del RS (SERCA; Fig. 11)

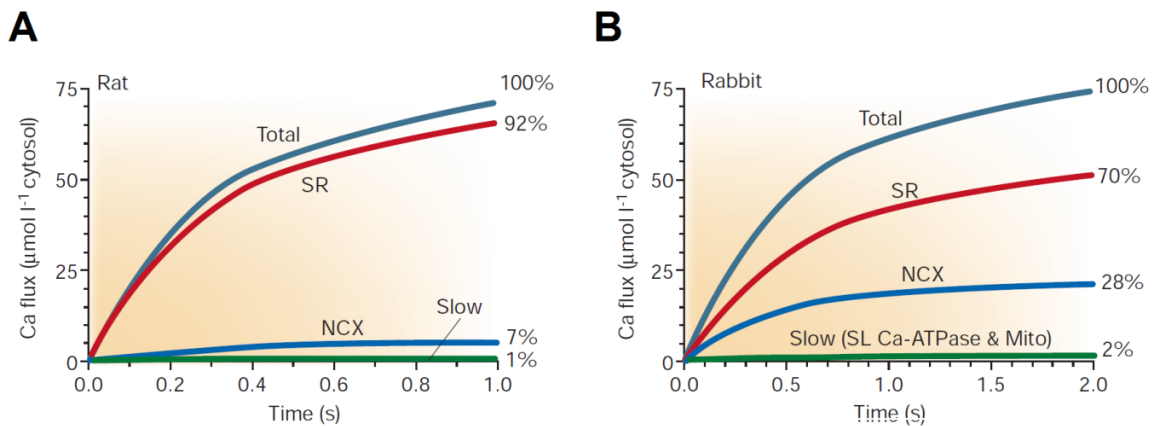


Figura 12. Actividad de los sistemas que remueven calcio citosólico, en función del tiempo. Se grafica el flujo (extrusión) de calcio en función del tiempo, a partir del inicio de un transitorio de calcio. Las curvas fueron estimadas a partir de experimentos realizados en miocitos ventriculares de rata (A) y conejo (B). SR, recaptura de Ca^{2+} al retículo sarcoplásmico por la bomba SERCA; NCX, actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; Slow, sistemas lentos (PMCA y uniportador de Ca^{2+} mitocondrial). [Tomada de Bers, 2002].

En 1994, el grupo de Bers publicó una serie de experimentos, que llevaron a estimar el porcentaje de participación de estos sistemas en la remoción de calcio, durante un transitorio (Bassani *et al.* 1994). Para ello, se tomó en cuenta a los principales *buffers* de Ca^{2+} endógenos (como los miofilamentos y CaM), y se logró graficar la actividad de los transportadores en función del

tiempo a partir de que da inicio el transitorio. Así, sabemos que, miocitos ventriculares de rata adulta, el porcentaje de contribución de la bomba SERCA, el NCX y los sistemas lentos es de un 92%, 7% y 1%, respectivamente (Fig. 12A). Dichos porcentajes varían, dependiendo de la especie. Por ejemplo, en mamíferos más grandes como el conejo, los respectivos valores son de un 70%, 28% y 2% (Fig. 12B; Bassani and Bers, 1994; Bers, 2002).

Modulación del AEC por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

Las mitocondrias ocupan un 20-30% de volumen total de un cardiomiocito (Schaper, Meiser and Stammler, 1985). Esa aportación solo es superada por los miofilamentos, quienes ocupan un 40-50% (Page, McCallister and Power, 1971). El ciclo incesante de contracción y relajación cardiaco representa una alta demanda energética, la cual es cubierta principalmente por la fosforilación oxidativa que se lleva a cabo en las mitocondrias. Básicamente, durante la fosforilación oxidativa suceden dos eventos relevantes. Se aprovecha la energía proveniente de la oxidación de diversos sustratos para la producción de ATP y se reduce el oxígeno a moléculas de agua mediante electrones (e^-) donados por nucleótidos de nicotinamida o flavina (ej. NADH y $FADH_2$, respectivamente; Nelson and Cox, 2008). Sin embargo, aproximadamente el 0.1% de los e^- encargados de reducir el O_2 causa una reducción parcial, generando el anión superóxido, el cual es un radical libre con alta capacidad oxidante, que a su vez, puede originar otros oxidantes, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Fig. 13; Murphy, 2009). En conjunto, esas moléculas son conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés).

Los cardiomiocitos evitan el daño celular causado por la alta reactividad de las ROS mediante diversas proteínas antioxidantes, siendo las principales la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa. Además, también emplean moléculas endógenas como el glutatión, tocoferoles y ácido ascórbico (Fig. 13; Zima and Blatter, 2006). De hecho, en condiciones fisiológicas existe un balance entre la producción de ROS y la “defensa antioxidante” celular. Sin embargo, diversas enfermedades cardiovasculares aumentan la tasa de producción de radicales libres, generando una condición llamada estrés oxidativo. Entre otros aspectos, dicha condición provoca una disminución en la síntesis de ATP y daño oxidativo en proteínas implicadas en el AEC. Todo esto conlleva a una disfunción contráctil, incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ y arritmogénesis (Brown and Griendling, 2015).

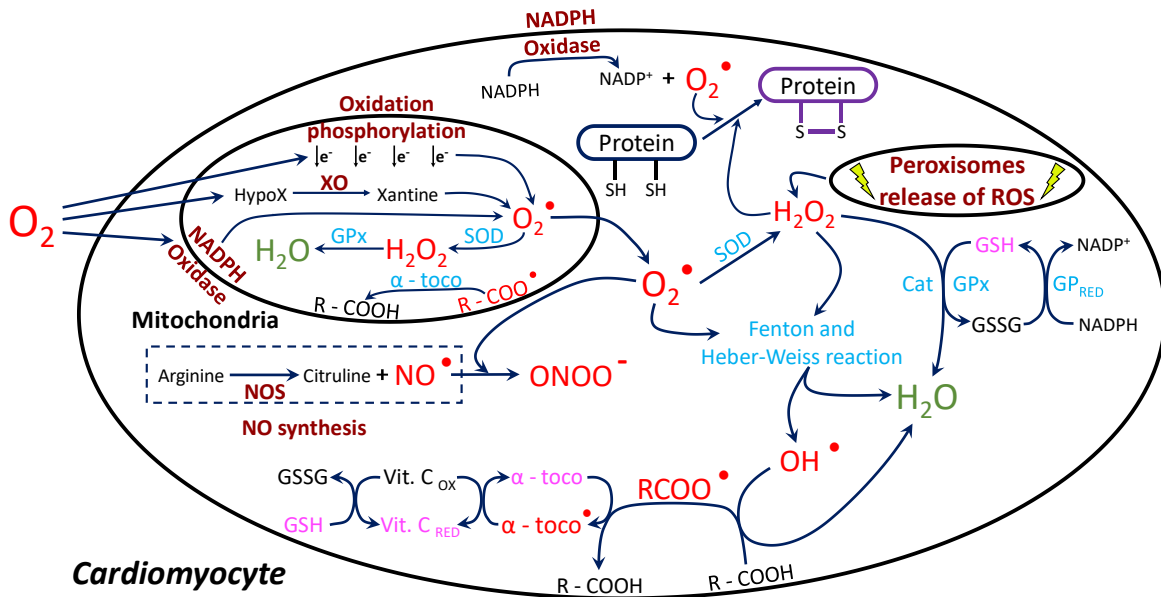


Figura 13. Principales vías de síntesis de ROS y sistemas antioxidantes en cardiomiocitos. En la mitocondria un pequeño porcentaje de los electrones provenientes de la fosforilación oxidativa, reducen parcialmente el O_2 , generando el radical superóxido (O_2^{\bullet}). Éste también es producido por la actividad de las enzimas xantina oxidasa (XO) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidase). El O_2^{\bullet} puede ser metabolizado rápidamente a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), mediante la enzima superóxido dismutasa o SOD) y subsecuentemente a agua (H_2O , por la enzima glutatión peroxidasa o GPx). Alternativamente, puede difundir hacia el citosol, donde diversas enzimas antioxidantes (esquematisadas en color azul) lo transforman a radicales cuya toxicidad es menor (señalados con color rojo). Los peroxisomas dañados liberan H_2O_2 hacia el citosol, el cual es metabolizado por la reacción Fenton, generándose hidroxilo u OH^{\bullet} . Los cardiomiocitos también cuentan con diversas moléculas que funcionan como defensa ante los radicales (color rosa). El recuadro muestra la síntesis del radical óxido nítrico (NO) mediante la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). El NO reacciona con el O_2^{\bullet} , formando otro radical libre llamado peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$). Los radicales puede dar origen a una proteína con actividad anómala (color morado), cuando interactúan directamente con los grupos tior de ésta, formando puentes disulfuro. OH^{\bullet} , hidroxilo; $RCOO^{\bullet}$, peroxilo lipídico; Cat, catalasa; GP_{RED} , glutatión reductasa; $R-COOH$, lípido de la membrana; GSH/GSSG, Glutatión reducido y su respectiva forma oxidada; α -toco y α -toco $^{\bullet}$, α -tocoferol y su respectivo radical. Figura basada en (Aggarwal and Makielski, 2013).

Una de las principales maneras en que las ROS modifican la actividad de las proteínas es mediante la oxidación de grupos tioles, formando puentes de disulfuro entre residuos de cisteína (Fig. 13). En el caso particular de las proteínas que participan en el AEC, la gran mayoría son susceptibles a dichas modificaciones postraduccionales (Zima and Blatter, 2006). Por mencionar algunos ejemplos, el RyR2 posee 356 residuos de cisteína, de los cuales 84 pueden sufrir una oxidación (Meissner, 2017). De hecho, el daño oxidativo en RyR2 se traduce en una mayor P_o de este canal, lo que a su vez contribuye a que se presente daño celular durante la insuficiencia cardiaca (Terentyev et al., 2008).

Adicionalmente, el estrés oxidativo provoca mayor actividad del NCX (Santacruz-Tolozá *et al.*, 2000; Kuster *et al.*, 2010), y eso explica porque ciertos agentes antioxidantes logran atenuar la actividad exacerbada del NCX en modelos de hipoxia/reoxigenación (Eigel, Gursahani and Hadley, 2004). En relación a la bomba SERCA, se sabe que su oxidación en la cisteína 674 provoca una disminución de su actividad, y eso explica un enlentecimiento en la cinética de decaimiento del transitorio de calcio en modelos de estrés oxidativo (Qin *et al.*, 2013, 2014).

Existen otros radicales libres capaces de modular el AEC y que son denominados especies reactivas de nitrógeno. Tal es el caso del óxido nítrico (NO), el cual es sintetizado por la óxido nítrico sintasa (NOS) empleando a la L-arginina como sustrato (Fig. 13; Alderton, Cooper and Knowles, 2001).

Actualmente, se han identificado tres isoformas de NOS, todas codificadas por genes distintos y clasificadas de la siguiente manera: neuronal (nNOS, o NOS1), endotelial (eNOS, o NOS3) e inducible (iNOS, o NOS2). Las NOS1 y NOS3 se expresan constitutivamente en cardiomiocitos y son dependientes de Ca^{2+} y CaM. La expresión de NOS2, por su parte, puede ser inducida por ciertas citocinas y su actividad es independiente de Ca^{2+} (debido a que posee una alta afinidad intrínseca por CaM, incluso a bajas concentraciones de Ca^{2+} ; Moncada *et al.*, 1997).

El NO es bien conocido por su acción relajante del músculo liso (Furchgott and Zawadzki, 1980; Palmer, Ferrige and Moncada, 1987). Adicionalmente, ejerce varios efectos, a nivel de cardiomiocitos, los cuales dependen entre otros aspectos, de la isoforma de NOS implicada, la distribución subcelular de la misma (Barouch *et al.*, 2002) y de los niveles de producción del radical libre (altos y bajos de NO inhiben y promueven la contracción, respectivamente (Fig. 14A; Kojda and Kottenberg, 1999).

Concretamente, altas concentraciones de NO (rango μM), logran que éste se una a la porción hemo de la guanilato ciclasa soluble (sGC, Ignarro *et al.*, 1982), aumentando considerablemente la producción de guanosina monofosfato cíclico (cGMP), el cual es capaz de modular indirectamente, tanto a la proteína cinasa dependiente de cGMP (PKG) como a PKA. En cuanto a PKA, se sabe que disminuye su actividad debido a que el cGMP es un activador alostérico de la capacidad hidrolizante de cAMP de la fosfodiesterasa 2 (PDE2). Por el contrario, PKG es activada

por el cGMP, favoreciendo la fosforilación e inhibición de los canales de Ca^{2+} tipo L (Méry *et al.*, 1991). De hecho, la PKG también fosforila a la cTnI, provocando menor sensibilidad de la maquinaria contráctil a la activación por Ca^{2+} (Fig. 14A, rama izquierda) (Pfitzer, Rüegg and Hofmann, 1982).

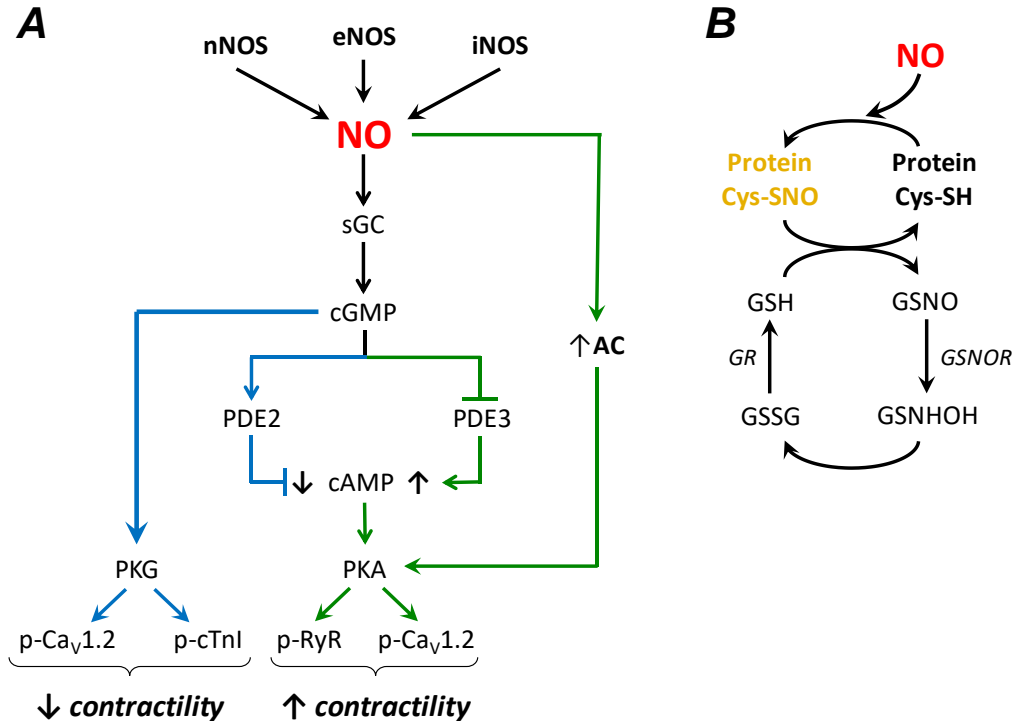


Figura 14. Efectos indirectos (A) y directos (B) del NO en las proteínas que participan en el AEC. (A) Tres diferentes isoformas de la NOS, sintetizan el NO, el cual regula de manera dual a la contractilidad. Elevados niveles de producción de NO estimulan la producción de cGMP vía sGC. Subsecuentemente, los niveles elevados de cGMP (líneas azules) se traducen en mayor actividad de PKG, la cual fosforila tanto a $\text{Ca}_v1.2$ como a cTnI, provocando un efecto inotrópico negativo. En paralelo, el cGMP puede activar a la PDE2, la cual hidroliza al cAMP y por lo tanto disminuye la actividad de PKA. Por otra parte, una menor tasa de síntesis de NO (líneas verdes) se traduce en una activación de la AC y una inhibición de la PDE3, estimulándose la síntesis de cAMP e inhibiéndose su degradación. Como consecuencia de estos efectos, la actividad de PKA se incrementa y se aumentan los niveles de fosforilación (por PKA) de RyR y $\text{Ca}_v1.2$. El resultado es un efecto inotrópico positivo [esquema adaptado de Rastaldo *et al.*, 2007] (B) El NO también regula directamente proteínas, provocándoles S-nitrosilación (letras naranjas). Este proceso involucra una desnitrosilación que es mediada por la S-nitrosoglutation reductasa (GSNOR), la cual comienza con la transnitrosilación del glutatión (GSH), generándose una proteína desnitrosilada (protein Cys-SH) y S-nitrosoglutation (GSNO), el cual se reduce gracias a la GSNOR, formando de esa manera S-hydroxisulfenamida (GSNHOH). Esta última reacciona con el GSH, generando glutatión oxidado (GSSG). Para finalizar el ciclo, el GSSG se reduce por la glutatión reductasa (GR; Modificado de Lima *et al.* 2010).

Por otra parte, bajas concentraciones de NO (en el rango nM) se asocian con la estimulación de la adenilato ciclasa, mediante una vía no dependiente de cGMP (Vila-Petroff *et al.*, 1999), también

se han relacionado con una inhibición competitiva de la hidrólisis del cAMP por parte de la PDE3 (Kojda and Kottenberg, 1999), lo que se traduce en una tendencia a que se eleven los niveles de cAMP, que a su vez activan a la PKA y ésta fosforila a ciertas proteínas que estimulan la contracción (Fig. 14A, rama derecha), tales como Ca_v1.2 (Wang, Rechenmacher and Lipsius, 1998) y RyR2 (Marx *et al.*, 2000).

Al igual que sucede con las ROS, el NO también es capaz de modular directamente a ciertas proteínas implicadas en el AEC, mediante su fusión con residuos tiol de cisteínas. A esta modificación se le llama S-nitrosilación (Fig. 14B; Hess *et al.*, 2005). El proceso inverso (o desnitrosilación), se lleva a cabo como parte de un ciclo en el que el glutatión se oxida (GSSG) y reduce (GSH, Fig. 18B; Lima *et al.*, 2010).

Se piensa que la S-nitrosilación de proteínas del RS resulta en incrementos en la P_o de los RyRs (Xu *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2010) y la actividad de SERCA2 (Sun *et al.*, 2007). La isoforma neuronal de NOS (nNOS) está estrechamente asociada a estas proteínas. Por ejemplo, colocaliza tanto con SERCA2 como con PLB (Xu *et al.*, 1999) y coimmunoprecipita con RyR2 (Barouch *et al.*, 2002).

Remodelación cardiaca

Cuando al corazón se le da un estímulo nocivo de manera crónica, se origina un proceso denominado remodelación cardiaca (RC), donde se generan cambios a nivel de: expresión génica, síntesis proteica, organización del sarcómero, metabolismo energético, y homeostasis del Ca²⁺ intracelular. Lo cual conlleva a alteraciones funcionales y estructurales. Cabe mencionar que la RC se presenta en la mayoría de las enfermedades cardiovasculares y afecta no solo a los cardiomiocitos, sino también la vasculatura cardiaca, la actividad de los fibroblastos y el intersticio (concretamente la matriz extracelular o ECM, por sus siglas en inglés). Además, su desarrollo puede comenzar pocas horas después de un daño inicial y mantenerse durante años (Vu and Kofidis, 2014).

Cuando el corazón se ve afectado por un daño agudo que compromete la viabilidad de los cardiomiocitos, se presenta una pérdida del tejido contráctil, el cual es inicialmente contrarrestado por un remodelado cardiaco conocido como hipertrofia compensada. Dicha

hipertrofia incrementa el gasto cardiaco y reemplaza el tejido dañado, a través de un proceso de cicatrización altamente organizado. Esto permite que el corazón continúe funcionando sin consecuencias graves, pese al nuevo estado de estrés (Armoundas *et al.*, 2001).

Sin embargo, la hipertrofia compensada llega a ser maligna cuando los daños persisten y se vuelven crónicos. En este nuevo estado se generan cambios patológicos estructurales y electrofisiológicos. Los primeros provocan cambios en el tamaño y forma del corazón, normalmente hay ensanchamiento de las cámaras ventriculares, acompañado por un adelgazamiento de la pared ventricular; así como aparición de fibrosis (mediada por la activación de fibroblastos; Jiang, 2013). Por su parte, los cambios electrofisiológicos conllevan a arritmias y disfunción contráctil progresiva, principalmente por desajustes a nivel de los CIDV (Nattel *et al.*, 2007; Hegyi *et al.*, 2018). En conjunto esos cambios dan origen a lo que conocemos como hipertrofia descompensada, la cual eventualmente puede desembocar en insuficiencia cardiaca (Fig. 15).

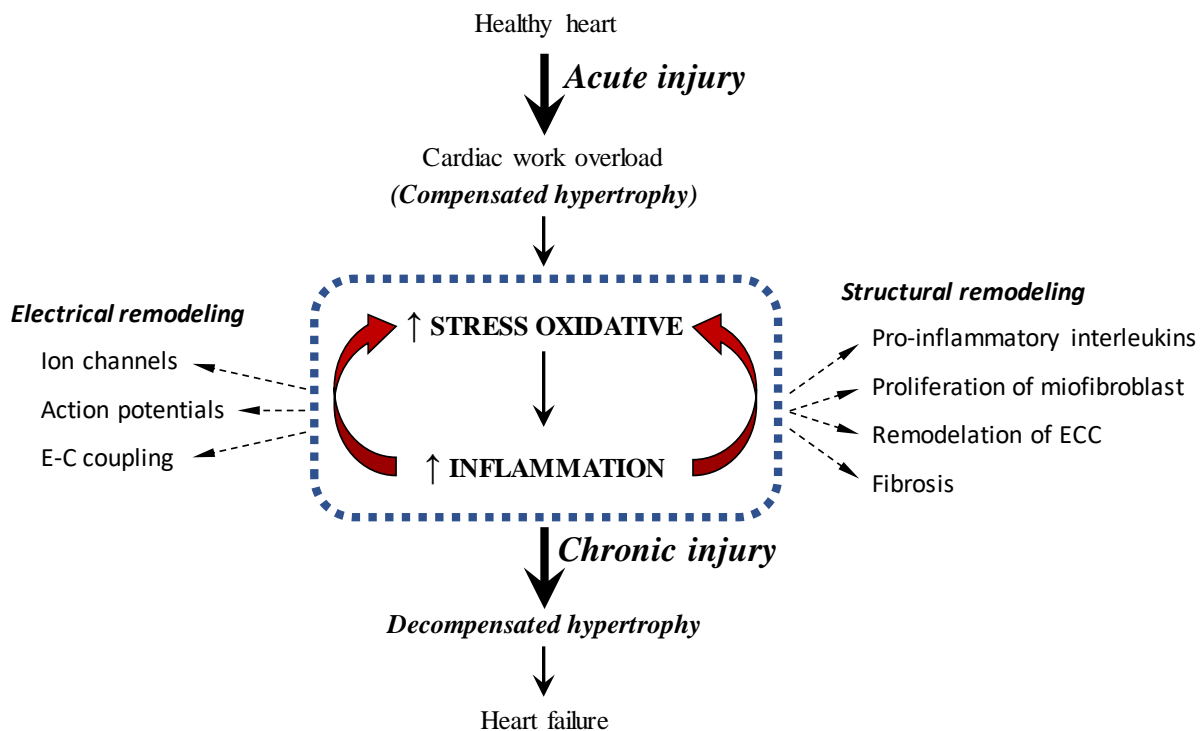


Figura 15. Remodelación cardíaca. La hipertrofia compensada se considera un fenómeno adaptativo, que surge como respuesta a un estrés externo que afecta la funcionalidad del corazón. Cuando el estrés se vuelve crónico, se genera una retroalimentación entre un aumento en el estrés oxidativo y la inflamación (flechas rojas), provocando una remodelación estructural y eléctrica que deteriora aún más al corazón. Lo anterior da origen a la hipertrofia descompensada, que a su vez puede llevar, eventualmente, a insuficiencia cardiaca. Esquema basado en Ramos-Mondragón *et al.*, 2008.

Varios estudios sugieren que un incremento en la producción de ROS podría ser esencial para el desarrollo de la hipertrofia descompensada. En consecuencia, se piensa que diversas patologías cardíacas se podrían prevenir mediante una atenuación de la sobreproducción de ROS (Ye and Song, 2008; Rababa'h *et al.*, 2018). Sin embargo, la administración de antioxidantes no siempre conlleva un efecto terapéutico (Kris-Etherton *et al.*, 2004) y eso tal vez se debe a que las ROS provocan procesos inflamatorios que no logran ser revertidos por los antioxidantes.

La inflamación forma parte de la hipertrofia compensada, por lo que se considera en un principio parte del proceso adaptativo, sin embargo, cuando no se repara el tejido dañado, los leucocitos liberados al torrente sanguíneo, se instalan en el corazón atrofiado y liberan grandes cantidades de ROS y diversas citocinas que terminan afectando a los cardiomiocitos sanos adyacentes a la zona dañada (Senoner and Dichtl, 2019).

Las citocinas son moléculas que regulan diversas funciones celulares. Para el caso concreto de la inflamación, las principales citocinas son las interleucinas (IL), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α). Cabe mencionar que el TGF- β es considerado como la principal citocina fibrogénica, ya que sus niveles de expresión se relacionan positivamente con la aparición de la fibrosis y el remodelado cardíaco (Ramos-Mondragón *et al.*, 2008).

Con base en lo anterior, se puede entender que el progreso de las enfermedades cardiovasculares es multifactorial, por lo que sería deseable que los fármacos candidatos a prevenir o revertir padecimientos cardíacos no sólo actúen en el remodelado estructural y eléctrico, sino que también posean propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antifibróticas.

Aspectos generales de pirfenidona

La pirfenidona (PFD), es un compuesto sintético derivado de la 2-piridona (5-metil-1-fenil-2(1H)-piridona, Fig. 16), el cual es capaz de atravesar la membrana plasmática sin necesidad de un receptor, ya que su naturaleza es altamente hidrofóbica y posee un peso molecular de tan sólo 185.22 g/mol (Macías-Barragán *et al.*, 2010).

Las propiedades terapéuticas de PFD se descubrieron inicialmente 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, 1976).

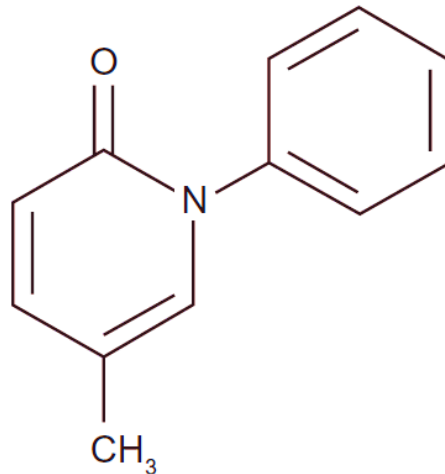


Figura 16. Estructura química de pirfenidona (PFD). La pirfenidona es un derivado de la 2-piridona, posee un peso y fórmula molecular de 185.22 g/mol y $C_{12}H_{11}NO$, respectivamente. Su nombre, según nomenclatura IUPAC, es 5-metil-1-fenil-2-(1H)-piridona. [Fig. tomada de Carter 2011].

Posteriormente, múltiples fármacos antiinflamatorios fueron probados como agentes antifibróticos, y en 1994 Margolin comenzó a patentar las acciones antifibróticas de PFD (Margolin, 1994, 2000). La justificación de estas pruebas se basó en el conocimiento de que el estrés oxidativo y la subsecuente inflamación conduce al desarrollo de fibrosis como mecanismo de reparación tisular (Nakazato *et al.*, 2002).

Actualmente, el efecto antifibrótico de la PFD es por mucho el más estudiado (con respecto a las actividades previamente mencionadas), a tal grado que PFD es uno de los dos fármacos aprobados a nivel mundial para el tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática (FPI; Kim and Keating, 2015).

In vivo, PFD es metabolizada principalmente por el citocromo CYP1A2 (aunque también participan, en menor medida: CYP2C9, 2C19, 2D6 y 2E1), siendo su principal metabolito, la 5-carboxi-pirfenidona. Éste se considera inactivo, puesto que no ejerce efectos biológicos aun a concentraciones mayores que el fármaco (Carter, 2011).

Actualmente se tienen muy bien caracterizadas las propiedades farmacocinéticas de PFD. En contraste, se sabe poco acerca del mecanismo de acción asociado a sus efectos clásicos (antifibróticos, anti-inflamatorios y antioxidantes).

ANTECEDENTES

PFD como antioxidante

Estudios pioneros, desarrollados *in vitro* (es decir, en sistemas no celulares), demostraron que PFD tiene la capacidad de secuestrar ROS. Concretamente, el fármaco secuestra radicales hidroxilo y superóxido (OH^\bullet y O_2^\bullet , respectivamente; Giri *et al.*, 1999). Posteriormente, estudios realizados en microsomas de hígado de oveja mostraron que PFD también es capaz de prevenir la peroxidación lipídica, lo cual se atribuyó a la capacidad de secuestrar radicales OH^\bullet (Misra and Rabideau, 2000). Adicionalmente, se ha reportado que un complejo de PFD y hierro (estequiometría 3:1) también secuestra radicales O_2^\bullet (en leucocitos estimulados con éster de forbol; Mitani *et al.*, 2008). Cabe mencionar que PFD secuestra dichos radicales de manera dependiente de la dosis y estos efectos se observan en cuestión de segundos a minutos.

Las propiedades antioxidantes de PFD no se limitan solo a secuestrar ROS. También se ha observado en hepatocitos, donde bloquea un estímulo de la interleucina proinflamatoria IL-1 β , a nivel de producción de NO, activación del factor de transcripción NF- $\kappa\beta$, y tasa de transcripción del gene que codifica para iNOS. Todo esto sucede en un rango de tiempo cercano a 2 h (Nakanishi *et al.*, 2004; Tsuchiya *et al.*, 2004; Salazar-Montes *et al.*, 2008).

Adicionalmente, un grupo de investigadores mexicanos ha logrado demostrar que el fármaco, en células hepáticas aumenta (en un rango de 8 a 12 h) el nivel de expresión de mRNAs que codifican para proteínas con actividad antioxidante (ej. la γ -glutamil cisteina sintasa, que se correlaciona con un incremento en los niveles de GSH). Este efecto del fármaco se atribuye a que provoca un incremento en la importación del factor nuclear eritroide-2 (Nrf2) al núcleo, con una latencia de aproximadamente 30 min (Macias-Barragan *et al.*, 2014), cabe mencionar que Nrf2 es considerado como un factor transcripcional indispensable para mantener las defensas antioxidantes antes un estrés oxidativo (Brown and Griendling, 2015).

Acción antiinflamatoria de PFD

Estudios llevados a cabo principalmente por el grupo de Hisashi Oku, tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado que PFD no solo aumenta el nivel de expresión de la IL-10, la cual tiene actividad antiinflamatoria, sino que también atenúa niveles de expresión de las principales citocinas proinflamatorias, tales como: TNF- α e IFN- γ , así como de las interleucinas (IL) IL-12, IL-18, IL-1b e IL-6 (Nakazato *et al.*, 2002; Oku *et al.*, 2002, 2008).

En modelos de daño pulmonar, se ha observado que PFD disminuye la expresión de interleucinas que favorecen la aparición de la fase aguda de la inflamación, tales como: IL-4, IL-5 e IL-13. De hecho, también reduce el grado de infiltración de células que promueven inflamación, tales como: eosinófilos, linfocitos, neutrófilos y macrófagos (Iyer, Hyde and Giri, 2000; Hirano *et al.*, 2006). Además, en un modelo de miocarditis, inducida con difteria, se observó que la administración de PFD atenúa el grado de activación de linfocitos B. Los cuales, están involucrados en procesos inflamatorios cardiacos que conllevan a la remodelación (Adamo *et al.*, 2018).

Un aspecto interesante, es que PFD también contribuye a tolerar el trasplante de órganos (pulmón y tráquea) en modelos animales. Esto se le ha atribuido a que provoca una disminución en el nivel de expresión de varias citocinas implicadas en el rechazo de órganos, como: IL- β 1, IL-4, IL-5 e IL-17, así como a una inhibición en la proliferación de neutrófilos, linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ (Dosanjh *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2005; Visner *et al.*, 2012). No obstante, se requiere mayor investigación antes de llevar esto a la práctica en humanos.

Efectos antifibróticos de PFD

Actualmente, el efecto antifibrótico de PFD es por mucho el más estudiado (con respecto a los dos previamente mencionados, antioxidante y antiinflamatorio). Por ejemplo, clínicamente, PFD abate la fibrosis pulmonar y de hecho, actualmente este compuesto se comercializa casi a nivel mundial, para tratar la FPI. Este padecimiento se caracteriza por un aumento en la producción de diversas citocinas y factores de crecimiento, implicados en la activación y proliferación de fibroblastos, lo que ocasiona un exceso de ECM, que eventualmente conduce a la destrucción progresiva del epitelio alveolar y posteriormente a la destrucción del tejido pulmonar (Schaefer *et al.*, 2011).

El efecto antifibrótico de PFD también se ha investigado en una gran variedad de modelos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Básicamente, los resultados indican que el fármaco no sólo previene, sino que también revierte la fibrosis, en al menos los siguientes tejidos: pulmón (Iyer, Gurujeyalakshmi and Giri, 1999a, 1999b), hígado (Di Sario *et al.*, 2002, 2004), riñón (Brook *et al.*, 2005; RamachandraRao *et al.*, 2009) y corazón (Mirkovic *et al.*, 2002; Van Erp, Irwin and Hoey, 2006; Yamagami *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017). Estos efectos se atribuyen generalmente a la capacidad de PFD de inhibir los niveles de expresión de TGF- β 1 (a nivel transcripcional), la cual como ya se mencionó es la principal citocina profibrogénica.

Posible uso de PFD para tratar enfermedades virales

Las infecciones virales desencadenan reacciones que provocan estrés oxidativo, inflamación y fibrosis tisular (Bauer and De la Fuente, 2016). En consecuencia, PFD contrarresta varias de esas alteraciones. Así, resultados obtenidos en un ensayo clínico piloto indican que un tratamiento de 12 meses con PFD atenúa varias alteraciones asociadas a cirrosis hepática, en pacientes con infección crónica del virus de la hepatitis C (Armendáriz-Borunda *et al.*, 2006).

Adicionalmente, se ha documentado que el coronavirus SARS-CoV-2 provoca un daño respiratorio agudo similar al que se observa en pacientes con FPI. Por lo anterior, se piensa que PFD también podría ayudar a combatir los síntomas y secuelas asociadas a COVID-19 (Ferrara *et al.*, 2020). Personas con enfermedad leve e incluso aquellas hospitalizadas que se encuentren estables, podrían recibir el fármaco; sin embargo, dado que la administración de PFD es vía oral, es casi imposible de implementar en personas conectadas a respiradores artificiales; en consecuencia, es necesario desarrollar una formulación inhalada. Afortunadamente, dicha formulación ya se está poniendo a prueba en pacientes con COVID-19, y es altamente probable que los resultados sean alentadores (ClinicalTrials.gov, n.d.).

Papel de PFD en el tejido cardíaco.

En el 2006 el grupo de Jeffrey Olgin investigó si la PFD ejerce un posible efecto antiarrítmico a nivel auricular. Se trabajó en un modelo canino de fibrilación auricular (FA), inducida por ablación del nodo sinoauricular y una subsecuente excitación artificial ventricular de alta frecuencia (Lee

et al., 2006). A nivel auricular, este modelo desarrolla un incremento en los niveles de expresión de TGF- β 1 (Fig. 17A), mayor índice de fibrosis (Fig. 17B) y un aumento en la vulnerabilidad a desarrollar FA (Fig. 17; Lee *et al.*, 2006).

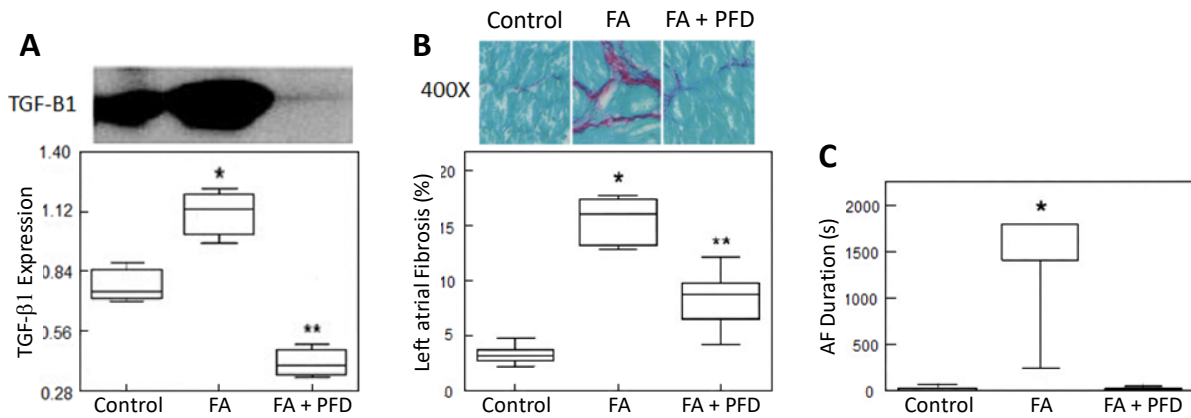


Figura 17. Efectos de pirfenidona en un modelo canino de fibrilación auricular (FA). Los animales (perros de raza mongrel, con peso de 25 a 32 Kg) se dividieron en tres grupos: control, fibrilación auricular (FA) y el grupo donde además de inducir la FA se administró pirfenidona (FA+PFD). La FA se indujo mediante taquicardia ventricular (tres semanas), y la pirfenidona se administró de forma oral durante la inducción de la FA (800 mg, tres veces al día). A) muestra la estimación de los niveles de TGF- β 1 que fueron obtenidos a partir de inmunoblots como el que se muestra en la parte superior. B) Niveles de fibrosis que fueron estimados digitalmente a partir de cortes histológicos de aurícula izquierda que fueron teñidos con "rojo de Sirius" (paneles superiores), obsérvese de color rojo los cúmulos de colágeno; (C) Duración de los episodios de fibrilación auricular (AF) que se lograron inducir mediante ráfagas de sobreestimulación eléctrica auricular. [Datos tomados de Lee *et al.* 2006].

Subsecuentemente, se investigaron posibles efectos de PFD a nivel ventricular. Para ello, se evaluó la función y estructura ventricular, en un modelo animal de infarto al miocardio (Nguyen *et al.*, 2010). Los resultados indican que el grupo de animales que se trató con PFD presentó una menor probabilidad de desarrollar taquicardia ventricular, menor tamaño del área de infarto y menos grado de fibrosis (Fig. 18 A, B, y C respectivamente). Además, este grupo presentó una mayor velocidad de conducción eléctrica en el borde de las lesiones (Fig. 18D) y un mayor porcentaje de sangre que expulsa el ventrículo izquierdo (Fig. 18E). Los efectos se atribuyeron a la menor inducción de fibrosis tisular (Fig. 18C), que a su vez se podría explicar por una posible disminución en los niveles de expresión de TGF- β 1 (Nguyen *et al.*, 2010).

Los datos de las Figs. 17 y 18 sugieren que PFD ejerce efectos benéficos a nivel cardiaco, debido (al menos) a que atenúa tanto la sobreexpresión del TGF- β 1, como sus respectivas vías de señalización y por ende también previene las alteraciones estructurales asociadas a fibrosis.

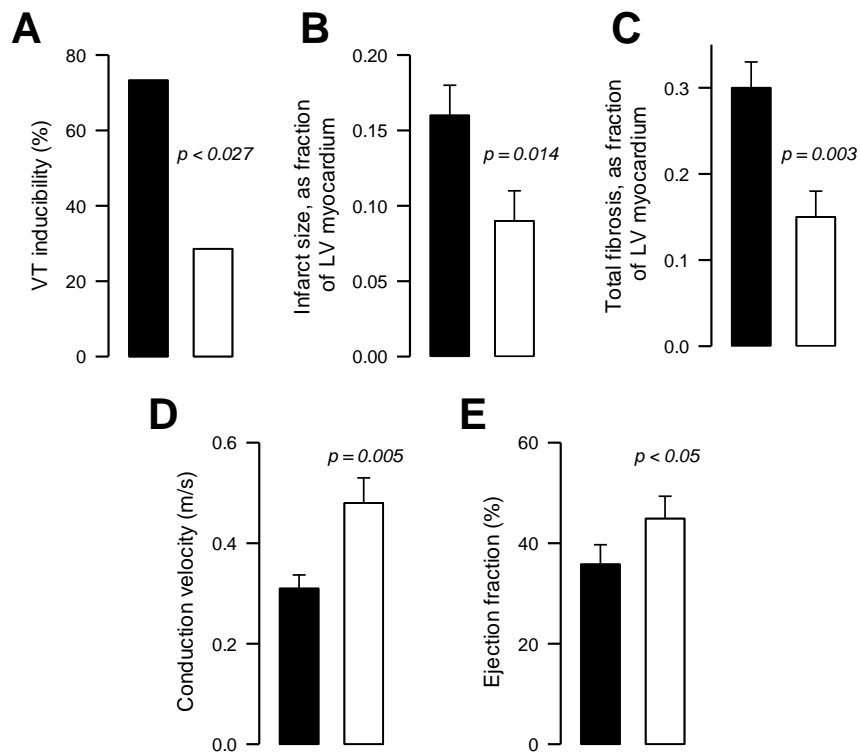


Figura 18. Pirfenidona previene el daño ventricular asociado al infarto. En un modelo animal (ratas Sprague-Dawley) se provocó infarto al miocardio, mediante una obstrucción de arterias coronarias (de 20 min). Una semana después, los animales se dividieron en dos grupos: aquellos que no recibieron un tratamiento especial (Infarto, barras negras) y aquellos que recibieron un alimento suplementado con PFD (Infarto + PFD, barras blancas). Después de cuatro semanas, se investigó: el porcentaje de animales que presentó taquicardia ventricular (A), el tamaño relativo de las áreas con infarto (B), niveles de fibrosis (C), velocidad de conducción eléctrica en el borde de las áreas de infarto (D), y porcentaje de sangre que expulsa el ventrículo izquierdo (E). [Datos tomados de Nguyen et al., 2010]

Regulación de canales iónicos por PFD

Los primeros experimentos donde se evaluó si PFD modula las principales corrientes iónicas de los cardiomiocitos (I_{Na} , I_K e I_{Ca}), fueron llevados a cabo por Ramos-Mondragón y colaboradores en cardiomiocitos de rata adulta, los cuales fueron sometidos a experimentos de fijación de voltaje. Los resultados evidenciaron que un tratamiento crónico con PFD (1-2 días) estimula selectivamente a canales de calcio tipo L, tanto de miocitos auriculares (Fig. 19A) como ventriculares (Fig. 19B) (Ramos-Mondragón et al., 2012).

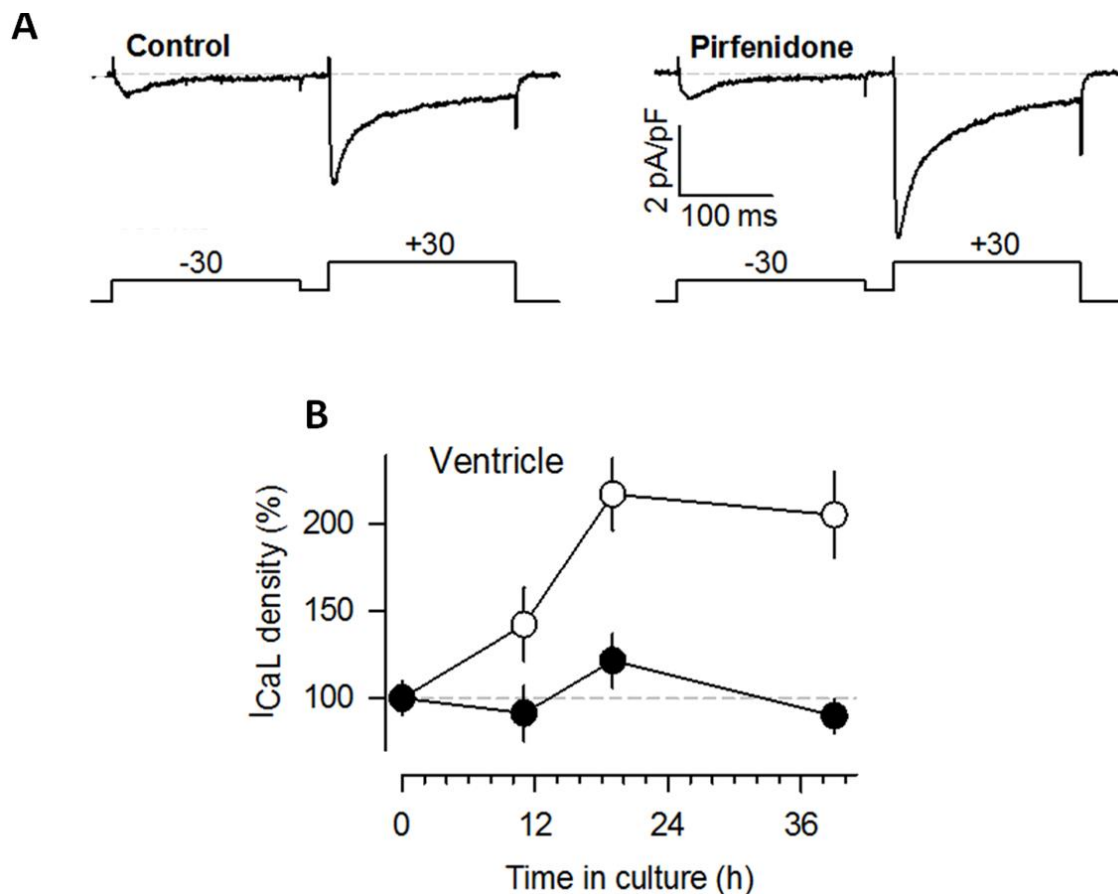


Figura 19. Pirfenidona regula canales de Ca^{2+} tipo L en miocitos de rata adulta. (A) Trazos representativos de corrientes de Ca^{2+} tipo T y tipo L (evocadas a -30 mV y $+30$ mV, respectivamente) que fueron registradas en miocitos auriculares cultivados en ausencia (Control, izq.) o presencia de pirfenidona (Pirfenidone, der.). 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].

Para tratar de decidir si el efecto en I_{CaL} se debe a un posible incremento en la expresión de los canales $Ca_v1.2$, se analizaron inmunoblots, por densitometría. Como resultado, se encontró que PFD no modifica la abundancia relativa de $Ca_v1.2$, ni en miocitos auriculares ni ventriculares (Fig. 20). Gracias a esta información, así como a otra serie de datos (mediciones de corrientes de compuerta), se logró concluir que el aumento en I_{CaL} no se debe a que exista un mayor número de canales de calcio.

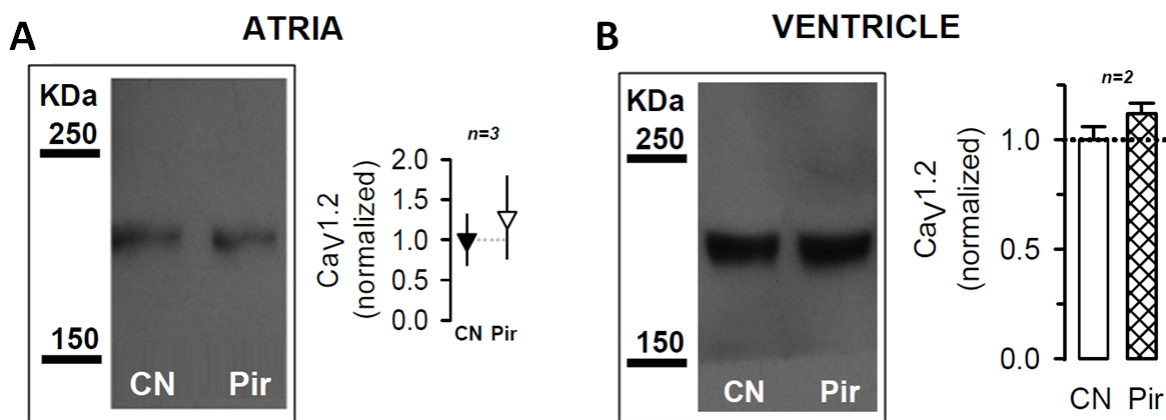


Figura 20. Niveles proteicos de $Ca_v1.2$ en miocitos auriculares y ventriculares de rata adulta. Las muestras de proteína provenientes de los miocitos (15 μ g) fueron separadas por un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), posteriormente se realizó un análisis de densitometría y se promediaron los resultados. A la izquierda de (A) y (B) se muestran fotografías de western-blots, donde se tiñeron las bandas correspondientes a $Ca_v1.2$, en miocitos control (CN) y tratados con pirfenidona (Pir), mientras que a la derecha se gráfica un resumen de las mediciones obtenidas. 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]

En seguida se investigó si el TGF- β 1 participa como intermediario, en la regulación de I_{CaL} por PFD y esto se hizo en miocitos auriculares. Sin embargo, el TGF- β 1 no modificó ni los niveles basales de I_{CaL} ni el aumento producido por pirfenidona (Fig. 21, izq.). En teoría, esa ausencia de efecto se podría explicar planteando que los canales L ya se encuentran inhibidos por TGF- β 1 endógeno, por lo que se empleó un inhibidor del receptor de esa citocina (SB431542). Sin embargo, el inhibidor no logró mimetizar el efecto de la PFD (Fig. 21, derecha). Por lo tanto, se puede concluir que pirfenidona estimula a los canales L por una vía de señalización independiente del TGF- β 1.

Por el contrario, Ramos-Mondragón y sus colaboradores encontraron que el AMPc, PKA y una sintasa de óxido nítrico (NOS) sí participan como intermediarios. Por lo tanto, sugirieron que PFD provoca una menor cantidad de NO, lo que podría estar provocando un aumento en los niveles de fosforilación de $Ca_v1.2$ por PKA.

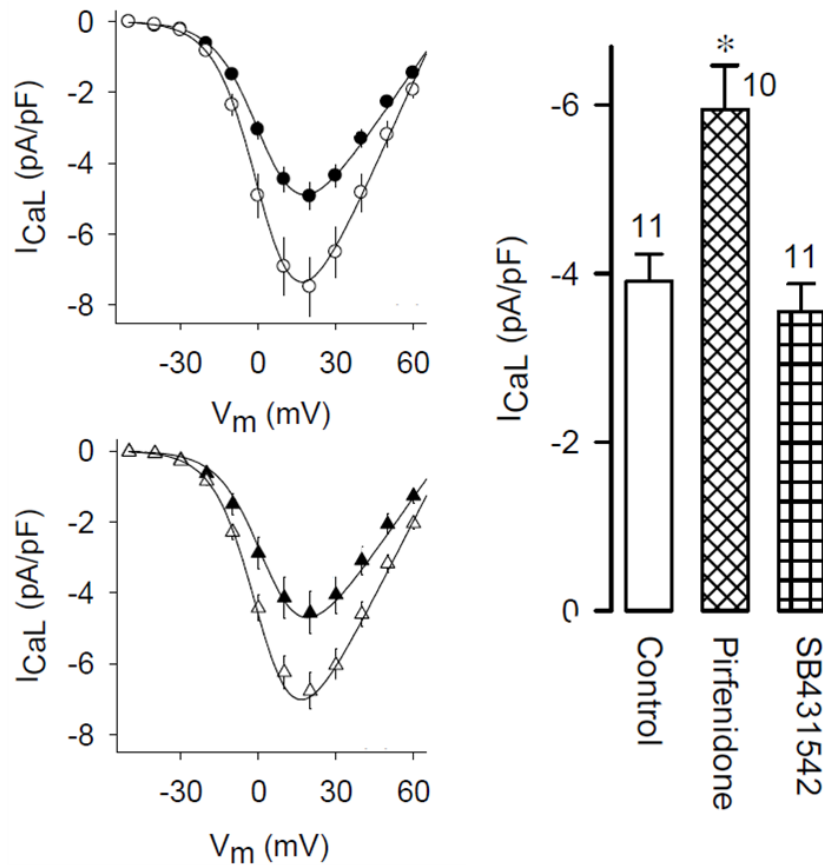


Figura 21. **TGF- β 1 no participa en la regulación de canales $Ca_v1.2$ por PFD.** A la izquierda se muestran curvas I-V de I_{CaL} obtenidas en miocitos auriculares de rata adulta mantenidos 1-2 días en condiciones control (círculos negros, n=18), o en presencia de ya sea TGF- β 1 (triángulos negros, n=24), PFD (círculos blancos n=22) o PFD 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.

La estructura y función del cardiomiocito varía en función de muchos factores tales como la especie, edad y ubicación tisular (Tabla 1). Por ejemplo, en miocitos auriculares de rata neonata, el TGF- β 1 inhibe la expresión de $Ca_v1.2$, mientras que en los ventriculares no modifica dicha expresión (Avila et al., 2007). Por lo anterior, a partir del 2012 nuestro laboratorio se enfocó a estudiar posibles efectos de PFD en el AEC de miocitos auriculares y ventriculares de rata adulta —por separado—. Así, se llevaron a cabo dos tesis de maestría: Osornio-Garduño, 2013 y Monsalvo-Villegas, 2015. En la primera se investigaron miocitos auriculares, mientras que la segunda estuvo enfocada a ventriculares.

Tabla 1. Algunas diferencias importantes entre miocitos ventriculares y auriculares de adulto.

		VENTRÍCULO VS AURÍCULA	Referencia
% de sarcolema en tubos T		5 veces mayor	(Bers, 2001)
Retículo sarcoplásmico	Total	2 veces menor	
	% ubicado en la diada	2 veces mayor	
% de RyR2 ubicado en la diada		Mayor	(Fearnley, Roderick and Bootman, 2011)
Abundancia de NCX		50 % mayor	(Wang <i>et al.</i> , 1996)
Cantidad de mitocondrias		2 veces mayor	(Bers, 2001)
Proporción fosfolamban/sarcolipina		Mayor	(Walden, Dibb and Trafford, 2009)
Actividad de SERCA		Menor	
Carga de Ca²⁺ en el RS		3 veces menor	
Presencia de Kv1.5		Exclusivamente en aurículas	(Tamargo <i>et al.</i> , 2004)
Presencia de $\alpha 2\delta - 3$			(Best and Kamp, 2012)
Presencia de Cav1.3			(Qu <i>et al.</i> , 2005)
Presencia de Cav3.1 y Cav3.2			(Mesirca, Torrente and Mangoni, 2015)

Se utilizaron dos enfoques experimentales: uno consistió en estudiar la dinámica del Ca²⁺ libre intracelular mediante experimentos de microfluorometría y fijación de voltaje (mediante *patch clamp*), y el otro en investigar la contractilidad y la homeostasis del calcio en células intactas (es decir, no sujetas a *patch clamp*).

Los resultados indican que, en ambos casos (aurícula y ventrículo), el tratamiento con PFD (1-2 días) incrementa la amplitud de los transitorios de Ca²⁺ (Fig. 22A), sin modificar la ganancia del AEC (es decir, la amplitud del transitorio de Ca²⁺ dividida por la magnitud de I_{CaL}; Fig. 22B).

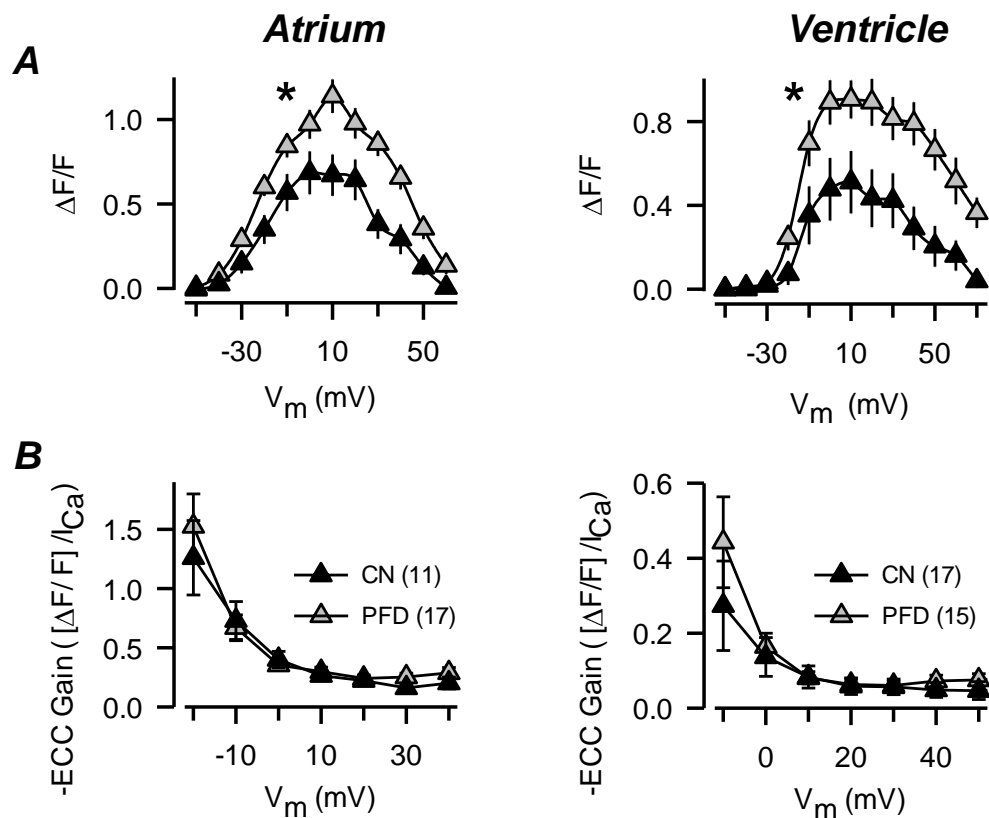


Figura 22. Pirfenidona incrementa los transitorios de Ca^{2+} sin modificar la ganancia del AEC. En (A) se muestra la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} obtenidos en miocitos auriculares (izquierda) y ventriculares (derecha), de manera simultánea con mediciones de I_{CaL} , mediante experimentos de fijación de voltaje. Ese enfoque permite calcular la ganancia del AEC, tal como se ilustra en (B). Células control - triángulos negros, células tratadas con pirfenidona - triángulos grises. El número de células registradas se muestra en B. *: $p < 0.005$, mediante un análisis de varianza. [Datos de aurículas y ventrículos tomados de Osornio-Garduño, 2013 y Monsalvo-Villegas 2015, respectivamente]

En miocitos auriculares, sujetos a *patch clamp*, también se analizó la velocidad de recaptura de Ca^{2+} al RS por la bomba SERCA, mediante el ajuste de una función exponencial simple, a la fase de decaimiento de los transitorios de Ca^{2+} . Los resultados indican que el fármaco no modifica la constante de tiempo respectiva (Fig. 23A). Adicionalmente, 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. 23B). En contraste, cuando se analizaron los sistemas de remoción de Ca^{2+} , sensibles e insensibles al Na^+ extracelular, se encontró que pirfenidona sí inhibe la remoción lenta o secundaria de Ca^{2+} , atribuible tanto a un componente sensible como a uno insensible al Na^+ extracelular (Fig. 23C).

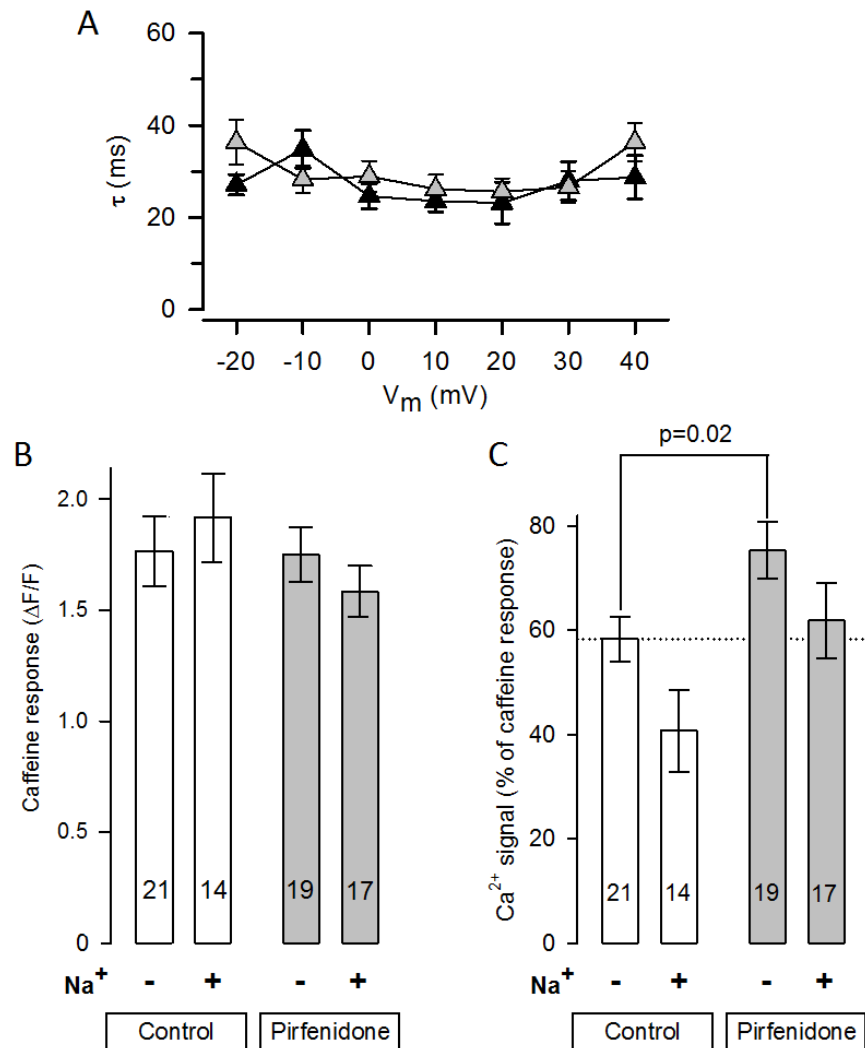


Figura 23. Actividad de los sistemas que remueven Ca²⁺ del citoplasma y niveles de Ca²⁺ del RS en miocitos auriculares. En A, se estimó la velocidad de recaptura de Ca²⁺ por la bomba SERCA, mediante el cálculo de la constante de tiempo (τ) de decaimiento del transitorio. Células control – triángulos negros; células tratadas con pirfenidona - triángulos grises. En B se estimó el contenido de Ca²⁺ del RS sensible a cafeína (30 mM), mientras que en C se estimó la capacidad de los sistemas lentos de remoción de Ca²⁺ en ausencia y 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. [Datos tomados de Osornio-Garduño, 2013]

Efectos de pirfenidona en las propiedades contráctiles de cardiomiocitos ventriculares

En mi tesis de maestría (Monsalvo-Villegas, 2015,) también se investigó la posibilidad de que PFD regule las propiedades contráctiles y la homeostasis del Ca²⁺, en miocitos ventriculares intactos. Los resultados indican que el fármaco efectivamente provoca un incremento tanto en los niveles de Ca²⁺ sistólico (Figs. 24A y 24B), como en el tiempo al pico del transitorio (Figs. 24A y 24C).

En contraste, no se observaron cambios en la constante de tiempo de decaimiento del transitorio (Fig. 24D). El incremento en los niveles de Ca^{2+} sistólico está de acuerdo con lo observado en células sometidas a la técnica de *patch clamp*, donde se observa que el fármaco estimula la liberación de Ca^{2+} del RS (Fig. 22A).

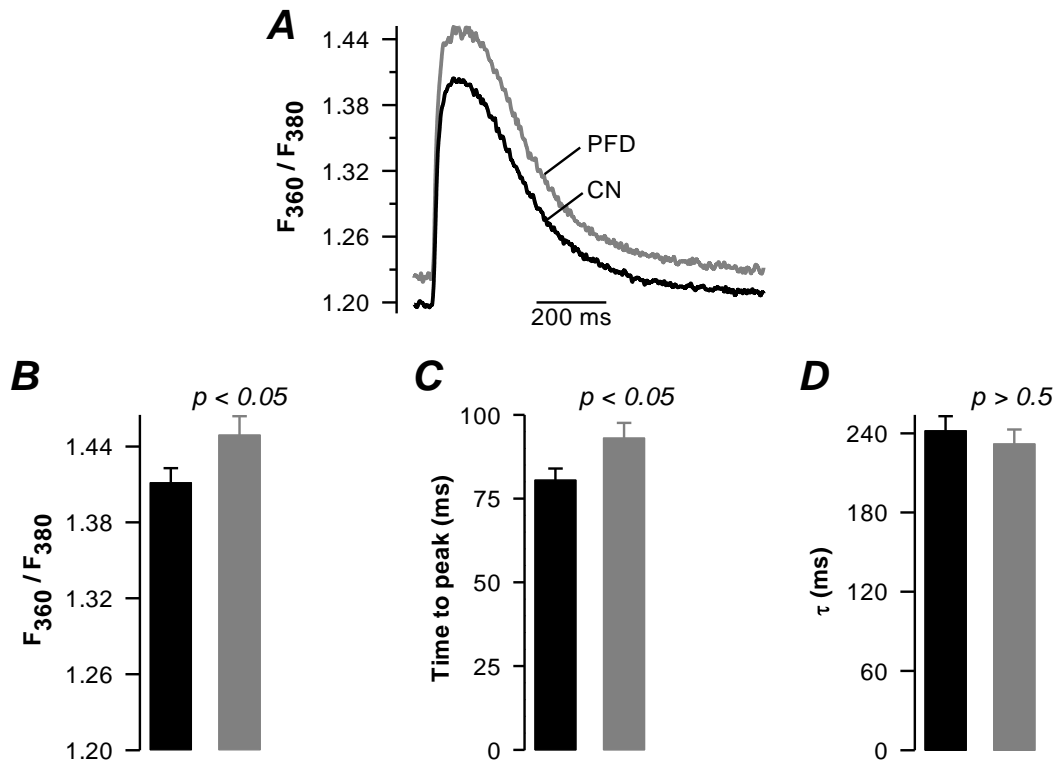


Figura 24. Impacto del tratamiento crónico de pirfenidona en los transitorios de Ca^{2+} de miocitos ventriculares de rata adulta. En (A) se muestra el comportamiento de la media de todos los registros realizados en células control (CN, línea negra) y células incubadas con pirfenidona (PFD, línea gris). Las gráficas de barras representan la media \pm ES del Ca^{2+} sistólico (B), el tiempo al que se alcanza dicho valor de Ca^{2+} (C) y la constante del tiempo de decaimiento del transitorio (D). Barras negras - células control ($n=82$); barras grises - células tratadas con pirfenidona ($n=68$). [Tomada de Monsalvo-Villegas, 2015].

Una vez que obtuvimos los resultados mostrados en la Fig. 24, nos preguntamos si el incremento en el Ca^{2+} sistólico se vería acompañado con cambios a nivel de contractilidad. Cabe señalar, que las mediciones de la contractilidad, no solo se limitaron a registrar los cambios en la longitud celular, sino que el equipo también nos permitió medir simultáneamente cambios en la longitud del sarcómero (Fig. 25).

Los resultados respectivos indican que el tratamiento con PFD, provoca no sólo un incremento en el porcentaje máximo de acortamiento (Fig. 25), tanto a nivel de sarcómero como a nivel celular

(Fig. 25C y 25F, respectivamente), sino que además genera una mayor velocidad de contracción (Fig. 25D y 25G) y de relajación (Fig. 25E y 25H).

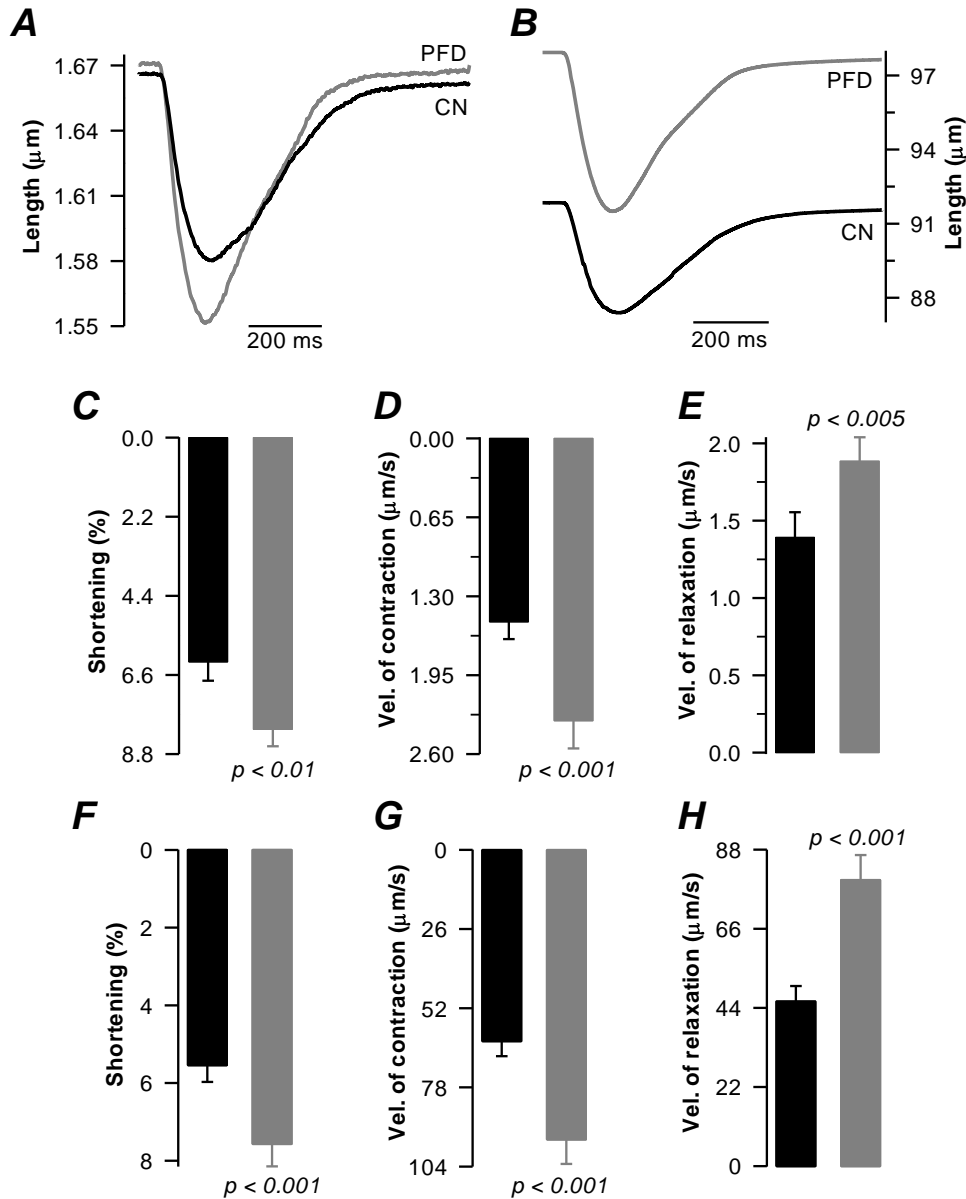


Figura 25. Efectos de pirfenidona en las propiedades contráctiles a nivel de sarcómero y celular. A, B) Comportamiento de la media de registros obtenidos a partir de mediciones de la contracción del sarcómero (A) y celular (B). El resumen de las mediciones obtenidas a partir de dichos registros se muestra en las gráficas de barras, tanto para el sarcómero (C - E) como a nivel celular (F - H). Células control - barras negras (n=69); células tratadas con pirfenidona - barras grises (n=62). [Tomada de Monsalvo-Villegas, 2015].

Posteriormente, con la finalidad de conocer si el tratamiento crónico con el fármaco modifica la sensibilidad de la maquinaria contráctil a la activación por Ca^{2+} construimos diagramas de fases (gráficas de $[Ca^{2+}]_i$ vs porcentaje de acortamiento). La Fig. 26, muestra dichos diagramas de fases normalizados, en los que se puede observar que PFD los desplaza hacia la derecha

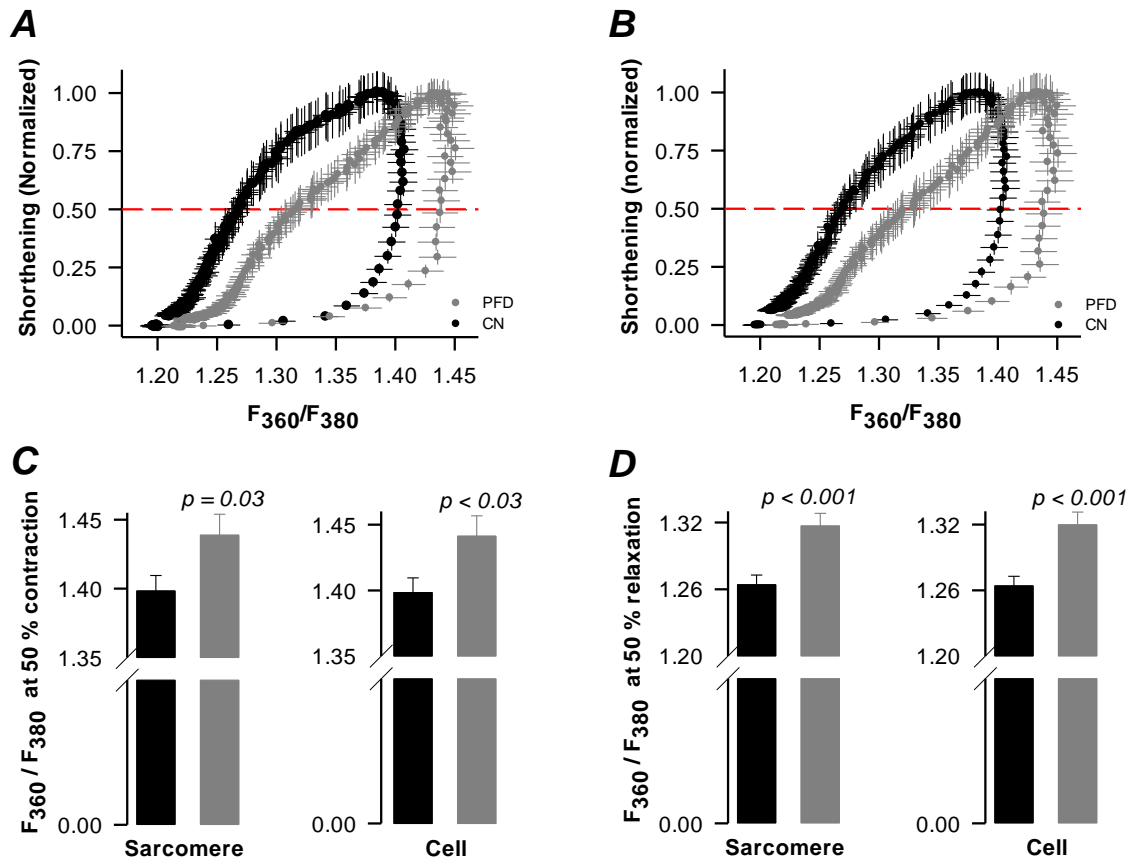


Figura 26. **PFD modifica la sensibilidad de la maquinaria contráctil a la activación por Ca^{2+} .** A, B) Diagramas de fases que fueron construidos a partir de los valores de $[Ca^{2+}]_i$ y contracción que se presentan en las Figuras 24 y 25. C – D) Valores de $[Ca^{2+}]_i$ a los que se observa el 50% de contracción (C) y relajación (D), ya sea del sarcómero (izquierda) o celular (derecha). [Tomada de Monsalvo-Villegas, 2015].

Para cuantificar dicho efecto, se estimó la $[Ca^{2+}]_i$ requerida para alcanzar el 50% de la contracción y relajación máxima. Los resultados indican que, tanto a nivel de sarcómero como de miocito, la incubación con PFD resulta en un aumento significativo en la $[Ca^{2+}]_i$ necesaria para provocar un 50 % del efecto en la maquinaria contráctil (Fig. 26C y 26D).

Tomados en conjunto, los resultados de la Fig 26 sugieren que PFD promueve una disminución en la sensibilidad de la maquinaria contráctil a la activación por Ca^{2+} .

JUSTIFICACIÓN

En modelos animales de daño al miocardio y fibrilación auricular, la administración de PFD provoca un mejor desempeño cardiaco. Eso se debe al menos en parte a que el fármaco disminuye los niveles de fibrosis. Es muy probable que dicho efecto morfológico sea reforzado por cambios a nivel de remodelación eléctrica. En ese sentido, datos de nuestro laboratorio indican que PFD estimula la actividad de Cav1.2, independientemente de la vía de señalización del TGF- β . El mencionado estímulo en Cav1.2 se traduce en no sólo mayor liberación de Ca²⁺ del RS, sino también mayor porcentaje de acortamiento. Además, dichos efectos se acompañan de una aceleración en la contracción y relajación. Finalmente, se sabe que PFD regula a Cav1.2 a través de una vía de señalización en la que participan la NOS y la PKA. En contraste, todavía no se han identificado las bases moleculares que subyacen al resto de las acciones electrofisiológicas mencionadas.

HIPÓTESIS

Pirfenidona modifica el acoplamiento excitación-contracción de cardiomiocitos, debido a que altera la actividad o niveles de expresión de proteínas involucradas en el funcionamiento de los sistemas que controlan la contractilidad y la homeostasis del calcio libre intracelular.

OBJETIVO GENERAL

Investigar los mecanismos moleculares por los que PFD modifica el acoplamiento excitación-contracción de cardiomiocitos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. En miocitos ventriculares de rata adulta, determinar si un tratamiento de 1 y 2 días con pirfenidona modifica:

- a) El contenido de Ca^{2+} disponible para ser liberado del retículo sarcoplásmico.
- b) La actividad de los sistemas lentos de remoción de Ca^{2+} intracelular.
- c) La contribución del intercambiador sodio/calcio en la remoción de Ca^{2+} intracelular.
- d) Los niveles de expresión proteica del intercambiador sodio/calcio.
- e) La actividad de la bomba SERCA.

2. Evaluar, en miocitos auriculares, si pirfenidona provoca cambios en la amplitud y cinética de:

- a) Transitorios de Ca^{2+} .
- b) Contracción del sarcómero.
- c) Contracción celular.

3. Investigar si las vías de señalización de ROS, NOS y PKA participan en los efectos de pirfenidona; concretamente, identificando posibles cambios en:

- a) La producción de ROS (basal y exacerbada mediante una exposición a acetaldehído o peróxido de hidrógeno).
- b) Los niveles de producción de NO.
- c) El nivel de expresión proteica de eNOS y nNOS.
- d) La contractilidad que se presenta en ausencia o presencia del inhibidor selectivo de PKA ($_{\text{myr}}\text{PKI}_{14-22}$).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo primario de cardiomiocitos 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 250 g, siguiendo el procedimiento previamente descrito por Ramos-Mondragón *et al.* (2012).

Básicamente, lo que se hizo fue anestésiar una rata, mediante una combinación de clorhidrato de Ketamina-Xilazina (100:10 mg/Kg rata, vía intraperitoneal). Una vez anestesiado el animal, se monitorearon sus reflejos mediante presiones en su cola y extremidades traseras realizadas con unas pinzas atraumáticas, cuando el roedor perdió completamente los reflejos, el corazón se retiró rápidamente de la caja torácica y se colocó inmediatamente en una solución tipo Tyrode a 4 °C cuya composición es (en mM): NaCl 130, KCl 5.4, MgCl₂ 0.5, HEPES 25, NaH₂PO₄ 0.3, glucosa 22, lactato 1.1, ácido pirúvico 3, pH = 7.4. Con la finalidad de eliminar el Ca²⁺ extracelular, a dicha solución se le adicionó 0.2 mM de EGTA (solución T).

Una vez extirpado el corazón, se le retiró el exceso de tejido conectivo y fue canulado y conectado a través de la arteria aorta a un sistema de perfusión de Langendorff, el cual se calibró para perfundir soluciones de manera retrógrada a una temperatura de 37 °C. Primeramente se perfundió con solución Tyrode, durante ~5 minutos, lo que además de permitir la depleción del calcio extracelular también eliminó el exceso de sangre. Subsecuentemente, el corazón se perfundió durante ~10 min con solución Tyrode suplementada con colagenasa tipo II (1.5 mg/mL) y proteasa XIV (48 µg/mL), con la finalidad de llevar a cabo la digestión enzimática de la ECM.

Una vez que el corazón se tornó ligeramente pálido y perdió su firmeza, se disecaron ya sea la aurícula derecha o ambos ventrículos. Para obtener la aurícula derecha se hizo un corte por debajo de las venas cavas y se trazó un eje imaginario que excluye al septum auricular (de esa manera se excluyen a las células del nodo sinoauricular y de aurícula izquierda; Lei *et al.*, 2004). Por otra parte, para obtener los ventrículos se realizó un corte justo por debajo del surco coronario. Los tejidos obtenidos se maceraron suavemente con una pipeta siliconada de boca ancha, permitiendo obtener células aisladas. Con la finalidad de reintroducir gradualmente el Ca²⁺ a las células y atenuar el daño celular, las células se incubaron en tres diferentes soluciones

Tyrode (20 min, 37°C, c/incubación) con concentraciones crecientes de Ca²⁺ (83, 250 y 500 μM) y suplementadas con las siguientes concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA): 17 mg/ml, 10 mg/ml, y 10 mg/ml, respectivamente.

Bajo condiciones de esterilidad, las células fueron sembradas sobre cajas Petri o bien sobre cubreobjetos de vidrio previamente colocados dentro de cajas Petri. En ambos casos, las superficies fueron pretratadas con laminina (SIGMA – L2020) durante 15 min. Posteriormente, las células se incubaron (2 h a 37 °C, en presencia de una atmósfera saturada de humedad y con 5% de CO₂) en un “medio de incubación” que consiste en: DMEM, 10% de FBS, 100 U/ml de penicilina y 100 μg/mL de estreptomina. Subsecuentemente, el medio de incubación se sustituyó por un “medio de cultivo” (similar al de incubación excepto que el FBS fue previamente inactivado por calor — 56°C, 30 minutos). Las células se dividieron en dos grupos, control y PFD y se mantuvieron 1-2 días en la incubadora de CO₂. La única diferencia, entre ambos grupos, fue que al medio de cultivo del grupo PFD se le añadió 1 mM de pirfenidona (a partir de una solución concentrada, en DMSO). A esa concentración el fármaco ejerce su mayor efecto en Ca_v1.2, y la posible interferencia del vehículo (DMSO) es nula estadísticamente hablando (Ramos-Mondragón *et al.*, 2012).

El medio de cultivo (control o suplementado con PFD) se eliminó ~15 min antes de realizar las mediciones, y se sustituyó por una solución ya sea externa (véase Experimentos de fijación de voltaje y epifluorescencia) o Tyrode (suplementada con 2 mM de Ca²⁺ y 10 mM de glucosa). La idea de realizar este lavado, y ejecutar los experimentos en ausencia de PFD, es descartar posibles efectos rápidos y transitorios del fármaco (que se estarían revirtiendo en cuestión de minutos o incluso segundos) y de esa manera podríamos enfocarnos al estudio de cambios persistentes. Aquí es importante mencionar que el tiempo máximo de experimentación, en cada cubreobjetos con células, se limitó a ~60 min. En otras palabras, podemos afirmar que todos los experimentos se realizaron dentro de los primeros 15-60 minutos, subsecuentes al lavado de medio de cultivo (a temperatura ambiente, ~24 °C).

Experimentos de fijación de voltaje y epifluorescencia

Los transitorios de Ca^{2+} y la actividad de los LTCC se investigaron simultáneamente, mediante un enfoque experimental que permite monitorear la intensidad de fluorescencia de un fluoróforo sensible a Ca^{2+} (Fluo-4) y conjuntamente realizar experimentos de fijación de voltaje, utilizando la técnica de “*patch-clamp*” en su modalidad de célula completa.

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 definidas, y sin contracciones espontáneas, Fig. 27A.

En la técnica de fijación de voltaje, se pretende controlar al potencial de membrana (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), el cual es proporcionado por un amplificador (Axopatch 200B) que se encuentra controlado por una computadora. Una interfase digital-analógica (Digidata 1322) permite que exista comunicación entre el amplificador y la computadora, convirtiendo señales analógicas a digitales y viceversa. Dicha interfase también se utilizó para digitalizar la señal de fluorescencia del Fluo-4. Ambos parámetros de interés (I_m y fluorescencia) fueron observados tanto en un osciloscopio como en el monitor de la computadora, y se almacenaron en un disco duro para su análisis posterior.

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

El día del experimento, un cubreobjeto con células se transfirió, de la incubadora a una cámara de registro (C-Stim, Cell MicroControls), que contenía solución externa control. Los electrodos de borosilicato fueron llenados con solución interna (véase Soluciones de registro) 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. Cuando el electrodo tocó la célula se aplicó presión negativa, a fin de formar un sello de alta resistencia eléctrica (giga sello; $>1 \text{ G}\Omega$)

y alcanzar el estado conocido como *cell-attached*. Después el voltaje en la pipeta (o electrodo de *patch*) se mantuvo a -80 mV y se aplicó un pulso 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 aplicó un pulso de voltaje similar al de *cell-attached* (de -80 a -90 mV), 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 .

Una vez adquirida la configuración de *whole-cell*, se aplicó un potencial de mantenimiento (o *holding potencial*, HP) de -50 mV y que inactiva a los canales de Na^+ y de calcio tipo T (Bean and Rios, 1989; Hirano, Fozzard and January, 1989). La resta de componentes lineales, en la señal de corriente, se llevó a cabo mediante un protocolo denominado p/N, incluido en el programa Clampex 10.2 que a su vez forma parte de un paquete de software de Axon Instruments®. El software, también incluye a Clampfit 10.2 el cual se utilizó para determinar el valor máximo de I_{CaL} (valor al pico) 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). La dependencia de voltaje de la activación se evaluó ajustando curvas corriente-voltaje (curvas I-V) a la siguiente ecuación de Boltzmann:

$$I_{\text{Ca}} = G_{\text{max}} (V_m - V_{\text{rev}}) / (1 + \exp[(V_m - V_{1/2}) / k_G]) \quad (1)$$

donde G_{max} es la conductancia máxima, V_m es el potencial de membrana, V_{rev} representa el potencial de inversión aparente de I_{Ca} , $V_{1/2}$ es el potencial de membrana necesario para activar al 50% de G_{max} , y k es un factor que refleja al grado de inclinación de la curva.

De forma simultánea a la medición de I_{CaL} , se registró la intensidad de fluorescencia de la sal de pentapotasio de Fluo-4 (Fluo-4 k_5), la cual es un fluoróforo sensible a Ca^{2+} e impermeable a la membrana, por lo que se incorporó a la célula mediante la solución interna contenida en la micropipeta de *patch-clamp* (50 μM). 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) conectado al convertidor analógico-digital de la interfase.

La amplitud máxima del transitorio de Ca^{2+} (durante el pulso de prueba) se calculó conforme a la siguiente ecuación:

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

Donde $F_{(\text{max})}$ significa el nivel máximo de fluorescencia observado durante el pulso de voltaje, y F_b su basal correspondiente registrada justo antes de la aplicación de dicho pulso.

Recaptura de Ca^{2+} intracelular por la bomba SERCA.

Para investigar la velocidad con que la bomba SERCA reintroduce Ca^{2+} al RS, nos basamos en lo reportado por Osornio-Garduño, 2013. Básicamente, se generaron transitorios de Ca^{2+} por medio de la aplicación de pulsos de voltaje, que fueron de -10 a +40 mV (con incrementos de 10 en 10 mV y duración de 30 ms cada uno). Obteniendo de esa manera una familia de transitorios de Ca^{2+} por cada célula. Posteriormente, con la finalidad de obtener la constante de tiempo (τ), se ajustó una función exponencial a la fase de decaimiento de cada uno de los transitorios. Finalmente, se promedió el valor de τ y se graficó en función de V_m . Los registros se llevaron a cabo en solución externa control (*ver soluciones de registro*).

Contenido de Ca^{2+} del RS disponible para ser liberado, actividad del NCX y contribución de sistemas lentos a la remoción de Ca^{2+} .

Una vez estimada la magnitud de los transitorios de Ca^{2+} e I_{CaL} mediante pulsos de voltaje despolarizante, se indujo el vaciamiento del calcio del RS, mediante una doble aplicación de cafeína (30 mM, durante 25 s, c/u). Primero se aplicó cafeína en una solución libre de Na^+ , después se realizó un lavado, y finalmente se aplicó nuevamente cafeína, pero en una solución suplementada con 140 mM de Na^+ (*ver soluciones de registro*). Las soluciones se aplicaron localmente mediante un sistema de perfusión rápida (VC-77SP) de Warner Instruments, el cual posee un sistema de microválvulas que fueron controladas digitalmente.

Lo anterior nos permitió cuantificar: **i)** la amplitud máxima de fluorescencia en respuesta a cafeína, la cual es proporcional a la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ disponible para ser liberada, y **ii)** la rapidez con que la señal de Ca^{2+} regresa a su nivel basal, ya sea cuando el NCX se encuentra activo (140 mM de Na^+)

o no (0 mM de Na⁺). Esto último, a su vez, nos permitió estimar la contribución de los sistemas lentos y del NCX a la remoción del Ca²⁺ intracelular, mediante una determinación del porcentaje de señal de fluorescencia que permanece al final de cada pulso de cafeína.

Soluciones de registro

Las mediciones simultáneas de transitorios de Ca²⁺ e I_{CaL} se llevaron a cabo en presencia de las siguientes soluciones. **Externa** (en mM): Ácido metasulfónico 125, TEA-OH 115, HEPES 10, CaCl₂ 10 MgSO₄ 8, 4-aminopiridina 5, ácido 9-antraceno carboxílico 1, 2- aminoetil difenilborinato 0.01, Creatina 25, glucosa 10 y 2-3-butanodiona-monoxima 2. **Interna** (en mM): Cs-Asp 160, TEA-Cl 25, HEPES 10, CsCl 10, Cs-EGTA 6, CaCl₂ 1, ATP-Mg 5, MgCl₂ 0.5, GTP-tris 0.05, Fluo-4 K₅ 0.05 y glucosa 10. El pH se llevó a 7.3, utilizando ya sea TEA-OH (externa) o CsOH (interna).

Para estimar la actividad de los sistemas de remoción de Ca²⁺ se emplearon dos soluciones similares a la externa previamente mencionada, excepto que se suplementaron con 0.5 mM de EGTA y 30 mM de cafeína. Más precisamente, para la actividad de los sistemas lentos o insensibles a Na⁺ extracelular se utilizó la misma solución externa (solución **Na⁺ -**), mientras que para la actividad del NCX a dicha solución externa se le sustituyó el TEA por 140 mM de Na⁺ (Sol. **Na⁺ +**).

Contractilidad y transitorios de Ca²⁺

También se llevaron a cabo mediciones simultáneas de contractilidad y transitorios de Ca²⁺, en células intactas (no sometidas a experimentos de *patch-clamp*). Para esto, se utilizó un sistema que registra contractilidad y fluorescencia, de la marca IonOptix (IonOptix Co., Milton, EUA). La velocidad de muestreo fue de 250 Hz y 1 KHz, para la contractilidad y fluorescencia, respectivamente.

El día del experimento, las células se incubaron (15 min, a temperatura ambiente) con solución Tyrode suplementada con la forma pentaacetoximetil ester (AM) de Fura-2 (6 μM). Subsecuentemente, con la finalidad de retirar el exceso del fluoróforo y permitir la desesterificación, se realizó un lavado de 10 min, en la misma solución, pero carente de Fura-2 AM (en una serie experimental, este lavado se aprovechó para aplicar ¹⁴⁻²²PKI_{MYR}; 5 μM). Una vez finalizado el lavado, las células se transfirieron a una cámara de registro (FHD, IonOptix) y se

agregaron 600 μL de solución Tyrode. La cámara se montó en un microscopio invertido (Motic AE31) y 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.

La contractilidad se evaluó con ayuda de un sistema de video (Myocam-S) y software (SoftEdge) que analiza el contraste de las imágenes y detecta dinámicamente la posición del borde celular con ayuda también de un adaptador (CFA300).

También se estimó la longitud promedio de los sarcómeros de la célula, utilizando un software denominado SarcLen (Ionoptix). El método consiste en 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), mediante una transformada rápida de Fourier. El nivel de resolución involucrado es de 10-20 nm.

El estímulo eléctrico consistió en periodos de 75 s en los que se aplicó estimulación eléctrica de campo (pulsos de 20 V y 20 ms, aplicados a 0.2 Hz). Dichos estímulos eléctricos se aplicaron mediante cables de platino ubicados en la cámara de registro, los cuales se conectaron a un estimulador (MyoPacer), estando el último conectado a una interfase (FSI700, IonOptix) que sincronizó 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

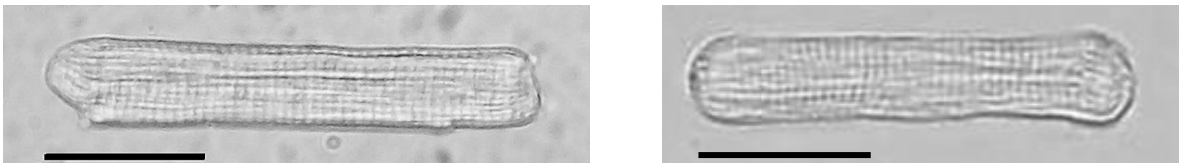
La fluorescencia de emisión (tanto de 360 nm como de 380 nm), se filtró a 510 ± 20 nm, antes de ser detectado por un tubo fotomultiplicador (PMT400) el cual era controlado por la interfase o convertidor analógico-digital (FSI700). Los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ los reportamos como el cociente de

fluorescencia entre las longitudes de onda que se utilizaron para excitar al fluoróforo (F_{360}/F_{380}).

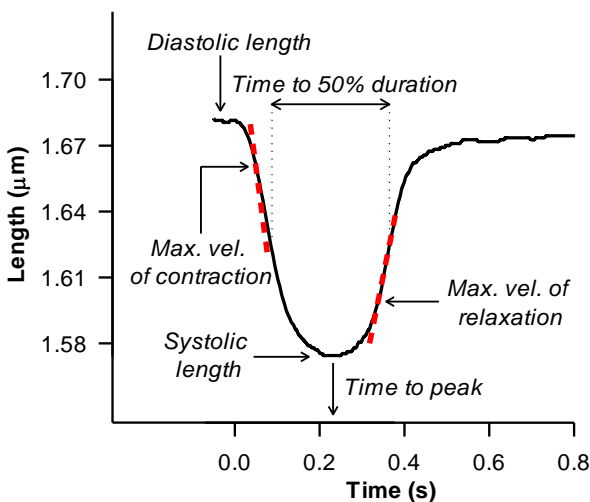
En cada célula se analizó el promedio de ocho registros, con ayuda del programa IonWizard 6.4 (IonOptix). Los parámetros obtenidos para la contracción celular y del sarcómero fueron: longitud en diástole y sístole, máximo porcentaje de acortamiento (respecto a la longitud diastólica), tiempo al pico (tiempo en el que se alcanza el acortamiento máximo, respecto al inicio del estímulo), velocidad máxima de contracción y de relajación, así como el tiempo que pasa entre el 50% de la contracción, y el 50% de la relajación (Fig. 27A).

En el caso de los transitorios de Ca^{2+} , se investigaron los siguientes parámetros: 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, y tiempo que pasa entre el 50% de aumento y el 50% de disminución (Fig. 27B).

A



B



C

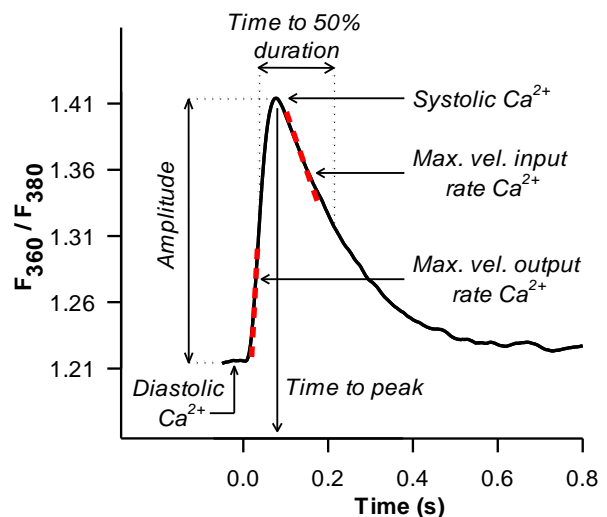


Figura 27. Morfología representativa de miocitos analizados y ejemplos de los registros de contractilidad y transitorios de Ca^{2+} , con sus mediciones respectivas. A) Miocitos representativos que fueron registrados tras mantenerse en uno o dos días en medio de cultivo (izq. y der., respectivamente). La barra representa 30 μm . B) Cinética del acortamiento y relajación celular. (C) Transitorio de Ca^{2+} . En ambos casos se ilustran los parámetros a comparar entre células control y tratadas con PFD. Los registros son de un miocito ventricular control. [Imagen tomada de Monsalvo-Villegas, 2015]

Producción intracelular de NO y ROS

La producción de radicales libres, NO y ROS, se estimó a partir de la fluorescencia emitida por los sensores DAF-FM DA (Invitrogen, Cat. D23844) o CM-H₂DCF DA (Invitrogen, Cat. C6827), cuya intensidad de fluorescencia aumenta de manera directamente proporcional con la concentración de NO y ROS (respectivamente).

Brevemente, los cardiomiocitos se incubaron 15 min en solución Tyrode suplementada con el sensor de interés más Fura-2 AM (3 μ M, c/u). Posteriormente se realizó un lavado de 10 min con solución Tyrode y las células se montaron en un microscopio invertido equipado con epifluorescencia. Los fluoróforos de NO y ROS se excitaron a 480 nm y la emisión de fluorescencia se detectó a 530 nm.

El Fura-2, por su parte, se excitó en su punto isobéptico (360 nm); es decir, la longitud de onda a la cual el fluoróforo es insensible a la concentración de Ca²⁺. En cada célula, la señal fluorescente asociada con NO o ROS se normalizó por su respectiva señal de Fura-2 (para eliminar como variables al volumen celular y diferentes capacidades de carga y desesterificación de los sensores).

Ensayos de Western-blot.

Los niveles proteicos de NCX, eNOS y nNOS se investigaron mediante ensayos de *Western-Blot*. Para ello, en cajas Petri de 35x10 mm pretratadas con laminina, se sembraron cardiomiocitos (con una densidad celular de 150 - 300x10³ cels/cm²) y se cultivaron durante dos días en condiciones control o en presencia de pirfenidona.

Subsecuentemente, las células se lavaron dos veces con buffer salino de fosfatos (PBS) frío (en mM: NaCl 137; KCl 2.7; Na₂HPO₄ 8; KH₂PO₄ 1.5), e inmediatamente se incubaron durante 5 min en buffer de lisis RIPA (en mM: Tris-HCl (pH 7.4) 20; NaCl 150; Na₂EDTA 1; EGTA 1; Pirofosfato de sodio 2.5; β -glicerolfosfato 1; ortovanadato de sodio 1; fluoruro de sodio 10, NP-40 1%, desoxicolato de sodio 1% e inhibidor de proteasas (cOmplete 1X, cat. 11697498001). El lisado celular se recolectó y se sonicó a 40 KHz durante 10-15 s (Sonics Vibra Cell, Ultrasonic Processor).

Posteriormente, para conocer la concentración total de proteínas, se realizó una curva patrón de

proteínas mediante el método de Bradford, para ello se empleó la solución de Coomassie (Bradford) protein assay kit y como estándar proteico se usó la albumina de suero bovino, libre de ácidos grasos.

Después, se realizaron diluciones del lisado celular (1:100 y 1:50) y se obtuvo la concentración proteica del lisado celular mediante la interpolación de la absorbancia de las diluciones (multiplicada por su factor de dilución), en la recta determinada por mínimos cuadrados de la curva patrón.

Una vez conocida la concentración proteica, se cargaron de 20 a 50 μg de proteína (dependiendo de la proteína) en un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) a una concentración de 10% de poliacrilamida para la proteína NCX, para las isoformas de NOS el gel de poliacrilamida se hizo en gradiente de 10 a 5%. Las proteínas fueron separadas con un sistema de BIO-RAD para electroforesis (Mini-PROTEAN, electrophoresis system) y con buffer de corrida (en mM: Tris-base 25 (pH=8.3); Glicina 192 y SDS 0.1%) a 120 V durante 2.5 h.

Concluida la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de Polivinilideno difluoruro (PVDF) con poro de 0.2 μm , mediante un sistema de transferencia húmeda (Mini trans-blot cell) en buffer de transferencia (en mM: Tris-base 25 (pH=8.3); Glicina 192; SDS 0.1%; metanol 20%), a 310 mA durante 1.5-2 h. Posteriormente, la membrana de PVDF se bloqueó con BSA al 3% en PBS-Tween 0.05% (PBS-T), durante 2 h a temperatura ambiente; subsecuentemente, las mbs se cortaron entre los marcadores de 75 KDa y 50 KDa.

La región que contenía las proteínas de mayor peso molecular se incubó durante toda la noche a 4 C (en agitación constante), con el anticuerpo primario monoclonal correspondiente: anti-NCX (R3F1, Swant, 1:1000), anti-eNOS (610296, BD Bioscience, 1:800), anti-nNOS (610308, BD Bioscience, 1:800). Concluida la incubación se realizaron 3 lavados de 10 min c/u con PBS-T. Después, la membrana se incubó con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con la peroxidasa de rábano durante 1 h., seguido de otro ciclo de 3 lavados con PBS-T (10 min c/u).

Como control de carga se utilizó a la tubulina (anticuerpo primario monoclonal anti- β -tubulina; 1:4000, 322600–Invitrogen).

La detección de proteína se realizó mediante un ensayo de detección de quimioluminiscencia. Para ello se empleó el Kit Amersham ECL prime Western blotting detection reagent (GE., cat. RPN 2232) y junto con el uso del anticuerpo secundario conjugado con HRP, se provocó una reacción enzimática, que da como resultado final la emisión de luz. Dicha luz fue detectada en una película radiográfica (Kodak film, cat. 604 0331).

Para obtener la cuantificación de la señal de las bandas, los autoradiogramas se colocaron en un transiluminador (Vernier, White Light Transilluminator) y fueron fotografiados con una cámara digital (Canon, mod. PowerShot A720 IS). Las imágenes obtenidas, se analizaron con el programa ImageJ, disponible en www.nih.com.

Análisis estadístico

Los datos se muestran como la media \pm el error estándar (ES). Éstos, se obtuvieron del número de células señaladas en las gráficas correspondientes. En general se aplicaron pruebas de *t* de Student, para muestras no pareadas. Sin embargo, cuando fue necesario realizar múltiples comparaciones, se utilizó ANOVA. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Tal como se menciona en los antecedentes, la Maestra Osornio obtuvo información relacionada con el tema de los efectos de PFD en miocitos auriculares (Osornio-Garduño, 2013). Subsecuentemente retomé el tema, trabajando en miocitos ventriculares como parte de mis estudios de maestría (Monsalvo-Villegas, 2015).

En el presente trabajo se hizo una caracterización más extensa de las respectivas tesis de maestría. En otras palabras, los tres trabajos están considerablemente relacionados y, en consecuencia, en esta sección me propuse integrar todos los datos. La ventaja de este enfoque es que facilita la presentación, y al mismo tiempo describe el estado actual del tema de investigación.

La información derivada de las tesis de maestría no necesariamente es idéntica a la reportada en esta tesis. Eso se debe a que, para este trabajo, la información de otras tesis generalmente fue complementada (aumentando el número de experimentos o “n”). Finalmente, es importante aclarar que la descripción de los resultados, así como de la sección subsecuente (Discusión) es una adaptación del artículo que publicamos hace dos años (Monsalvo-Villegas et al., 2018).

El primer aspecto que investigamos fue si, en miocitos ventriculares, la mayor densidad de I_{Ca} que provoca PFD (Ramos-Mondragón et al., 2012) se traduce en cambios en la magnitud de los transitorios de calcio. En las figuras 28A y 28B se presentan ejemplos de los registros que se lograron obtener para este objetivo, utilizando un pulso de voltaje a +10 mV.

Tal como se puede apreciar, PFD aumenta casi al doble la magnitud no sólo de I_{Ca} , sino también de los transitorios de Ca^{2+} . En resumen, las células control (n = 14) y tratadas con PFD (n = 16) presentaron los siguientes valores de transitorios de Ca^{2+} e I_{Ca} : $0.5 \pm 0.15 \Delta F/F$ y $0.9 \pm 0.11 \Delta F/F$ ($p < 0.05$), y -9.4 ± 1.2 pA/pF y -16.7 ± 1.4 pA/pF ($p < 0.003$).

En experimentos subsecuentes investigamos la dependencia al voltaje de los transitorios de Ca^{2+} e I_{Ca} (véanse los trazos representativos de la Fig. 28C). En ambos casos, la acción estimuladora de PFD se observó a distintos niveles de potencial de membrana (Figs. 28D y 28E).

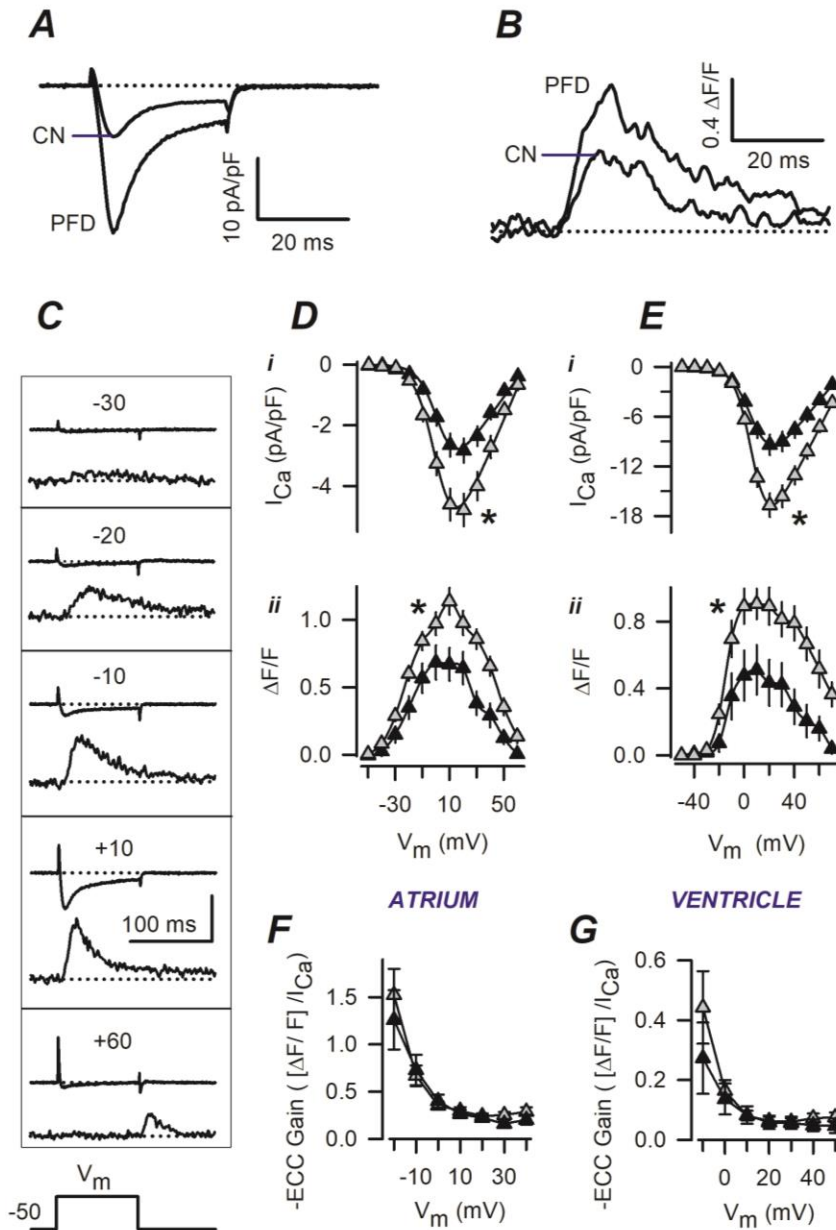


Figura 28. Experimentos simultáneos de patch clamp y microfluorimetría revelan que PFD aumenta la magnitud de los transitorios de Ca^{2+} e I_{Ca} . A-C) Registros representativos de I_{Ca} y transitorios de Ca^{2+} que fueron registrados simultáneamente, ya sea en miocitos ventriculares (A, B) o auriculares (C). En A y B, los registros obtenidos en miocitos control (CN) y tratados con pirfenidona (PFD) están superpuestos, y la membrana se despolarizó brevemente (30 ms) a +10 mV. Por su parte, el panel C ilustra trazos como los que se presentan en A y B, pero que fueron obtenidos a distintos niveles de potencial de membrana (V_m), en un miocito auricular control. La barra de calibración vertical indica 100 pA y 1.0 $\Delta F/F$. D, E) Resumen de los valores de I_{Ca} (i) y transitorios de Ca^{2+} (ii) que fueron obtenidos “al pico” de los registros (véase C), tanto en miocitos auriculares (D) como ventriculares (E). Los resultados son de un total de 28 miocitos auriculares (11 CN, 17 PFD) y 32 ventriculares (17 CN, 15 PFD). F, G) Dependencia de voltaje de la ganancia del AEC, estimada a partir de los datos que se muestran en D y E. Los símbolos cerrados y grises denotan Control y PFD, respectivamente. * $p < 0.05$, ANOVA. [Basada en datos de Osornio-Garduño, 2013 y Monsalvo-Villegas, 2015]

Después de ajustar las curvas I-V a una ecuación tipo Boltzmann (ecuación 1), se llegó a la conclusión de que PFD provoca un aumento del 65 % en la conductancia máxima de Ca^{2+} (G_{max} , lo cual es acorde a lo publicado inicialmente por Ramos-Mondragón y colaboradores, 2012).

Más concretamente, los valores de G_{max} que fueron estimados en células control y tratadas con PFD fueron (en nS/pF): 62 ± 8 y 105 ± 10 ($p < 0.01$, miocitos auriculares); y 184 ± 24 y 297 ± 25 ($p < 0.003$, miocitos ventriculares). Por su parte, los parámetros k y $V_{1/2}$, que describen la dependencia al voltaje de la conductancia a calcio, no resultaron afectados por PFD.

También se investigó la ganancia del AEC; encontrándose idéntica, entre miocitos de control y tratados con PFD (Figs. 1F y 1G). Este resultado sugiere que PFD induce una I_{Ca} que no es redundante para el AEC. En otras palabras, la fracción adicional de I_{Ca} que provoca el fármaco no está “de sobra”; por el contrario, tiene la misma capacidad de evocar CICR que la I_{Ca} de células control.

A continuación, se examinó la actividad de SERCA, tal como se ilustra en la Fig. 29A. Más específicamente, la fase de decaimiento del transitorio de Ca^{2+} se ajustó a una ecuación exponencial de primer orden. Los respectivos valores de τ (constante de tiempo) se presentan en las figuras 29B y 29C. Tal como se puede apreciar, PDF no altera este parámetro, en una amplia gama de potenciales de membrana. Esto significa que los efectos del fármaco no involucran cambios en la actividad de SERCA.

Para evaluar el contenido de Ca^{2+} del SR que se encuentra disponible para ser liberado (véanse trazos representativos en las figuras 29D y 29E), se aplicó solución externa adicionada con cafeína durante 25 s, a través un sistema de perfusión rápido (detalles en metodología). Posteriormente, se estimó el valor máximo de $\Delta F/F$ provocado por cafeína (F_{Peak}), y se observó que dicho valor no varía significativamente entre células control y tratadas con PFD (independientemente de la ausencia o presencia de Na^+ extracelular, Figs. 29F y 29H). Estos datos indican que la mayor amplitud de los transitorios de Ca^{2+} que provoca PFD (Fig. 28) no se debe a un posible aumento en la carga de Ca^{2+} del RS. En las Figs. 29D-29I se utilizaron dos concentraciones distintas de Na^+ extracelular. Este enfoque nos permitió estudiar el funcionamiento de transportadores que expulsan Ca^{2+} , independientes y dependientes (NCX) de Na^+ .

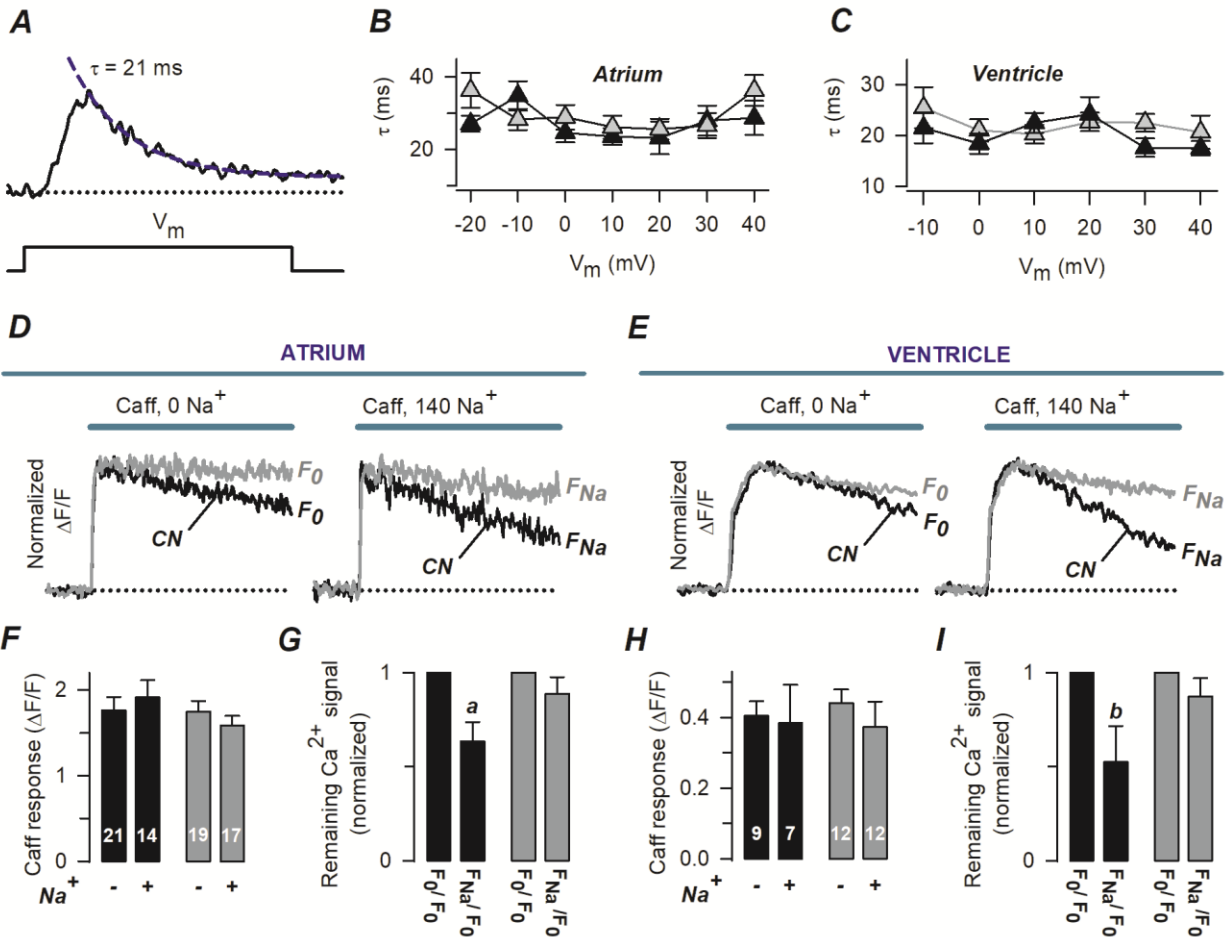


Figura 29. Pirfenidona atenúa la tasa de expulsión de Ca^{2+} a través del NCX, pero no la actividad de SERCA. A) Transitorio de Ca^{2+} que se registró tal como se describe en la figura 28. La línea discontinua representa una función exponencial que describe la fase de decaimiento. También se indica la respectiva constante de tiempo (τ). B, C) Valores de τ que fueron obtenidos como en A, en función de V_m . D, E) Trazos representativos de transitorios de Ca^{2+} que fueron inducidos por un doble pulso de cafeína (Caff), inicialmente en ausencia (0 Na^+) y luego en presencia de 140 mM extracelular de Na^+ (140 Na^+). Los registros se obtuvieron a partir de cuatro cardiomiocitos (dos auriculares – D y dos ventriculares – E). F_0 y F_{Na} son sinónimo de la señal de Ca^{2+} que permanece al final de las aplicaciones de cafeína, en ausencia y presencia de sodio. Para enfatizar posibles cambios en la cinética, los registros se muestran normalizados con respecto a su valor máximo de respuesta a cafeína (F_{Peak}). F, H) Valores absolutos de F_{Peak} (Caff response) y número de células investigadas. G, I) En cada célula, F_0 y F_{Na} (ver D, E) se normalizaron con respecto a F_0 . Subsecuentemente, los valores obtenidos fueron agrupados y promediados. En todos los paneles, los colores negro y gris denotan a la condición control (CN) y células tratadas con PFD, respectivamente. ^a $p < 0.005$, ^b $p < 0.05$; en comparación con su respectiva condición F_0/F_0 . (prueba t de Student, para datos pareados). [los datos de aurícula se tomaron de Osornio-Garduño, 2013]

Lo primero que se hizo fue examinar las señales de $\Delta F/F$ que permanecen al final de una exposición de 25 s a cafeína, en ausencia y presencia de 140 mM de Na^+ externo (denominadas F_0 y F_{Na} , véanse las figuras 29D y 29E). En ausencia de Na^+ , la tasa de decaimiento de la señal de Ca^{2+} tiende a ser más lenta en células tratadas con PFD (Figs. 29D y 29E, 0 Na^+).

Para cuantificar esta observación, en cada célula se normalizó F_0 por su respectiva respuesta máxima a cafeína (F_{Peak}). Los valores que obtuvimos fueron: 0.59 ± 0.04 y 0.78 ± 0.04 ($p < 0.001$), para células control ($n = 30$) y células tratadas con PFD ($n = 31$). Este análisis sugiere que PFD inhibe a una salida de Ca^{2+} intracelular que es lenta e independiente de Na^+ .

Por su parte, la contribución del Na^+ a la disminución de $[Ca^{2+}]_i$, se infirió a partir del cociente F_{Na}/F_0 (1.0 significa que no hay contribución). Los resultados indican que en células tratadas con PFD la actividad del NCX es prácticamente nula (Figs 29G y 29I, barras grises), mientras que en miocitos control el intercambiador contribuye en un $\sim 45\%$ (Figs. 29G y 29I, barras negras).

De hecho, la función del NCX también se comparó de manera más directa, entre células control y tratadas (utilizando la relación F_{Na}/F_0 , de las figuras 29G y 29I). Los valores que obtuvimos, para célula control ($n = 21$) y tratadas con PFD ($n = 29$) fueron, respectivamente: 0.60 ± 0.06 y 0.88 ± 0.06 ($p < 0.012$). Por lo tanto, se puede concluir que PFD inhibe significativamente la actividad del NCX, en un $\sim 30\%$.

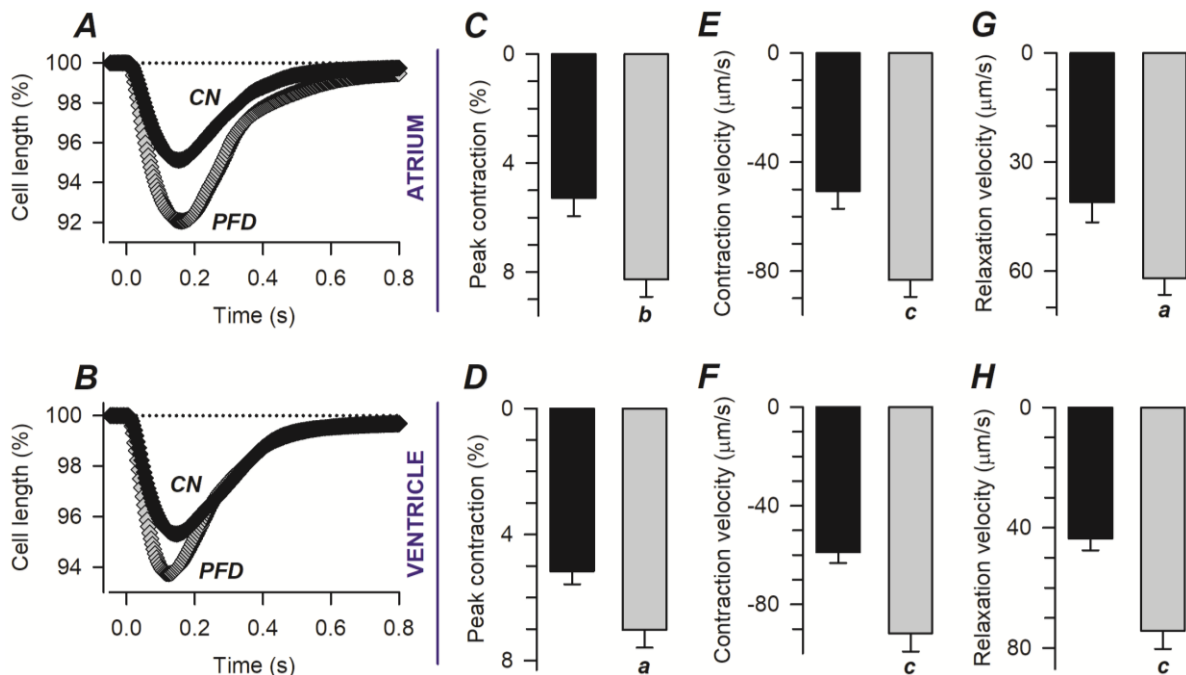


Figura 30. La PFD mejora la contractilidad de los miocitos cardíacos. A, B) Contracciones evocadas eléctricamente, en miocitos auriculares (A) y ventriculares (B), que fueron mantenidos en cultivo bajo condiciones control (CN) o en presencia de pirfenidona (PFD). Se grafica la media estimada a partir de un total de 56 miocitos auriculares (30 CN, 26 PFD) y 110 ventriculares (59 CN, 51 PFD). También se muestra la media \pm el error estándar de los valores máximos de acortamiento (C, D) y velocidades de contracción (E, F) y relajación (G, H). Los símbolos negros y grises representan, respectivamente, a células control y tratadas con PFD. ^a $p < 0.01$, ^b $p < 0.005$, ^c $p < 0.001$. [Basada en datos de Osornio-Garduño, 2013 y Monsalvo-Villegas, 2015]

Enseguida nos preguntamos si los efectos observados en el AEC (en condiciones no fisiológicas; es decir, en *whole-cell patch-clamp*, Fig. 28), tendrían consecuencias funcionales. Lo que hicimos fue investigar la contractilidad tanto del sarcómero como de los cardiomiocitos.

Los datos obtenidos indican que PFD aumenta tanto en miocitos auriculares como ventriculares, no sólo el porcentaje de contracción celular y del sarcómero (en ~50 %, Figs. 30 y 31) sino también su respectiva cinética de contracción y relajación (en un 30-70 %; Figs. 30 y 31). Estas acciones de PFD deberían traducirse en una mejora en el flujo de sangre del corazón.

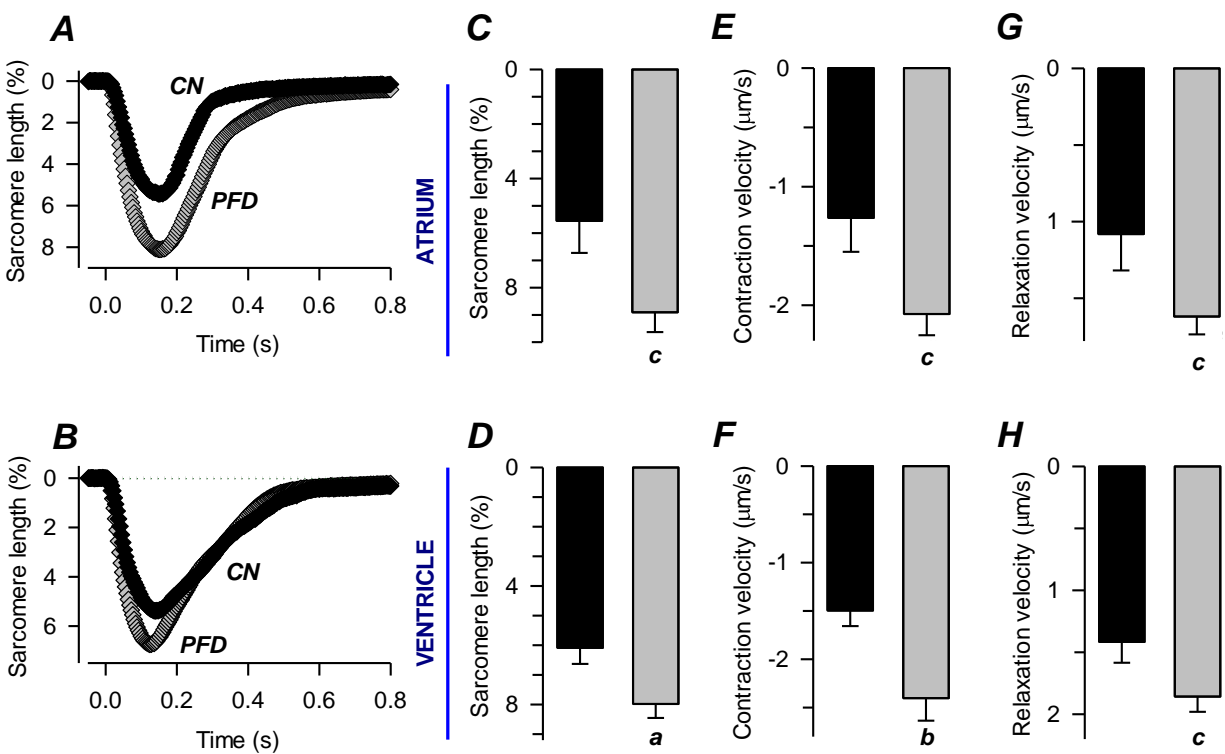


Figura 31. La PFD estimula las propiedades contráctiles del sarcómero. Un total de 30 miocitos auriculares (11 CN — símbolos negros; 19 PFD — símbolos grises) y 129 miocitos ventriculares (61 CN — símbolos negros; 68 PFD — símbolos grises) fueron estimulados eléctricamente para evaluar la longitud del sarcómero en función del tiempo (los paneles A y B muestran los valores promedio). Para cada célula, también se estimaron los parámetros de máximo % de acortamiento (C, D) velocidad de contracción (E, F) y relajación (G, H). Las barras ilustran los respectivos promedios y errores estándar ^a $p < 0.01$, ^b $p < 0.005$, ^c $p < 0.05$. [Basada en datos de Monsalvo-Villegas, 2015]

Dicho efecto, por cierto, ya ha sido documentado en ventrículos. Más concretamente, Nguyen y colaboradores tras inducir un infarto en ratones, observaron que el ventrículo izquierdo de

animales tratados con PFD expulsa mayor porcentaje de sangre con respecto a los animales que no recibieron dicho tratamiento (véase la Fig.18E de Antecedentes; Nguyen et al., (2010).

En la figura 30, la contractilidad se registró simultáneamente con transitorios Ca^{2+} . Eso permitió analizar la señal de Ca^{2+} , descubriéndose que, en miocitos auriculares, PFD promueve la presencia de no sólo transitorios de Ca^{2+} de mayor magnitud, sino también de niveles de Ca^{2+} diastólico más bajos (en comparación con los controles; Fig. 32, *aurícula*).

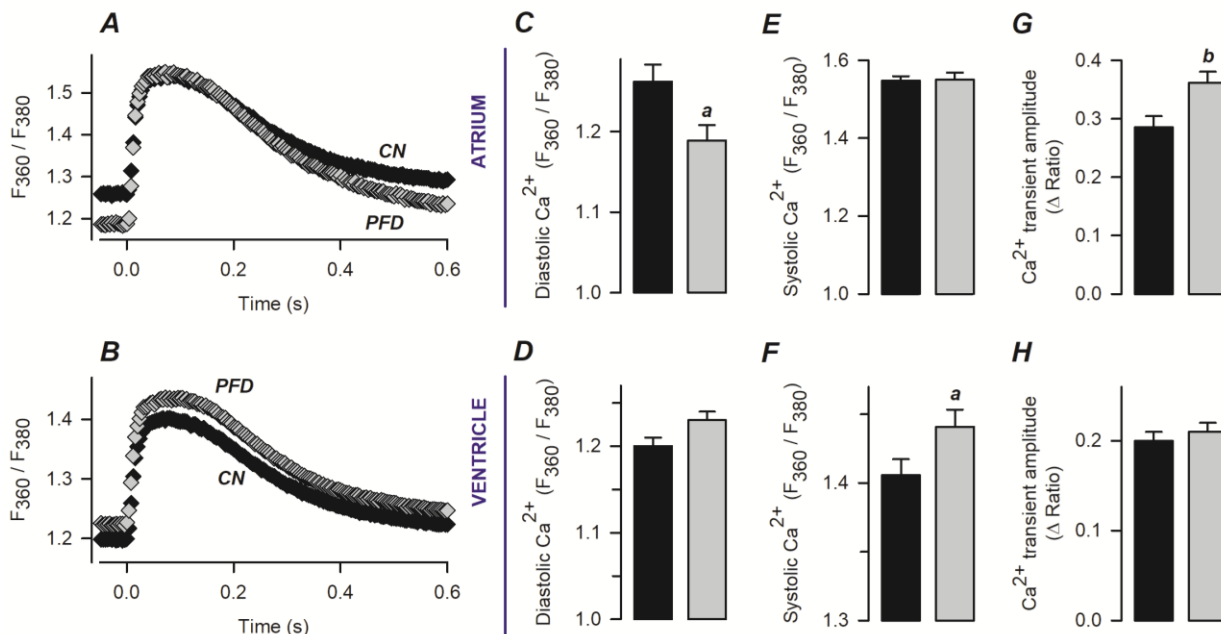


Figura 32. La pirfenidona optimiza la liberación de Ca^{2+} del RS en miocitos intactos (no sujetos a patch clamp). A, B) Se grafica la media de transitorios Ca^{2+} que fueron obtenidos en células que fueron estimuladas eléctricamente: A — miocitos auriculares (42 CN, 37 PFD), B — miocitos ventriculares (81 CN, 80 PFD). También se muestran valores (media \pm ES) del Ca^{2+} diastólico (C, D) y sistólico (E, F), junto con la amplitud máxima del transitorio de Ca^{2+} (G, H). Los datos ilustrados en color negro y gris indican, respectivamente, la condición control y células tratadas con PFD. ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$. [Basada en datos de Osornio-Garduño, 2013 y Monsalvo-Villegas, 2015]

Con respecto a los miocitos ventriculares, la PFD no alteró la amplitud del transitorio de Ca^{2+} , sin embargo, aumentó el nivel del Ca^{2+} sistólico (Fig. 32, *ventrículo*). Además, PFD aumentó tanto la velocidad máxima de salida de Ca^{2+} (en aurícula, $21.1 \pm 1.6 \Delta$ Ratio/s vs. $27.5 \pm 1.5 \Delta$ ratio/s; $p < 0.05$) como el retardo entre la aplicación del pulso eléctrico y el inicio de la fase de decaimiento del transitorio de Ca^{2+} (en ventrículo, 84 ± 4 ms vs. 95 ± 4 ms; $p < 0.05$).

Como consecuencia de estos cambios, PFD genera un aumento en la integral de la fase inicial del transitorio de Ca^{2+} (Fig. 33). Se puede concluir entonces que, en cardiomiocitos intactos, PFD induce un estímulo en CICR y por lo tanto también mejora la contractilidad (Figs. 30 y 31).

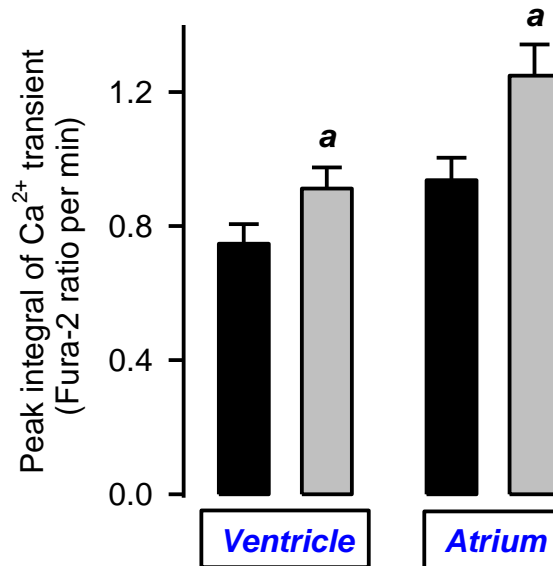


Figura 33. Integral de la fase inicial del transitorio de Ca^{2+} . La integral se estimó como el área bajo la curva, desde la aplicación del estímulo hasta la amplitud máxima del transitorio. Los datos fueron obtenidos a partir del mismo grupo de células que en la figura 32. ^a $p < 0.05$, en comparación con su respectivo control (barras negras).

También se construyeron diagramas de fase, para analizar la sensibilidad de los miofilamentos a Ca^{2+} (Fig 34). Los resultados correspondientes indican que, en miocitos ventriculares, PFD no sólo aumenta el porcentaje de acortamiento (Figs. 30 y 31) sino que también desplaza los diagramas hacia a la derecha; es decir, hacia concentraciones mayores de Ca^{2+} (Figs. 34A y 34B).

En contraste, los miocitos auriculares no presentaron dicho desplazamiento, aunque sí mostraron un aumento en la velocidad de relajación que se presenta al final del ciclo (Fig. 34C). Dicha aceleración, por cierto, también se presentó en miocitos ventriculares (Fig. 34C) y sugiere que PFD promueve una desensibilización de los miofilamentos a Ca^{2+} (Spurgeon et al., 1992), que aparentemente es compensada por niveles más elevados de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y de esa manera predomina el estímulo en la contracción.

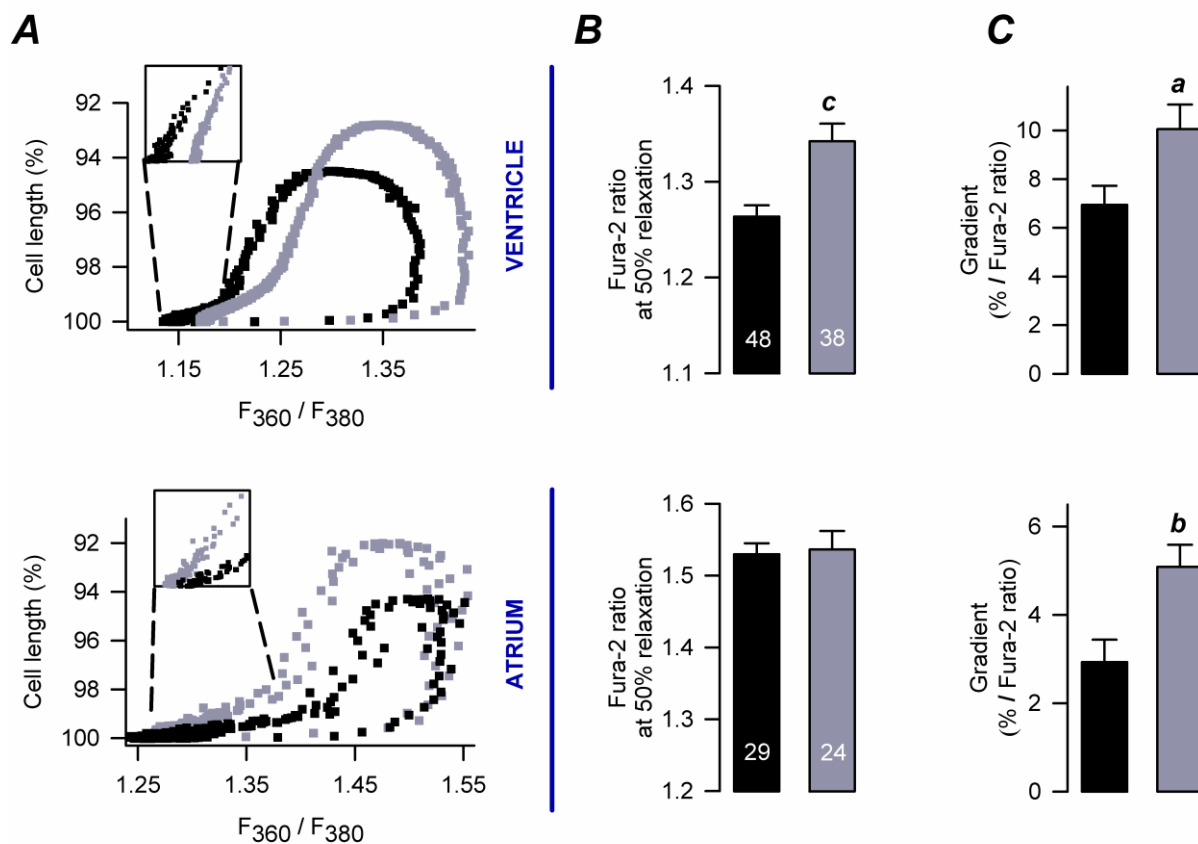


Figura 34. Efectos en la sensibilidad de los miofilamentos a Ca^{2+} . A) Ejemplos de diagramas de fase de longitud celular (eje vertical) versus relación de fluorescencia de Fura-2 (eje horizontal) que se utilizaron para analizar la sensibilidad de los miofilamentos a Ca^{2+} . Los insertos ilustran regiones que se utilizaron para estimar la pendiente de relajación, y representan la zona que corresponde a un 90-95 % de relajación. B, C) Resumen de los valores estimados para el nivel de Ca^{2+} en el que se presenta un 50 % de la relajación (B) y las pendientes obtenidas tras ajustar el segmento final de relajación a una línea recta (A, insertos). En B, también se muestra el número total de células investigadas. ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.005$, ^c $p < 0.001$. [Basada en experimentos de Osornio-Garduño, 2013 y Monsalvo-Villegas, 2015]

Tal como se describió en los antecedentes, la proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA) fosforila elementos clave del AEC. Por lo tanto, decidimos investigar si esta proteína pudiese estar implicada en el estímulo de la contractilidad que provoca PFD. Con esa idea en mente, se expusieron miocitos a un inhibidor de PKA (PKI, el cual permea a través de la membrana plasmática).

La exposición fue de 30 min, justo antes de iniciar los registros, y se midieron tres parámetros: porcentaje máximo de acortamiento, y velocidades máximas de contracción y relajación. En las figuras 35A y 35B se presentan trazos representativos, mientras que los valores de los parámetros se muestran en las figuras 35C-35H.

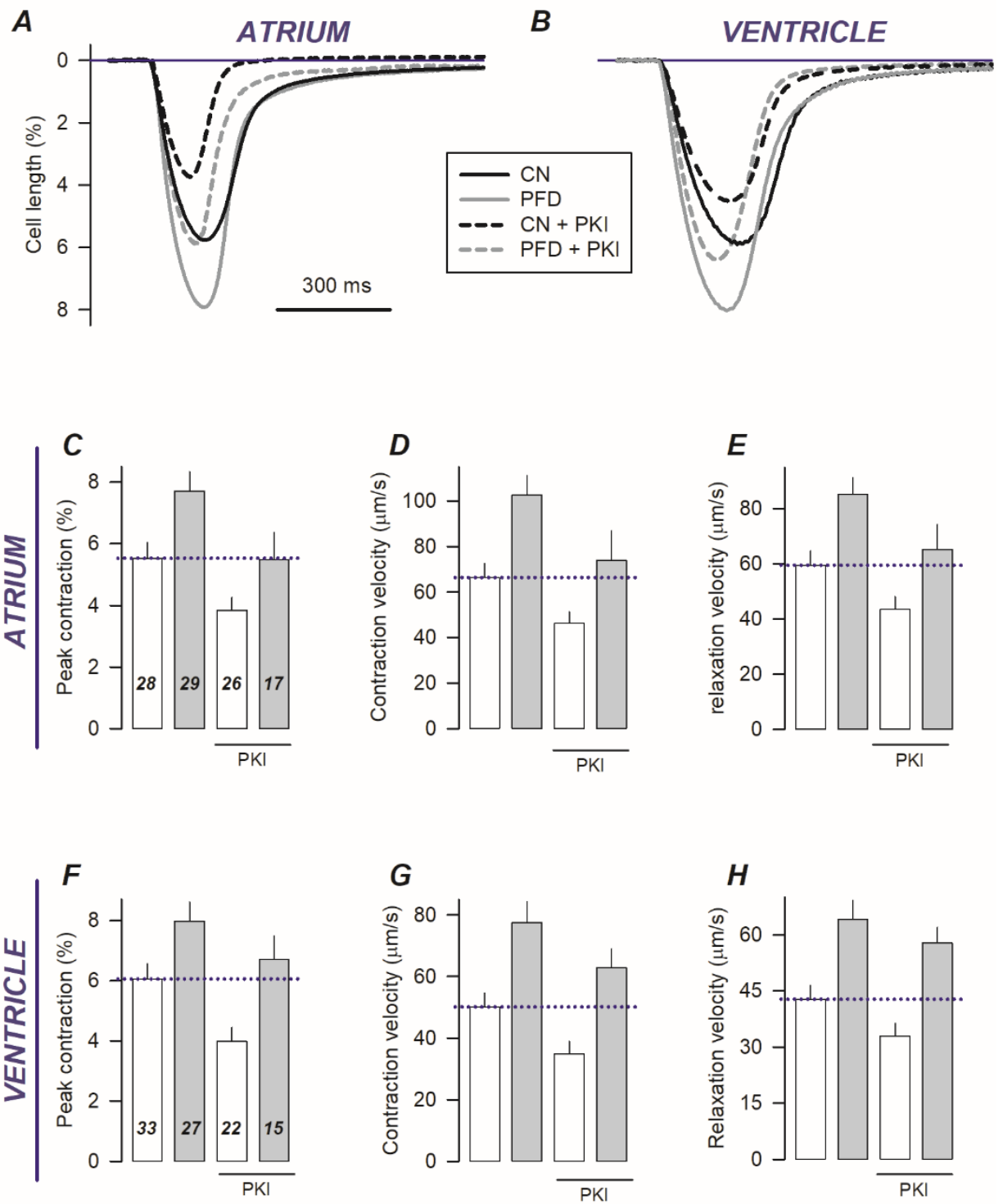


Figura 35. PKA participa parcialmente en los efectos contráctiles de PFD. A, B) Trazos representativos de contractilidad que fueron obtenidos en miocitos que fueron cultivados 1-2 días en condiciones control (CN) o presencia de pirfenidona (PFD). Adicionalmente, algunos de ellos se incubaron en presencia de un inhibidor de PKA (PKI), 30 minutos antes de obtener los registros. C-H) Resumen de las mediciones obtenidas a partir de trazos como los que se ilustran en A y B. También se muestra el número total de células investigadas (en C y F). Barras blancas — CN, barras grises — PFD.

En términos generales, se encontró que el inhibidor de PKA atenúa los efectos de PFD (llevando el promedio de las mediciones a un nivel comparable a lo observado en células control, no expuestas a PKI). Lo cual sugiere que PKA podría, efectivamente, actuar como intermediario.

Sin embargo, es importante mencionar que el nivel de atenuación no fue suficiente como para llevar los parámetros a los niveles observados en la condición control más PKI. En consecuencia, la acción de PFD se puede dividir en dos partes: una dependiente y otra independiente de PKA. Ésta última se observa claramente, al analizar, únicamente, datos que involucran PKI (Fig. 35).

A continuación, se investigó la posibilidad de que PFD regule la generación de radicales libres. A los 2 días de cultivo, las células tratadas con PFD presentaron niveles más bajos de fluorescencia de un sensor de ROS, con respecto a las células control (CM-H₂DCFDA, Figs. 36A y 36B).

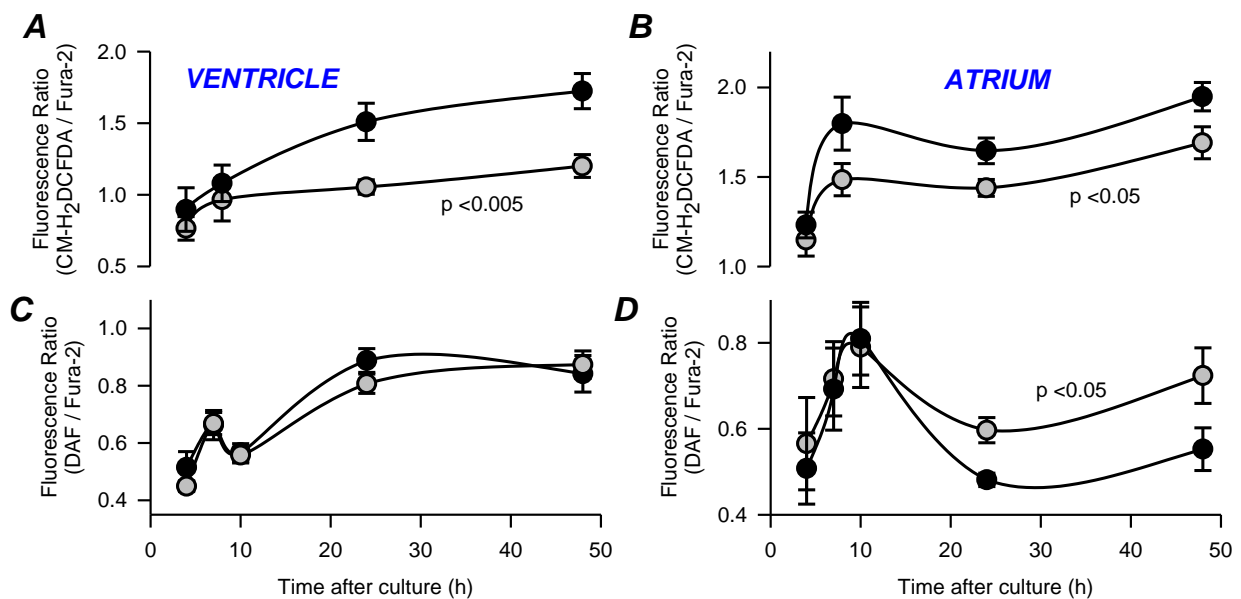


Figura 36. Curso temporal de los niveles de producción de radicales libres. Los cardiomiocitos se cargaron con una mezcla 1:1 de Fura-2 y un sensor de fluorescencia para ROS (A, B) o NO (C, D). En cada celda, la señal fluorescente del sensor se dividió por la de Fura-2 (la cual se usó como un control de carga). Se muestran niveles de fluorescencia que representan la producción de ROS (A, B) y NO (C, D) en función del tiempo de cultivo, bajo condiciones control (símbolos negros) o en presencia de PFD (símbolos grises). Los valores de “p” representan diferencias significativas entre control y PFD (ANOVA). Los datos se obtuvieron de un mínimo de ocho (D, 8 h; CN y PFD) y un máximo de 55 (A, 24 h; PFD) cardiomiocitos.

Con relación a la intensidad de fluorescencia de un sensor de NO (DAF-FM DA), descubrimos que PFD provoca un aumento cercano al 30 % exclusivamente en miocitos auriculares (Figs. 36C y 36D). Estos cambios requieren un periodo mínimo de incubación de 8 h, para hacerse evidentes y eso sugiere que probablemente dependen de cambios a nivel de síntesis proteica.

En miocitos ventriculares también se estudió la generación de ROS ante una exposición aguda a agentes oxidantes.

Más concretamente, evaluamos la producción de ROS en células que se expusieron brevemente (30 min) a acetaldehído (ACA) o peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Tal como era de esperarse (a partir de los resultados mostrados en la figura 36), la producción de ROS fue menor en células tratadas con PFD, con respecto a células CN (Fig. 37, PFD vs. CN).

Asimismo, la ofensiva oxidante causó un aumento significativo en la producción de ROS, tanto en células CN (Fig. 37, barras blancas) como tratadas con PFD (Fig. 37, barras grises). No obstante, la producción de ROS fue idéntica, estadísticamente hablando, en las siguientes tres condiciones experimentales: CN, PFD+ACA, y PFD+ H_2O_2 (Fig. 37). En consecuencia, se puede concluir que la pirfenidona atenúa el estrés oxidativo, no sólo en condiciones basales, sino también en presencia de agentes prooxidantes (Figs. 36 y 37).

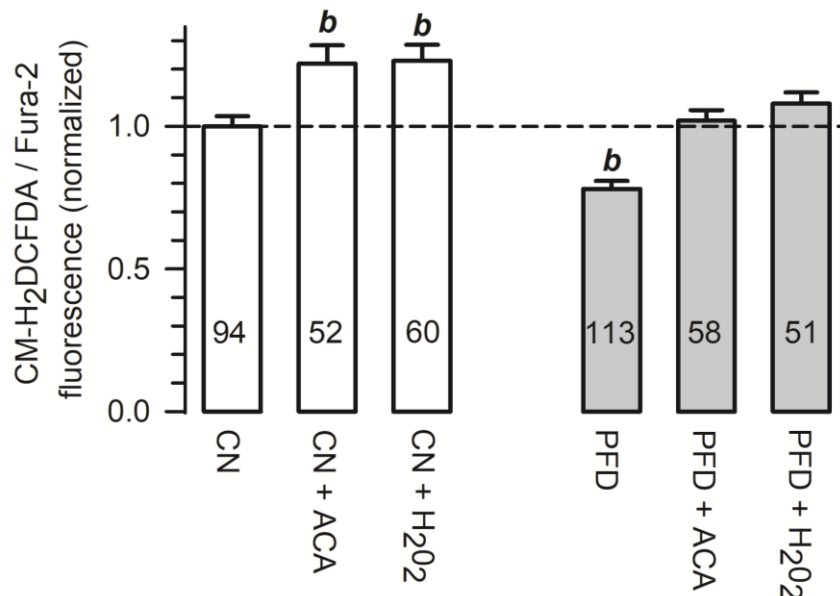


Figura 37. Células tratadas con PFD presentan baja producción de ROS ante una exposición aguda a agentes oxidantes. Niveles de producción de ROS que fueron estimados tal como se muestra en la figura 36 (CN, PFD), excepto que algunas determinaciones se realizaron en presencia de acetaldehído (ACA) o H_2O_2 (200 mM, 30 min). Adicionalmente, y a diferencia de la figura 36, todas las mediciones fueron normalizadas con respecto al promedio observado en células control (CN). Las barras blancas y grises indican miocitos ventriculares control (CN) y tratados con PFD, respectivamente. ^b $p < 0.005$, en comparación con CN.

Las acciones de PFD a nivel de la actividad del NCX (Fig. 29) y la generación NO (Figs. 36C y 36D) se podría explicar por un posible cambio en los niveles de expresión de proteínas involucradas, ya sea en el transporte de sodio o la síntesis de NO. Para investigar dicha posibilidad, se llevó a cabo un análisis de western-blot. Los resultados obtenidos indican que PFD no altera el nivel de expresión del NCX (Fig. 38), lo cual sugiere que, en células tratadas con PFD, la incapacidad del Na^+ para expulsar Ca^{2+} (Fig. 29) se debe a una menor actividad de un número fijo de intercambiadores.

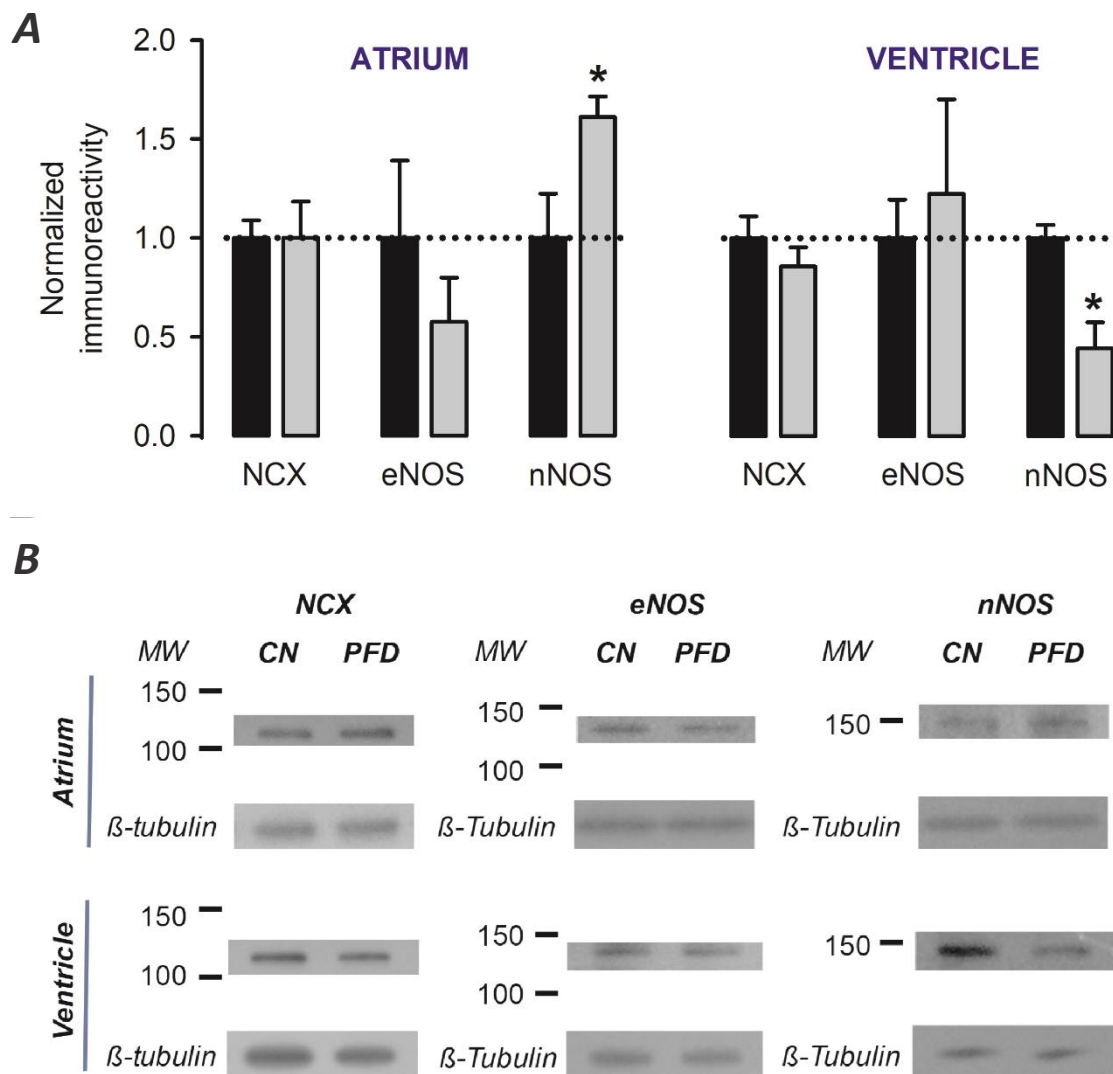


Figura 38. Doble regulación de la expresión de nNOS por PFD. (A) Niveles normalizados de la inmunoreactividad que se logró detectar en miocitos expuestos a anticuerpos primarios contra NCX, eNOS y nNOS (como control de carga se usó β -tubulina). Las barras representan el resumen de datos que fueron obtenidos a partir de un total de tres a cuatro experimentos independientes. Barras negras — CN, barras grises — PFD. * $p < 0.05$, en comparación con su respectivo control. (B) Ejemplos de western blots que se analizaron para generar los datos que se muestran en (A).

De hecho, PFD tampoco alteró la expresión de la isoforma endotelial de la óxido nítrico sintasa (eNOS; $p > 0.3$, Fig. 38). En contraste, sí logramos detectar una doble regulación de la isoforma neurona (nNOS). Concretamente, el nivel de expresión de esta enzima se incrementó en un $\sim 60\%$ en miocitos auriculares y disminuyó en un $\sim 55\%$ en miocitos ventriculares (Fig. 38).

Estos datos sugieren que, en aurícula, un mayor nivel de expresión de la nNOS (Fig. 38) es suficiente para lograr incrementar la tasa de producción de NO (Fig. 36D). Por el contrario, en ventrículo, una menor expresión de la enzima (Fig. 38) es insuficiente para alterar la producción de NO (Fig. 36C).

Se ha demostrado que, en estado estacionario, los movimientos de Ca^{2+} están equilibrados y, por lo tanto, el cardiomiocito no presenta cambios netos en sus niveles de Ca^{2+} . En parte, eso se debe que el RS cuenta con mecanismos que se oponen a una posible sobrecarga o vaciamiento. Adicionalmente, el Ca^{2+} que entra al citosol puede ser tanto expulsado al medio extracelular como regresado al RS (a través de NCX y SERCA respectivamente; como revisión, véase Eisner *et al.*, 2017). En este sentido, nuestros resultados sugieren que, en células tratadas con PFD, la mayor entrada de Ca^{2+} (a través de los canales L) también se acompaña de al menos dos de las siguientes acciones compensatorias:

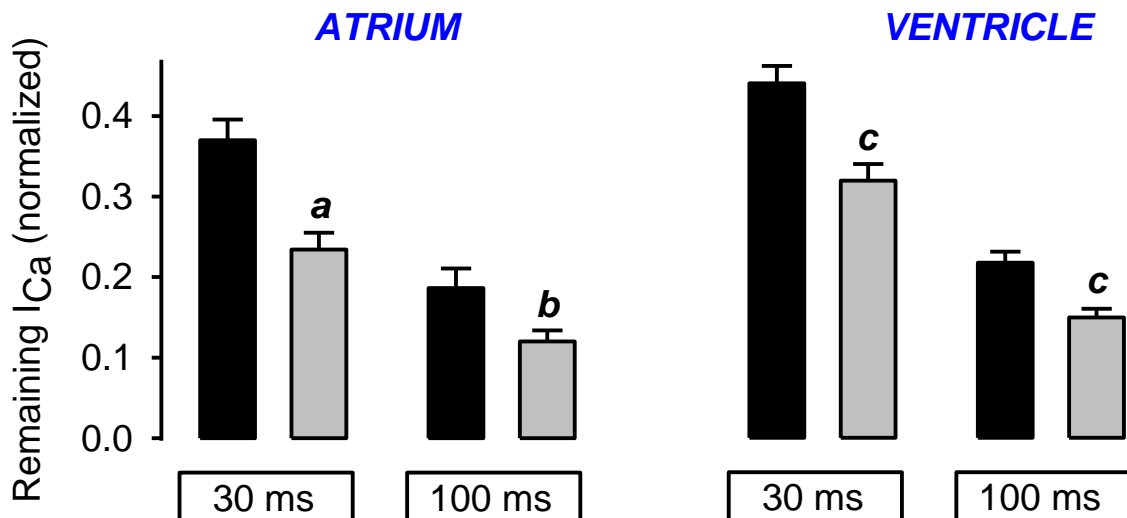


Figura 39. PFD promueve un aceleramiento en la cinética de inactivación de I_{Ca} . Fracción de I_{Ca} que permanece no inactivada después de 30 ms y 100 ms de despolarización. Los resultados se obtuvieron a partir de las mismas células que se presentaron en las figuras 28D (aurícula, a +10 mV) y 28E (ventrículo, a +20 mV). a, b y c representan diferencias significativas ($p < 0.005$, $p < 0.05$ y $p < 0.001$), en comparación con el control respectivo (barras negras).

1.- PFD acelera la inactivación de Ca^{2+} $Ca_v1.2$. Tal como se puede observar en la figura 39, las células tratadas con PFD presentan una I_{Ca} que se inactiva con una cinética ~30 % más rápida que en células control. Por lo tanto, aun cuando la entrada de Ca^{2+} a través de $Ca_v1.2$ es mayor durante los primeros 10 ms, la subsecuente cinética de inactivación acelerada necesariamente implica una drástica reducción del influjo de Ca^{2+} (en al menos 30 a 100 ms subsecuentes a la despolarización, Fig. 39).

2.- PFD aumenta los niveles de recaptura de Ca^{2+} al RS, de manera proporcional a su efecto en la magnitud del transitorio de Ca^{2+} . A partir de los datos de mostrados en las figuras 28 y 29 se puede concluir que los transitorios Ca^{2+} , grandes y pequeños, retornan a niveles basales de Ca^{2+} con una cinética similar (misma constante de tiempo o τ). Eso significa que PFD no modifica la actividad de SERCA (Figs. 29A-29C). Sin embargo, ese hallazgo también implica que el nivel de recaptura de Ca^{2+} al RS es necesariamente más alta en los transitorios de mayor amplitud.

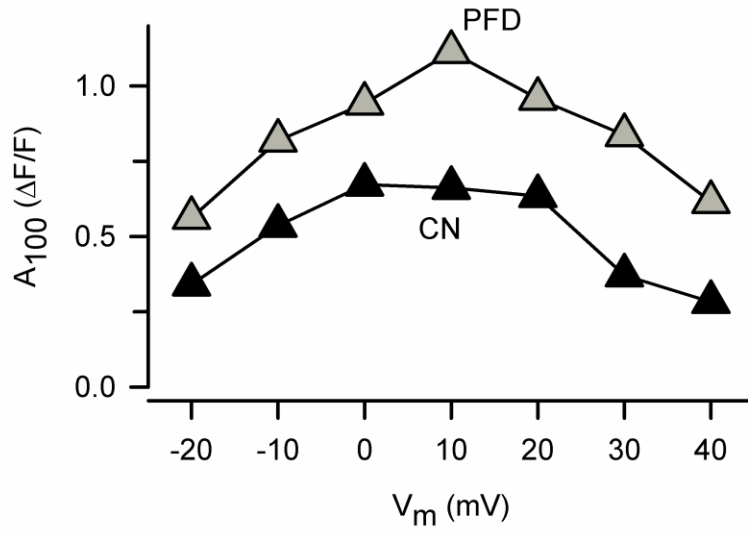
En otras palabras, nuestra conclusión de que PFD no altera los valores de τ (Figs. 29A-29C) no significa que SERCA sea incapaz de detectar el aumento cercano al 100 % en la amplitud del transitorio de Ca^{2+} . Por el contrario, se puede demostrar que SERCA detecta este cambio y, en consecuencia, también acelera la recaptura de Ca^{2+} al RS. La demostración consiste en estimar el decaimiento de los transitorios de Ca^{2+} en valores absolutos de $\Delta F/F$, durante un período fijo de tiempo. Por ejemplo, a los 100 ms, el declive en $\Delta F/F$ (A_{100}) es mayor en células tratadas con PFD con respecto al control (Fig. 40A). En consecuencia, si se grafican los valores de A_{100} en función de la amplitud máxima del transitorio, queda claro que PFD aumenta la velocidad de recaptura (como una consecuencia natural de haber optimizado la magnitud de los transitorios (Fig. 40B).

=====

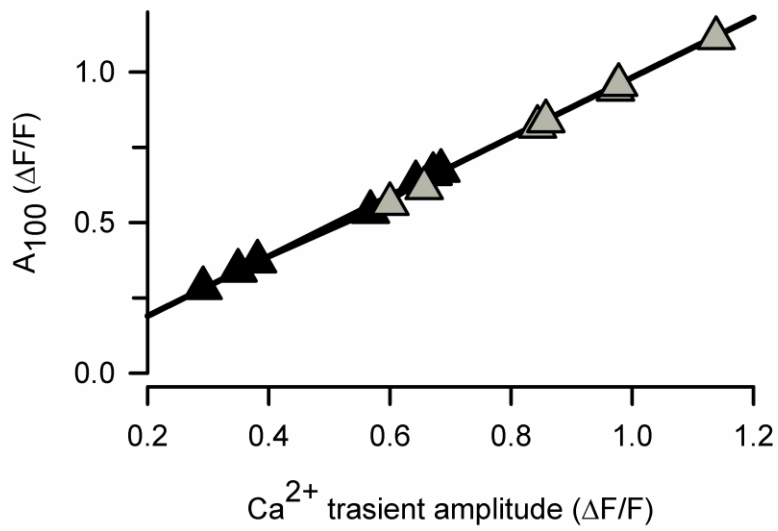
Figura 40. La cantidad de Ca^{2+} que regresa al RS es mayor en células tratadas con PFD, en comparación con los controles. A) La gráfica se construyó utilizando valores promedio de τ (Figs. 29B y 29C) y transitorios de Ca^{2+} (figura 28), conforme a: $A_{100} = A [1 - (\exp - (t_{100}/ \tau))]$; en donde, A es valor al pico del transitorio de Ca^{2+} , t_{100} representa 100 ms, y A_{100} significa el declive estimado en A en 100 ms. B) Mismos datos que en A (A_{100}) pero presentados en función de la amplitud máxima del transitorio de Ca^{2+} (en vez de V_m). Una ecuación lineal se usó para ajustar datos de exclusivamente células control (símbolos negros). Subsecuentemente, con los parámetros obtenidos se proyectó una función teórica (línea sólida; el coeficiente de correlación, o r, fue igual a 0,999). Nótese que dicha proyección describe no sólo a los datos de células control, sino también a aquellos obtenidos en células tratadas con PFD (símbolos grises), indicando que PFD no modifica la actividad SERCA, sino que ésta se está alimenta de una mayor cantidad de sustrato (Ca^{2+}). [Basada en datos de Osornio-Garduño, 2013 y Monsalvo-Villegas, 2015] →

A

Exponential equation solved for 100 ms: $A_{100} = A [1 - e^{- (100 / \tau) }]$

**B**

Linear regression from CN $\blacktriangle \rightarrow \blacktriangle$



DISCUSIÓN

Los miocitos cardíacos son de suma relevancia para el bombeo de sangre, y su función se ve comprometida en una amplia gama de alteraciones cardíacas. Por otro lado, varios estudios han demostrado que modelos animales de enfermedad cardiovascular desarrollan síntomas más leves si se tratan con PFD (Adamo *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2017; Miric *et al.*, 2001; Mirkovic *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2010; Van Erp *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2013; Yamagami *et al.*, 2015; Yamazaki *et al.*, 2012). Sin embargo, los efectos de PFD en la función del miocito todavía no habían sido publicados, al inicio de esta tesis. De hecho, fue gracias a una combinación de los resultados de ésta y dos tesis anteriores (Osornio-Garduño, 2013; Monsalvo-Villegas, 2015), que finalmente se logró conformar un manuscrito (Monsalvo-Villegas, Osornio-Garduño and Avila, 2018). Éste se envió al *Frontiers in Physiology*, a finales del 2018. Concretamente, la fecha de envío fue el 24 de septiembre y la aceptación ocurrió dos meses después (29 de noviembre). Los objetivos de la tesis fueron redondear lo observado en las tesis de maestría ya mencionadas y ahondar en el conocimiento de la influencia que PFD ejerce a nivel de: I_{Ca} , transitorios de Ca^{2+} , ganancia del AEC, contenido de Ca^{2+} del RS, contractilidad, ROS, NO y niveles de expresión de algunas proteínas relacionadas (NCX, eNOS y nNOS). De esta manera se logró demostrar que PFD regula no sólo a $Cav1.2$ (Ramos-Mondragón *et al.*, 2012) sino también al AEC y a la CICR. Adicionalmente, se encontró que PFD: mejora el nivel y cinética de contractilidad, atenúa el estrés oxidativo, y finalmente inhibe la expulsión del Ca^{2+} citosólico que ocurre a través del NCX y otros mecanismos secundarios.

Mecanismos moleculares

La ventaja de estudiar al AEC en células “intactas” (i.e., cuya manipulación consistió únicamente en cargarlas con Fura-2 AM) es que las observaciones respectivas podrían tener mayor relevancia fisiológica, en comparación con aquellas obtenidas en experimentos de *whole-cell patch-clamp*. Sin embargo, esa ventaja ocurre a costa de una gran opacidad de los mecanismos subyacentes. Este problema se origina en que las mediciones dependen de muchas variables y procesos, cuyas magnitudes son desconocidas y además están interrelacionadas. Tal es el caso del potencial de membrana en reposo, la fracción de canales inactivados, la afinidad de los miofilamentos por Ca^{2+}

y la composición iónica del citosol (Bers, 2001). Por el contrario, interpretar los resultados de *whole-cell patch clamp* es más sencillo, porque se rompen varios circuitos de retroalimentación y además se miden muchas variables directamente o en su defecto permanecen constantes (por ejemplo, I_{Ca} , C_m , V_m , niveles de Ca^{2+} intracelular, soluciones de registro). Por lo anterior, en este trabajo se optó por combinar ambos enfoques y se logró concluir que PFD optimiza la contractilidad del sarcómero y por ende del cardiomiocito, mediante un incremento en la magnitud de I_{Ca} que conlleva a un mayor nivel de liberación de Ca^{2+} del RS. Dada la relevancia total de esta conclusión, enseguida se exponen los posibles mecanismos subyacentes.

En una publicación previa se demostró que PDF aumenta el número de canales $Ca_v1.2$ funcionales, pero no el nivel de expresión de estos (Ramos-Mondragón et al., 2012). Estas observaciones, combinadas con lo reportado en esta tesis, en el sentido de que la magnitud de los transitorios de Ca^{2+} también se incrementa, pero sin que se presenten cambios en el contenido de Ca^{2+} del RS (Figs. 28 y 29), sugieren que PFD logra que se reclute a un mayor número de unidades de liberación de Ca^{2+} . Los miocitos auriculares y ventriculares presentan diferencias importantes en cuanto a su estructura y funcionamiento (Bootman et al., 2011). Por lo tanto, consideramos muy interesante investigar, en un futuro cercano, las bases moleculares y ultraestructurales que podrían explicar el reclutamiento de tales unidades de liberación de Ca^{2+} . Inicialmente, se podría proponer un modelo simplificado, en el que tales unidades sí existen en células control, pero se encuentran inaccesibles o "silenciosas". Una suposición inherente a dicho modelo es que, en células control el Ca^{2+} citosólico no logra activar al 100 % las unidades de liberación de Ca^{2+} (incluso a voltajes donde I_{Ca} alcanza su valor máximo) y PFD lleva este sistema a un nivel más cercano a la saturación.

Existen pruebas a favor de que algo similar es posible, en miocitos auriculares de rata. Se sabe así, que los transitorios de Ca^{2+} provocados directamente por I_{Ca} son incapaces de reclutar a RyRs que se localizan en regiones centrales de la célula, debido a la baja existencia de túbulos T (TT). Aparentemente, las mitocondrias actúan como un buffer de Ca^{2+} y eso complica la libre difusión del ion, obstruyendo así la activación de los RyRs de "reserva" (Mackenzie et al., 2004). Sin embargo, dicha reserva sí se logra reclutar en condiciones excepcionales, tales como durante la estimulación β -adrenérgica, y en teoría, también en respuesta a PFD. Esta interpretación se basa en las siguientes observaciones (i) PFD inhibe la recaptura de Ca^{2+} por los sistemas lentos e

independientes de Na^+ , que muy probablemente podrían incluir al transporte mitocondrial; y (ii) la mayor densidad de I_{Ca} en células tratadas con PFD podría generar un pequeño aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de la periferia celular, y (iii) como consecuencia de lo anterior (un mayor gradiente químico combinado con menor cantidad de pozas, o buffers) el Ca^{2+} periférico estaría logrado difundir a porciones centrales de la célula.

En el caso del ventrículo, se puede proponer un modelo similar, aunque éste depende de una situación más fisiopatológica. En 1997, Gómez y sus colaboradores descubrieron que los miocitos ventriculares con hipertrofia (derivados de ratas hipertensas) presentan un fenómeno al que se le podría llamar “desacople EC”. Brevemente, dicho fenómeno consiste en que la I_{Ca} sólo logra activar a una pequeña fracción del transitorio de Ca^{2+} que se obtiene normalmente, en miocitos sin hipertrofia. Este defecto no se debe a que exista una disminución en el contenido de Ca^{2+} del RS, sino que más bien se adjudica a un posible cambio en la microarquitectura de la diada (Gómez et al., 1997). En apoyo a esa interpretación, se ha visto que, en corazones hipertrofiados, tanto el sistema de TT como otras estructuras, se encuentran efectivamente alteradas (Page and McCallister, 1973). Además, existen evidencias biofísicas de que, en los miocitos con hipertrofia, el canal L se encuentra más alejado de los RyRs. Más concretamente, estas células presentan una I_{Ca} que se caracteriza por una cinética de inactivación muy lenta, sugiriendo que una señal retrógrada que inactiva a los canales L está debilitada. En otras palabras, Cav1.2 está libre de inactivación por Ca^{2+} , porque la I_{Ca} que transporta no logra activar, eficientemente, a los RyRs (que en condiciones de hipertrofia se ubican en lugares más alejados. Un aspecto interesante, es que esta alteración cinética, así como el desacople EC se pueden revertir mediante una estimulación β -adrenérgica (Gómez et al., 1997).

En nuestros experimentos es probable que los miocitos ventriculares también hayan desarrollado un cierto grado de desacople EC, pues se mantuvieron en cultivo durante 1 a 2 días. En términos generales, los miocitos ventriculares de rata mantienen sus propiedades estructurales intactas por lo menos durante tres días de cultivo. Sin embargo, existen pequeños cambios ultraestructurales que se manifiestan a tiempos más cortos. Tal es el caso de una internalización de discos intercalados, que se presenta desde las primeras 24 h (Mitcheson, Hancox and Levi, 1998; Hammer *et al.*, 2010). Pudiera ser entonces que exista un paralelismo entre el desacople EC que desarrollan los miocitos con hipertrofia, junto con su susceptibilidad de restauración por

agentes β -adrenérgicos y los miocitos ventriculares en cultivo, cuyo AEC es optimizado por pirfenidona. Otra evidencia indirecta a favor de tal semejanza es que en la condición “PFD” el aumento en la magnitud del transitorio de Ca^{2+} se acompaña de una mayor velocidad de inactivación de I_{Ca} (Fig. 39), lo cual refleja una mejor interacción funcional entre LTCC y los RyRs.

En un trabajo previo se especuló que la PFD podría disminuir la producción de NO en cardiomiocitos (Ramos-Mondragón et al., 2012), basándose al menos parcialmente en evidencia obtenida en hepatocitos (Nakanishi et al., 2004; Tsuchiya et al., 2004). En esta tesis; sin embargo, se demostró que, en miocitos ventriculares la PFD no altera la tasa de producción de NO (a pesar de que provoca una reducción significativa en los niveles de expresión de nNOS). No sólo eso, también se demostró que en miocitos auriculares el compuesto aumenta la producción de NO (lo cual probablemente se debe al aumento observado en la cantidad de nNOS). La señalización NO es tan relevante como compleja (como revisión, véase Simon *et al.*, 2014). Esa complejidad se origina, al menos parcialmente, en que nNOS y eNOS presentan diferencias importantes en cuanto a distribución subcelular. La primera tiene una distribución aledaña al RS y, en consecuencia, se piensa que modula primordialmente a SERCA y al RyR. Por el contrario, se ha planteado que la eNOS tiene capacidad para regular predominantemente a las proteínas que controlan los flujos de Ca^{2+} en el sarcolema, tales como al NCX, la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA), y al $\text{Ca}_v1.2$ (Jian *et al.*, 2014).

Otro nivel de complejidad surge de la interacción existente entre nNOS y ROS. Por ejemplo, en miocitos auriculares, tanto la expresión nNOS como los niveles de NO están inversamente acoplados con cambios sostenidos en la tasa de producción de ROS (p.e.g., Figs. 36B y 36 D). Por el contrario, se ha reportado que la actividad de la nNOS activa a su vez, a la vía de señalización: ROS–NADPH oxidase 2 (Nox2) (Girouard, H. *et al.*, 2009).

Aunado a lo anterior, resulta que la señalización río abajo del NO se divide en al menos dos grandes avenidas. Una de ellas consiste en provocar directamente modificaciones postransduccionales conocidas como S-nitrosilación, mientras que la otra se caracteriza por inducir una modulación de guanilato ciclasa o GC; que a su vez regula a las proteínas cinasa dependientes de cGMP y cAMP (PKG y PKA). En consecuencia, pensamos que un estudio sistemático acerca de la doble regulación de nNOS por PFD (Fig. 38) podría comenzar utilizando

moduladores selectivos no sólo para cada isoforma de NOS sino también para PKG y PKA. Además, dicho estudio se debería de complementar con mediciones no sólo de contractilidad, sino también de niveles de producción —global y local— de ROS, NO y Ca^{2+} . Con respecto a PKA, nuestros resultados preliminares sugieren que esta quinasa está involucrada, al menos parcialmente, en la regulación positiva de la contractilidad (Fig. 35).

La participación de PKA en los efectos de PFD se evidenció inicialmente a raíz de que un inhibidor de PKA (PKI) y un activador de dicha cinasa (cAMP), presentes en la solución interna de registro bloquearon y mimetizaron, respectivamente, el efecto de PFD en la I_{CaL} , por lo que se dedujo que probablemente PFD aumenta el nivel de fosforilación de $\text{Ca}_v1.2$ por PKA (Ramos-Mondragón *et al.*, 2012). No obstante, al igual que con lo observado a nivel de la contractilidad, PKA sólo contribuye a explicar parcialmente el efecto en $\text{Ca}_v1.2$. En teoría, PFD podría estar aumentando la actividad de PKA mediante posibles cambios en la distribución de ciertas proteínas que anclan a PKA (AKAPs, Fig. 10). Por ejemplo, PFD podría promover la asociación de AKAP15 con el CTP de $\text{Ca}_v1.2$, favoreciendo de esa manera la fosforilación del residuo Ser^{1700} del canal (Fuller *et al.*, 2010), que se traduciría en un aumento en la P_o y por ende, en G_{max} . Sin embargo, todavía se requiere mayor investigación, para poder validar o desechar esta hipótesis.

A nivel de miofilamentos, existen otras cinasas además de PKA, que los modulan, tal es el caso de PKG, PKD y PKC (Layland, Solaro and Shah, 2005; Solaro, Henze and Kobayashi, 2013). Las dos primeras fosforilan a cTnI y en consecuencia provocan una menor fuerza contráctil, así como desaceleración de la contracción. Estos efectos las descartan como posibles intermediarios en las acciones estimuladoras de la contractilidad por PFD. La PKC, por su parte, sí ejerce efectos potenciadores similares a los de la PKA, por lo que representa un fuerte candidato para explicar el componente insensible a PKA (Fig. 35).

El diseño experimental de esta tesis implicó caracterizar cambios duraderos y persistentes en la función del cardiomiocito, a diferencia de posibles acciones rápidas y fácilmente reversibles. Fue por ello que las células se expusieron a PFD durante un mínimo de 4 h (a 37°C , en medio de cultivo) y se realizaron experimentos de 15 a 50 minutos después de haber finalizado el tratamiento; es decir, utilizando soluciones extracelulares carentes de PFD. Por lo tanto, se puede decir que los cambios que estamos reportando persisten aún en ausencia de PFD. De hecho, a

nivel de producción de radicales libres, los cambios significativos se observan hasta después de 8 h de tratamiento (Fig. 36). Por lo tanto, es muy probable que en nuestros experimentos PFD inicialmente regule el nivel de expresión de proteínas (por ejemplo, proteínas relacionadas con el estrés oxidativo, por ejemplo, la nNOS), y esto, a su vez, conduzca a efectos en la tasa de producción de radicales libres y en la función celular.

No obstante, todavía no se ha establecido la secuencia precisa de eventos subsecuentes al inicio de los tratamientos con PFD, y es probable que algunos de ellos estén acoplados. Por ejemplo, en los miocitos auriculares, la inhibición de la producción de ROS (Fig. 36B) pudo ser responsable del aumento en la expresión de nNOS (Fig. 38) y por ende también de los niveles más altos de síntesis de NO (Fig. 36D).

Los diferentes cursos temporales representan evidencia indirecta al respecto. Específicamente, la producción de ROS comienza a regularse después de 8 h de tratamiento (Fig. 36B; aurícula), mientras que el estímulo en la generación de NO requiere 24 h para hacerse evidente (Fig. 36D; aurícula). Este modelo está de acuerdo con resultados de Kar y sus colaboradores, quienes demostraron que una exposición prolongada de miocitos auriculares (de la línea celular HL-1) a H₂O₂ provoca un nivel bajo de expresión de la nNOS (Kar, Kellogg and Roman, 2015). Pareciera ser entonces que, en miocitos auriculares las ROS controlan a largo plazo, tanto la expresión de nNOS como la síntesis del NO.

También se ha reportado que las ROS estimulan a la actividad del NCX (véase, por ejemplo, Goldhaber, 1996; Santacruz-Tolozá *et al.*, 2000; Kuster *et al.*, 2010). Se piensa que el estímulo se debe a modificaciones redox del intercambiador, que probablemente interfieren con la inactivación dependiente de Na⁺ (Santacruz-Tolozá *et al.*, 2000). Por lo tanto, es posible que en nuestras condiciones control la actividad del NCX esté siendo sostenida, basalmente, por ROS. De ser así, PFD podría estar eliminando ese apuntalamiento, al disminuir la producción de ROS y eso explicaría la inhibición del intercambiador. Por el contrario, en miocitos auriculares varios antioxidantes clásicos —como DMSO, glutatión y N-acetilcisteína (NAC)— no reproducen el efecto de PFD en I_{Ca}, por lo que las ROS no parecen estar involucradas en la regulación por PFD de Cav1.2 (Ramos-Mondragón *et al.*, 2012). Por lo tanto, es probable que PFD actúe a través de otros blancos moleculares además de ROS.

Relevancia fisiopatológica

Al margen de los mecanismos moleculares precisos involucrados, es probable que los resultados de esta tesis sean relevantes, fisiopatológicamente hablando. *In vivo*, la PFD disminuye la susceptibilidad a desarrollar arritmias (AF y taquicardia ventricular), y se piensa que estos efectos dependen de una inhibición concomitante de fibrosis (Lee et al., 2006; Nguyen et al., 2010). Sin embargo, es posible que los cambios que aquí se están reportando, junto con los reportados por Ramos-Mondragón et al., 2012 también contribuyan. Por ejemplo, la mayor actividad de Cav1.2 y el incremento en la duración del PA, podría incrementar el período refractario lo cual disminuye el riesgo de arritmias a través de prevenir lo que se conoce como *electrical reentry* (Ramos-Mondragón et al., 2012; Avila et al., 2014). Además, la menor actividad del NCX podría estar disminuyendo la probabilidad de posdespolarizaciones tardías (DADs por sus siglas en inglés), las cuales provocan inestabilidad eléctrica y arritmia (Voigt et al., 2012).

La estimulación de la CICR, el AEC y la contractilidad, por su parte, podrían ser de importancia para explicar por qué la PFD mejora: **i)** la presión ventricular disminuida que se presenta en ratones con distrofia muscular (mdx, Van Erp et al., 2006), y **ii)** la fracción de expulsión ventricular izquierda en ratas sometidas a un infarto al miocardio (Nguyen et al., 2010).

Finalmente, consideramos que la inhibición de la producción de ROS por PFD podría ser relevante en términos más generales. Es bien sabido que estos radicales libres están involucrados en varias afecciones cardíacas, incluyendo arritmias, infarto al miocardio, hipertrofia, cardiomiopatía alcohólica e insuficiencia cardíaca (como revisiones, véanse, Zhang et al., 2004; Korantzopoulos et al., 2007; Köhler, Sag and Maier, 2014). Por lo tanto, es muy probable que el prevenir daño oxidante sea un paso fundamental en los efectos cardioprotectores de PFD.

CONCLUSIONES

Los efectos de pirfenidona se pueden clasificar con base en el tipo celular, concretamente...

En ambos, cardiomiocitos auriculares y ventriculares:

1. Aumenta la amplitud de la corriente y de los transitorios de Ca^{2+} , sin modificar el contenido de Ca^{2+} del RS
2. Disminuye la remoción lenta de Ca^{2+} , insensible a Na^+ extracelular
3. Inhibe la actividad del NCX sin modificar sus niveles de expresión
4. No modifica la actividad de la bomba SERCA ni la expresión proteica de eNOS
5. Disminuye el insulto oxidativo, tanto en condiciones basales como en presencia de agentes oxidantes, resultando en menor estrés oxidativo.
6. Estimula a CICR y la contractilidad
7. Sus efectos dependen parcialmente de la actividad de PKA

En miocitos auriculares:

- Incrementa niveles tanto de nNOS como de NO

En miocitos ventriculares:

- Disminuye la expresión de nNOS sin que se modifiquen el nivel de NO

PERSPECTIVAS

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

1. Determinar en cardiomiocitos si un tratamiento de 1–2 días con PFD modifica:

- La expresión de proteínas antioxidantes y pro-oxidantes
- En extractos nucleares, la presencia de factores transcripcionales implicados en la síntesis de proteínas antioxidantes, tales como Nrf-2 y NF-κB

2. Investigar la participación de PKG y PDEs en los efectos de PFD en el AEC, mediante:

- Mediciones de contractilidad
- Registros simultáneos de I_{CaL} y transitorios de Ca^{2+}

3. Determinar si PFD provoca un cambio en la P_o de los canales de Ca^{2+} tipo L

4. Evaluar si PFD provoca cambios en el AEC en células de musculo esquelético, concretamente, en:

- Miotubos de la línea celular C2C12
- Fibras musculares procedentes de animales modelo de distrofia muscular

5. Investigar si los siguientes compuestos sintéticos, similares a PFD, también modifican el AEC y la generación de radicales libres:

- Fluorofenidona (AKF-PD)
- Br-fluorofenidona

6. Evaluar una posible modulación rápida en la producción de ROS por los derivados de la piridona mencionados.

REFERENCIAS

- Adamo, L. *et al.* (2018) 'Modulation of subsets of cardiac B lymphocytes improves cardiac function after acute injury', *JCI insight*, 3(11). doi: 10.1172/jci.insight.120137.
- Aggarwal, N. T. and Makielski, J. C. (2013) 'Redox control of cardiac excitability', *Antioxidants and Redox Signaling*, 18(4), pp. 432–468. doi: 10.1089/ars.2011.4234.
- Alderton, W. K., Cooper, C. E. and Knowles, R. G. (2001) 'Nitric oxide synthases : structure , function and inhibition', *Biochemical society*, 357, pp. 593–615.
- Altier, C. *et al.* (2011) 'The Cav β subunit prevents RFP2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of L-type channels', *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 14(2), pp. 173–182. doi: 10.1038/nn.2712.
- Amin, A. S., Tan, H. L. and Wilde, A. a M. (2010) 'Cardiac ion channels in health and disease', *Heart Rhythm*. Elsevier Inc., 7(1), pp. 117–126. doi: 10.1016/j.hrthm.2009.08.005.
- Armendáriz-Borunda, J. *et al.* (2006) 'A pilot study in patients with established advanced liver fibrosis using pirfenidone', *Gut*, 55(11), p. 1663. doi: 10.1136/gut.2006.104943.
- Armoundas, A. a. *et al.* (2001) 'Electrical and structural remodeling of the failing ventricle', *Pharmacology and Therapeutics*, 92(2–3), pp. 213–230. doi: 10.1016/S0163-7258(01)00171-1.
- 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. doi: 10.1152/ajpheart.00781.2006.
- 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.
- B, Young; J, W. (2000) *Wheater's Functional Histology*. 4th edn. Churchill Livingstone, London.
- De Bakker, J. M. T. and Van Rijen, H. M. V (2006) 'Continuous and discontinuous propagation in heart muscle', *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 17(5), pp. 567–573. doi: 10.1111/j.1540-8167.2006.00367.x.
- Barouch, L. a *et al.* (2002) 'Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms.', *Nature*, 416(6878), pp. 337–339. doi: 10.1038/416337a.
- Bassani, R. A., Bassani, J. W. M. and Bers, D. M. (1994) 'Relaxation in rabbit and rat cardiac cell: species-dependent differences in cellular mechanisms', *Journal of Physiology*, 476(2), pp. 279–293.
- Bauer, M. E. and De la Fuente, M. (2016) 'The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence', *Mechanisms of Ageing and Development*. Elsevier Ireland Ltd, 158, pp. 27–37. doi: 10.1016/j.mad.2016.01.001.
- Bean, B. P. and 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.
- Behrmann, E. *et al.* (2012) 'Structure of the rigor actin-tropomyosin-myosin complex', *Cell*, 150(2), pp. 327–338. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.037.
- Benitah, J.-P., Alvarez, J. L. and Gómez, A. M. (2010) 'L-type Ca(2+) current in ventricular

- cardiomyocytes.', *Journal of molecular and cellular cardiology*. Elsevier Inc., 48(1), pp. 26–36. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.07.026.
- Bers, D. M. (2001) *Excitation-Contraction coupling and cardiac contractile force*. 2nd edn. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer academic.
- Bers, D. M. (2002) 'Cardiac excitation–contraction coupling', *Nature*, 415(10), pp. 198–205.
- Best, J. M. and Kamp, T. J. (2012) 'Different subcellular populations of L-type Ca²⁺ channels exhibit unique regulation and functional roles in cardiomyocytes', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Elsevier Ltd, 52(2), pp. 376–387. doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.08.014.
- Bootman, M. D. *et al.* (2006) 'Calcium signalling during excitation-contraction coupling in mammalian atrial myocytes.', *Journal of cell science*, 119, pp. 3915–3925. doi: 10.1242/jcs.03223.
- Bossen, E. H., Sommer, J. R. and Waugh, R. a. (1981) 'Comparative stereology of mouse atria', *Tissue and cell*, 13(1), pp. 71–77. doi: 10.1016/0040-8166(81)90039-2.
- Brette, F. *et al.* (2004) 'β-adrenergic stimulation restores the Ca transient of ventricular myocytes lacking t-tubules', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 36(2), pp. 265–275. doi: 10.1016/j.yjmcc.2003.11.002.
- 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. doi: 10.1016/j.jss.2004.12.007.
- Brown, D. I. and Griendling, K. K. (2015) 'Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system', *Circulation Research*, 116(3), pp. 531–549. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303584.
- Cannel, M. B., Cheng, H. and Lederer, W. J. (1994) 'Spatial Non-Uniformities in [Ca²⁺]_i during Excitation-Contraction Coupling in cardiac myocytes', *Biophysical Journal*, 67(5), pp. 1942–1956.
- Cannell, M. B., Cheng, H. and Lederer, W. J. (1995) 'The control of calcium release in heart muscle', *Science*, 268(5213), pp. 1045–1049. doi: 10.1126/science.7754384.
- 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.
- Cheng, H., Lederer, W. J. and Cannell, M. B. (1993) 'Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle.', *Science*, 262(5134), pp. 740–744. doi: 10.1126/science.8235594.
- Dolphin, A. C. (2016) 'Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology', *Journal of Physiology*, 594(19), pp. 5369–5390. doi: 10.1113/JP272262.
- Dolphin, A. C. (2018) 'Voltage-gated calcium channel α₂ δ subunits: An assessment of proposed novel roles', *F1000Research*, 7, pp. 1–13. doi: 10.12688/f1000research.16104.1.
- Dosanjh, a *et al.* (2002) 'Pirfenidone: A novel anti-fibrotic agent and progressive chronic allograft rejection.', *Pulmonary pharmacology & therapeutics*, 15(5), pp. 433–437. doi: 10.1006/pupt.2002.0367.

- Ebashi, S. (1963) 'Third component participating in the super precipitation of "natural actomyosin"', *Nature*, p. 1010. doi: 10.1038/2001010a0.
- Von Der Ecken, J. *et al.* (2015) 'Structure of the F-actin-tropomyosin complex', *Nature*, 519(7541), pp. 114–117. doi: 10.1038/nature14033.
- Eigel, B. N., Gursahani, H. and Hadley, R. W. (2004) 'ROS are required for rapid reactivation of Na⁺/Ca²⁺ exchanger in hypoxic reoxygenated guinea pig ventricular myocytes', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 286(3 55-3), pp. 955–963. doi: 10.1152/ajpheart.00721.2003.
- Eisner, D. A. *et al.* (2017) 'Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart', *Circulation Research*, 121(2), pp. 181–195. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310230.
- Endo, M., Tanaka, M. and Ogawa, Y. (1970) 'Calcium Induced release of calcium from the Sarcoplasmic Reticulum of Skinned Skeletal Muscle Fibres', *Nature*, 228(5266), pp. 34–36. doi: 10.1038/228034a0.
- Van Erp, C., Irwin, N. G. and Hoey, A. J. (2006) 'Long-term administration of pirfenidone improves cardiac function in mdx mice.', *Muscle & nerve*, 34(3), pp. 327–334. doi: 10.1002/mus.20590.
- Ertel, E. A. *et al.* (2000) 'Nomenclature of voltage-gated calcium channels', *Neuron*, 25(3), pp. 533–535. doi: 10.1080/13518040701205365.
- Fabiato, A. (1983) 'Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum.', *The American journal of physiology*, 245(1), pp. C1–C14. doi: 10.1016/0022-2828(92)90114-F.
- Fawcett, D. W. and McNutt, N. S. (1969) 'The ultrastructure of the cat myocardium. I. Ventricular papillary muscle.', *The Journal of cell biology*, 42(1), pp. 1–45. doi: 10.1083/jcb.42.1.1.
- Fearnley, C. J., Roderick, H. L. and Bootman, M. D. (2011) 'Calcium signaling in cardiac myocytes', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(11), pp. 1–20.
- Ferrara, F. *et al.* (2020) 'The added value of pirfenidone to fight inflammation and fibrotic state induced by SARS-CoV-2: Anti-inflammatory and anti-fibrotic therapy could solve the lung complications of the infection?', *European Journal of Clinical Pharmacology*. European Journal of Clinical Pharmacology, pp. 5–8. doi: 10.1007/s00228-020-02947-4.
- Forbes, M. S. and Sperelakis, N. (1982) 'Bridging junctional processes in couplings of skeletal, cardiac, and smooth muscle', *Muscle & Nerve*, 5(9), pp. 674–681. doi: 10.1002/mus.880050903.
- Ford, L. E. and Podolsky, R. J. (1970) 'Regenerative calcium release within muscle cells', *Science*, 167(3914), pp. 58–59. doi: 10.1126/science.167.3914.58.
- Franzini-Armstrong, C., Protasi, F. and Ramesh, V. (1999) 'Shape, size, and distribution of Ca(2+) release units and couplons in skeletal and cardiac muscles.', *Biophysical journal*, 77(3), pp. 1528–1539. doi: 10.1016/S0006-3495(99)77000-1.
- Franzini-Armstrong, C., Protasi, F. and Tijssens, P. (2005) 'The assembly of calcium release units in cardiac muscle', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1047, pp. 76–85. doi: 10.1196/annals.1341.007.
- 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.
- Fuller, M. D. *et al.* (2010) 'Molecular mechanism of calcium channel regulation in the fight-or-flight

response', *Science Signaling*, 3(141), pp. 1–11. doi: 10.1126/scisignal.2001152.

Furchgott, R. and Zawadzki, J. V (1980) 'The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.', *Nature*, 288(5789), pp. 373–376.

Gadekar, S. M. (1976) "'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 edn. Madrid, España: Teba, S. L.

Giri, S. *et al.* (1999) 'Effects of pirfenidone on the generation of reactive oxygen species in vitro', *J. Environ Pathol Toxicol Oncol*, 18(3), pp. 169–177.

Girouard, H., W. *et al.* (2009) 'NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and NOX2.', *J. Neurosci*, 29, pp. 2545–2552. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0133-09.2009.

Goldhaber, J. I. (1996) 'Free radicals enhance Na⁺/Ca²⁺ exchange in ventricular myocytes', *Am. J. Physiol.*, 271, pp. H823–H833. doi: 10.1152/ajpheart.1996.271.3.H823.

Gómez, A. M. *et al.* (1997) 'Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure', *Science*, 276(5313), pp. 800–806. doi: 10.1126/science.276.5313.800.

Györke, S. and Fill, M. (1993) 'Ryanodine receptor adaptation: Control mechanism of Ca²⁺-induced Ca²⁺-release in heart', *Science*, 260(5109), pp. 807–809. doi: 10.1126/science.8387229.

Hammer, K. *et al.* (2010) 'Remodelling of Ca²⁺ handling organelles in adult rat ventricular myocytes during long term culture', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Elsevier Ltd, 49(3), pp. 427–437. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.05.010.

He, J. Q. *et al.* (2001) 'Reduction in density of transverse tubules and L-type Ca²⁺ channels in canine tachycardia-induced heart failure', *Cardiovascular Research*, 49(2), pp. 298–307. doi: 10.1016/S0008-6363(00)00256-X.

Hegyí, B. *et al.* (2018) 'Complex electrophysiological remodeling in postinfarction ischemic heart failure', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(13), pp. E3036–E3044. doi: 10.1073/pnas.1718211115.

Hell, J. W. (2010) 'b-adrenergic regulation of the L-type Ca²⁺ channel Ca_v1.2 by PKA rekindles excitement', *Science Signaling*, 3(141), pp. 1–5. doi: 10.1126/scisignal.3141pe33.

Hess, D. T. *et al.* (2005) 'Protein S-nitrosylation: purview and parameters.', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(2), pp. 150–166. doi: 10.1038/nrm1569.

Hille, B. (1992) 'Classical description of channels', in *Ion channels of excitable membranes*. second. 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. doi: 10.1165/rcmb.2005-0452OC.

Hirano, Y., Fozzard, H. and 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.

- Huang, H. *et al.* (2017) 'Cardiac voltage-gated ion channels in safety pharmacology: Review of the landscape leading to the CiPA initiative', *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. Elsevier, 87(September 2016), pp. 11–23. doi: 10.1016/j.vascn.2017.04.002.
- Ibrahim, M., Kukadia, P., *et al.* (2012) 'Cardiomyocyte Ca²⁺ handling and structure is regulated by degree and duration of mechanical load variation', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(12), pp. 2910–2918. doi: 10.1111/j.1582-4934.2012.01611.x.
- Ibrahim, M., Navaratnarajah, M., *et al.* (2012) 'Mechanical unloading reverses transverse tubule remodelling and normalizes local Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in a rodent model of heart failure', *European Journal of Heart Failure*, 14(6), pp. 571–580. doi: 10.1093/eurjhf/hfs038.
- Ignarro, L. J. *et al.* (1982) 'Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung', *BBA - General Subjects*, 718(1), pp. 49–59. doi: 10.1016/0304-4165(82)90008-3.
- Iyer, S. N., Gurujeyalakshmi, G. and 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. and 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.
- Iyer, S. N., Hyde, D. M. and Giri, S. N. (2000) 'Anti-inflammatory effect of pirfenidone in the bleomycin-hamster model of lung inflammation.', *Inflammation*, 24(5), pp. 477–491. doi: 10.1023/A:1007068313370.
- Jian, Z. *et al.* (2014) 'Mechanochemotransduction during cardiomyocyte contraction is mediated by localized nitric oxide signaling', *Science Signaling*, 18(7), p. 317. doi: 10.1126/scisignal.2005046.
- Jiang, F. (2013) *Pharmacology of Polyphenols in Cardiac Remodeling: Potential Biological Mechanisms, Polyphenols in Human Health and Disease*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-398456-2.00073-6.
- De Jongh, K. S. *et al.* (1996) 'Specific phosphorylation of a site in the full-length form of the α 1 subunit of the cardiac L-type calcium channel by adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase', *Biochemistry*, 35(32), pp. 10392–10402. doi: 10.1021/bi953023c.
- Kar, R., Kellogg, D. L. and Roman, L. J. (2015) 'Oxidative stress induces phosphorylation of neuronal NOS in cardiomyocytes through AMP-activated protein kinase (AMPK)', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Ltd, 459(3), pp. 393–397. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.113.
- Kemi, O. J. *et al.* (2011) 'The effect of exercise training on transverse tubules in normal, remodeled, and reverse remodeled hearts', *Journal of Cellular Physiology*, 226(9), pp. 2235–2243. doi: 10.1002/jcp.22559.
- Kim, E. S. and Keating, G. M. (2015) 'Pirfenidone: A review of its use in idiopathic pulmonary fibrosis', *Drugs*, 75(2), pp. 219–230. doi: 10.1007/s40265-015-0350-9.
- Kobirumaki-Shimozawa, F. *et al.* (2014) 'Cardiac thin filament regulation and the Frank-Starling mechanism', *Journal of Physiological Sciences*, 64(4), pp. 221–232. doi: 10.1007/s12576-014-0314-y.
- Köhler, A. C., Sag, C. M. and Maier, L. S. (2014) 'Reactive oxygen species and excitation-contraction

coupling in the context of cardiac pathology', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Elsevier Ltd, 73, pp. 92–102. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.03.001.

Kojda, G. and Kottenberg, K. (1999) 'Regulation of basal myocardial function by NO', *Cardiovascular Research*, 41(3), pp. 514–523. doi: 10.1016/S0008-6363(98)00314-9.

Korantzopoulos, P. *et al.* (2007) 'The role of oxidative stress in the pathogenesis and perpetuation of atrial fibrillation', *Int. J. Cardiol*, 115, pp. 135–143. doi: 10.1016/j.ijcard.2006.04.026.

Kris-Etherton, P. M. *et al.* (2004) 'Antioxidant vitamin supplements and cardiovascular disease', *Circulation*, 110(5), pp. 637–641. doi: 10.1161/01.CIR.0000137822.39831.F1.

Kuang, Q., Purhonen, P. and Hebert, H. (2015) 'Structure of potassium channels', *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer Basel, 72(19), pp. 3677–3693. doi: 10.1007/s00018-015-1948-5.

Kuster, G. M. *et al.* (2010) 'Redox-mediated reciprocal regulation of SERCA and Na⁺-Ca²⁺ exchanger contributes to sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ depletion in cardiac myocytes', *Free Radical Biology and Medicine*, 48(9), pp. 1182–1187. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.038.

Lacinová, L. (2005) 'Voltage-dependent calcium channels.', *General physiology and biophysics*, 24(Suppl 1), pp. 1–78. doi: 10.1002/jcp.1041460203.

Laizzo, P. A. (2010) *Handbook of cardiac anatomy, physiology and devices*. 2nd edn. Minneapolis: Springer.

Layland, J., Solaro, R. J. and Shah, A. M. (2005) 'Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation', *Cardiovascular Research*, 66(1), pp. 12–21. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.12.022.

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. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.624320.

Lei, M. *et al.* (2004) 'Requirement of neuronal -and cardiac- type sodium channels for murine sinoatrial node pacemaking', *Journal of Physiology*, 559(3), pp. 835–848. doi: 10.1113/jphysiol.2004.068643.

Lenaerts, I. *et al.* (2009) 'Ultrastructural and functional remodeling of the coupling between Ca²⁺ influx and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in right atrial myocytes from experimental persistent atrial fibrillation', *Circulation Research*, 105(9), pp. 876–885. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.206276.

Li, C. *et al.* (2017) 'Pirfenidone controls the feedback loop of the AT1R/p38 MAPK/renin-angiotensin system axis by regulating liver X receptor- α in myocardial infarction-induced cardiac fibrosis', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 7(January), pp. 1–11. doi: 10.1038/srep40523.

Liang, H. *et al.* (2003) 'Unified mechanisms of Ca²⁺ regulation across the Ca²⁺ channel family', *Neuron*, 39(6), pp. 951–960. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00560-9.

Lima, B. *et al.* (2010) 'S-nitrosylation in cardiovascular signaling', *Circulation Research*, 106(4), pp. 633–646. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.207381.

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. doi: 10.1016/j.jtcvs.2005.04.012.

Louch, W. E. *et al.* (2004) 'Reduced synchrony of Ca²⁺ release with loss of T-tubules - A comparison to

- Ca²⁺ release in human failing cardiomyocytes', *Cardiovascular Research*, 62(1), pp. 63–73. doi: 10.1016/j.cardiores.2003.12.031.
- Lyon, A. R. *et al.* (2009) 'Loss of T-tubules and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(16), pp. 6854–6859. doi: 10.1073/pnas.0809777106.
- 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). doi: 10.1186/1755-1536-3-16.
- Mackenzie, L. *et al.* (2004) 'The spatial pattern of atrial cardiomyocyte calcium signalling modulates contraction.', *Journal of cell science*, 117(Pt 26), pp. 6327–6337. doi: 10.1242/jcs.01559.
- Margolin, S. B. (1994) "'Composition and method for reparation and prevention of fibrotic lesions" U.S. patent No 5,310,562'.
- Margolin, S. B. (2000) "'Treatment of cytokine growth factor caused disorders" U.S. patent No 6,090,822'.
- Marx, S. O. *et al.* (2000) 'PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts.', *Cell*, 101(4), pp. 365–76. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80847-8.
- Meissner, G. (2017) 'The structural basis of ryanodine receptor ion channel function', *Journal of General Physiology*, 149(12), pp. 1065–1089. doi: 10.1085/jgp.201711878.
- Méry, P. *et al.* (1991) 'Ca²⁺ current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(February), pp. 1197–1201.
- Mesirca, P., Torrente, A. G. and Mangoni, M. E. (2015) 'Functional role of voltage gated Ca²⁺ channels in heart automaticity', *Frontiers in Physiology*, 6(February), pp. 1–13. doi: 10.3389/fphys.2015.00019.
- Mezzano, V. and Sheikh, F. (2012) 'Cell-cell junction remodeling in the heart: Possible role in cardiac conduction system function and arrhythmias?', *Life Sciences*. Elsevier B.V., 90(9–10), pp. 313–321. doi: 10.1016/j.lfs.2011.12.009.
- Miric, G. *et al.* (2001) 'Reversal of cardiac and renal fibrosis by pirfenidone and Spironolactone in streptozotocin-diabetic rats', *Br. J. Pharmacol.*, 6(133), pp. 687–694. doi: 10.1038/sj.bjp.0704131.
- 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. doi: 10.1038/sj.bjp.0704539.
- Misra, H. P. and 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. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.04.093.
- Mitcheson, J. S., Hancox, J. C. and Levi, a J. (1998) 'Cultured adult cardiac myocytes: future applications,

culture methods, morphological and electrophysiological properties [In Process Citation]', *Cardiovasc. Res.*, 39(2), pp. 280–300.

Moczydlowski, E. G. (2017) 'Medical Physiology', in *Medical Physiology*. 3ra edn. Philadelphia, PA: Elsevier, p. 1312.

Moncada, S., Higgs, a. and Furchgott, R. (1997) 'International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research.', *Pharmacological reviews*, 49(2), pp. 137–142.

Monsalvo-Villegas, A. (2015) *Pirfenidona modula el acople excitación - contracción en miocitos ventriculares de rata adulta*. Centro de investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Monsalvo-Villegas, A., Osornio-Garduño, D. S. and Avila, G. (2018) 'Long-Term Regulation of Excitation–Contraction Coupling and Oxidative Stress in Cardiac Myocytes by Pirfenidone', *Frontiers in Physiology*, 9(December), pp. 1–13. doi: 10.3389/fphys.2018.01801.

Munshi, N. V. (2012) 'Gene Regulatory Networks in Cardiac Conduction System Development', *Circulation Research*, 110(11), pp. 11525–1537. doi: 10.1038/jid.2014.371.

Murphy, M. P. (2009) 'How mitochondria produce reactive oxygen species', *Biochemical Journal*, 417(1), pp. 1–13. doi: 10.1042/BJ20081386.

Nakanishi, H. *et al.* (2004) 'Pirfenidone inhibits the induction of iNOS stimulated by interleukin-1b at a step of NF-κB DNA binding in hepatocytes', *Journal of Hepatology*, 41(5), pp. 730–736. doi: 10.1016/j.jhep.2004.07.007.

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. doi: 10.1016/S0014-2999(02)01758-2.

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. doi: 10.1152/physrev.00014.2006.

Nelson, D. L. and Cox, M. M. (2008) *Lehninger principles of biochemistry*. 5th edn. Edited by K. AHR. New York: SARA TENNEY.

Nerbonne, J. and Kass, R. (2005) 'Molecular physiology of cardiac repolarization', *Physiological reviews*, 85, pp. 1205–1253. doi: 10.1152/physrev.00002.2005.

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. doi: 10.1016/j.hrthm.2010.04.030.

NIH (2015) *Anatomy of the Heart - How the heart works*. Available at: <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/hhw/anatomy>. (consultado el 10 de enero de 2020)

NIH (2020) *A Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Pirfenidone With Novel Coronavirus Infection*. Available at: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04282902>. (consultado el 14 de julio de 2020)

Nivala, M. *et al.* (2015) 'T-tubule disruption promotes calcium alternans in failing ventricular myocytes:

Mechanistic insights from computational modeling', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Elsevier Ltd, 79, pp. 32–41. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.10.018.

Oda, T. *et al.* (2009) 'The nature of the globular- to fibrous-actin transition', *Nature*, 457(7228), pp. 441–445. doi: 10.1038/nature07685.

Oku, H. *et al.* (2002) 'Pirfenidone suppresses tumor necrosis factor-alpha, enhances interleukin-10 and protects mice from endotoxic shock.', *European journal of pharmacology*, 446(1–3), pp. 167–176. doi: 12098599.

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. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.06.046.

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. and McCallister, L. P. (1973) 'Microscopic, Quantitative electron description of heart muscle cells. Application to normal, hypertrophied and thyroxin-stimulated hearts', *Am. J. Cardiol.*, 31, pp. 172–181. doi: 10.1016/0002-9149(73)91030-8.

Page, E., McCallister, L. P. and Power, B. (1971) 'Sterological 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. doi: 10.1073/pnas.68.7.1465.

Page, E. and 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. doi: 10.1161/01.RES.45.2.260.

Palmer, R. M., Ferrige, A. G. and Moncada, S. (1987) 'Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.', *Nature*, 327(6122), pp. 524–526. doi: 10.1038/327524a0.

Peterson, B. Z. *et al.* (1999) 'Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺ -dependent inactivation of L-type calcium channels.', *Neuron*, 22(3), pp. 549–558. doi: S0896-6273(00)80709-6 [pii].

Pfizer, G., Rüegg, J. C. and Hofmann, F. (1982) 'cGMP-dependent protein kinase decreases calcium sensitivity of skinned cardiac fibers', *FEBS Letters*, 149(2), pp. 171–175. doi: 10.1016/0014-5793(82)81095-8.

Picht, E. *et al.* (2011) 'Dynamic calcium movement inside cardiac sarcoplasmic reticulum during release', *Circulation Research*, 108(7), pp. 847–856. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.240234.

Potter, J. D. and Gergely, J. (1974) 'Troponin, Tropomyosin, and Actin Interactions in the Ca²⁺ Regulation of Muscle Contraction', *Biochemistry*, 13(13), pp. 2697–2703.

Qin, F. *et al.* (2013) 'Hydrogen peroxide-mediated SERCA cysteine 674 oxidation contributes to impaired cardiac myocyte relaxation in senescent mouse heart.', *Journal of the American Heart Association*, 2(4), pp. 1–9. doi: 10.1161/JAHA.113.000184.

Qin, F. *et al.* (2014) 'Cytosolic H₂O₂ mediates hypertrophy, apoptosis, and decreased SERCA activity in mice with chronic hemodynamic overload', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 306(10), pp. 1453–1463. doi: 10.1152/ajpheart.00084.2014.

Qu, Y. *et al.* (2005) 'Localization and modulation of α_1D (Cav1.3) L-type Ca channel by protein kinase A', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 288, pp. H2123–H2130. doi: 10.1152/ajpheart.01023.2004.

Rababa'h, A. M. *et al.* (2018) 'Oxidative Stress and Cardiac Remodeling: An Updated Edge', *Current Cardiology Reviews*, 14(1), pp. 53–59. doi: 10.2174/1573403x14666180111145207.

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. doi: 10.1681/ASN.2008090931.

Ramos-Mondragón, R. *et al.* (2012) 'Chronic potentiation of cardiac L-type Ca^{2+} channels by pirfenidone', *Cardiovascular Research*, 96(2), pp. 244–254. doi: 10.1093/cvr/cvs248.

Ramos-Mondragón, R., Galindo, C. a and Avila, G. (2008) 'Role of TGF-beta on cardiac structural and electrical remodeling.', *Vascular health and risk management*, 4(6), pp. 1289–1300.

Rastaldo, R. *et al.* (2007) 'Nitric oxide and cardiac function', *Life Sciences*, 81(10), pp. 779–793. doi: 10.1016/j.lfs.2007.07.019.

Ringer, S. (1883) 'A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart', *Journal of Physiogy*, 3(1), pp. 29–42.

Ríos-Pérez, E. B. *et al.* (2016) 'Chronic atrial ionic remodeling by aldosterone: potentiation of L-type Ca^{2+} channels and its arrhythmogenic significance', *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology, 468(11–12), pp. 1823–1835. doi: 10.1007/s00424-016-1876-8.

Ross, M. and and Wojciech, P. (2008) *Histología*. 5ta edn, *Histología*. 5ta edn. Buenos Aires: Médica Panamericana.

Salazar-Montes, A. *et al.* (2008) 'Potent antioxidant role of Pirfenidone in experimental cirrhosis', *European Journal of Pharmacology*, 595(1–3), pp. 69–77. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.06.110.

Santacruz-Tolozza, L. *et al.* (2000) 'Functional analysis of a disulfide bond in the cardiac Na^{+} - Ca^{2+} exchanger', *Journal of Biological Chemistry*, 275(1), pp. 182–188. doi: 10.1074/jbc.275.1.182.

Santana, L. F., Cheng, E. P. and 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. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.09.005.

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. doi: 10.1016/S0168-8278(02)00245-3.

Di Sario, A. *et al.* (2004) 'The anti-fibrotic effect of pirfenidone in rat liver fibrosis is mediated by downregulation of procollagen $\alpha_1(I)$, 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. doi: 10.1183/09059180.00001111.

Schaper, J., Meiser, E. and Stammeler (1985) 'Ultrastructural morphometric analysis of myocardium from dogs, rats, hamsters, mice, and from human hearts', *Circulation Research*, 56(3), pp. 377–391. doi: 10.1161/01.RES.56.3.377.

Sedarat, F. *et al.* (2000) 'Colocalization of dihydropyridine and ryanodine receptors in neonate rabbit heart using confocal microscopy', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*,

279(1 48-1), pp. 202–209.

Senoner, T. and Dichtl, W. (2019) 'Oxidative stress in cardiovascular diseases: Still a therapeutic target?', *Nutrients*, 11(9). doi: 10.3390/nu11092090.

Shannon, T. R., Guo, T. and Bers, D. M. (2003) 'Ca²⁺ scraps local depletions of free [Ca²⁺] in cardiac sarcoplasmic reticulum during contractions leave substantial Ca²⁺ reserve', *Circulation Research*, 93(1), pp. 40–45. doi: 10.1161/01.RES.0000079967.11815.19.

Silverthorn, D. U. (2009) *Fisiología Humana. Un enfoque integrado*. 4ta edn. Buenos Aires: Médica Panamericana.

Simon, J. N. *et al.* (2014) 'Nitric oxide synthase regulation of cardiac excitation-contraction coupling in health and disease', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Elsevier Ltd, 73, pp. 80–91. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.03.004.

Sjostrand, F. S., Andersson-Cedergren, E. and 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. doi: 10.1016/S0022-5320(58)80008-8.

Soeller, C. and 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. doi: 10.1161/01.RES.84.3.266.

Solaro, R. J., Henze, M. and Kobayashi, T. (2013) 'Integration of troponin i phosphorylation with cardiac regulatory networks', *Circulation Research*, 112(2), pp. 355–366. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.268672.

Sommer, J. R. and 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. *et al.* (2006) 'Orphaned ryanodine receptors in the failing heart', *Accessed 08/08/13*, 103(11), pp. 4305–4310. doi: 10.1073/pnas.0509324103.

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. doi: 10.1196/annals.1341.009.

Stern, M. D., Pizarro, G. and Ríos, E. (1997) 'Local control model of excitation-contraction coupling in skeletal muscle', *Journal of General Physiology*, 110(4), pp. 415–440. doi: 10.1085/jgp.110.4.415.

Sun, J. *et al.* (2007) 'Preconditioning results in S-nitrosylation of proteins involved in regulation of mitochondrial energetics and calcium transport', *Circulation Research*, 101(11), pp. 1155–1163. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.155879.

Sweeney, H. L. and Houdusse, A. (2010) 'Structural and Functional Insights into the Myosin Motor Mechanism', *Annual Review of Biophysics*, 39(1), pp. 539–557. doi: 10.1146/annurev.biophys.050708.133751.

Takeda, S. (2005) 'Crystal structure of troponin and the molecular mechanism of muscle regulation', *Journal of Electron Microscopy*, 54(SUPPL. 1), pp. 35–41. doi: 10.1093/jmicro/54.suppl_1.i35.

Tamargo, J. *et al.* (2004) 'Pharmacology of cardiac potassium channels.', *Cardiovascular Research*, 62(1), pp. 9–33. doi: 10.1016/j.cardiores.2003.12.026.

- Terentyev, D. *et al.* (2008) 'Redox modification of ryanodine receptors contributes to sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in chronic heart failure', *Circulation Research*, 103(12), pp. 1466–1472. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.184457.
- Tsuchiya, H. *et al.* (2004) 'Pirfenidone prevents endotoxin-induced liver injury after partial hepatectomy in rats', *Transplantation Proceedings*, 36(7), pp. 1975–1976. doi: 10.1016/j.transproceed.2004.08.063.
- Vila-Petroff, M. G. *et al.* (1999) 'Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes.', *Circulation research*, 84(9), pp. 1020–1031. doi: 10.1161/01.RES.84.9.1020.
- 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. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.
- Voigt, N. *et al.* (2012) 'Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and increased Na⁺-Ca²⁺ exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation', *Circulation*, 125, pp. 2059–2070. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.067306.
- Vu, T. D. and Kofidis, T. (2014) *Biomaterials and cells for cardiac tissue engineering, Cardiac Regeneration and Repair: Biomaterials and Tissue Engineering*. doi: 10.1533/9780857096715.2.127.
- Wagner, E. *et al.* (2014) 'Analysis of tubular membrane networks in cardiac myocytes from atria and ventricles', *Journal of Visualized Experiments*, (92), pp. 1–19. doi: 10.3791/51823.
- Walden, a. P., Dibb, K. M. and Trafford, a. W. (2009) 'Differences in intracellular calcium homeostasis between atrial and ventricular myocytes', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Elsevier Inc., 46(4), pp. 463–473. doi: 10.1016/j.yjmcc.2008.11.003.
- Wang, H. *et al.* (2010) 'Regulation of myocyte contraction via neuronal nitric oxide synthase: role of ryanodine receptor S-nitrosylation.', *The Journal of physiology*, 588(15), pp. 2905–17. doi: 10.1113/jphysiol.2010.192617.
- Wang, J. *et al.* (1996) 'Regional expression of sodium pump subunit isoforms and Na⁺-Ca²⁺ exchanger in the human heart', *Journal of Clinical Investigation*, 98(7), pp. 1650–1658. doi: 10.1172/JCI118960.
- Wang, M. C. *et al.* (2004) 'The three-dimensional structure of the cardiac L-type voltage-gated calcium channel: Comparison with the skeletal muscle form reveals a common architectural motif', *Journal of Biological Chemistry*, 279(8), pp. 7159–7168. doi: 10.1074/jbc.M308057200.
- Wang, Y. *et al.* (2013) 'Pirfenidone attenuates cardiac fibrosis in a mouse model of TAC-induced left ventricular remodeling by suppressing NLRP3 Inflammasome formation', *Cardiology (Switzerland)*, 126(1), pp. 1–11. doi: 10.1159/000351179.
- Wang, Y. G., Rechenmacher, C. E. and Lipsius, S. L. (1998) 'Nitric oxide signaling mediates stimulation of L-type Ca²⁺ current elicited by withdrawal of acetylcholine in cat atrial myocytes.', *Journal of General Physiology*, 111(1), pp. 113–125. doi: 10.1085/jgp.111.1.113.
- World Health Institute (2020) *Coronavirus disease (COVID-19) Situation Report – 175*. Available at: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports>.
- Xu, K. Y. *et al.* (1999) 'Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(2), pp. 657–62. doi: DOI

10.1073/pnas.96.2.657.

Xu, L. *et al.* (1998) 'Activation of the Cardiac Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor) by Poly-S-Nitrosylation', *Science*, 279(January), pp. 234–237. doi: 10.1126/science.279.5348.234.

Yamagami, K. *et al.* (2015) 'Pirfenidone exhibits cardioprotective effects by regulating myocardial fibrosis and vascular permeability in pressure-overloaded hearts', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 309(3), pp. H512–H522. doi: 10.1152/ajpheart.00137.2015.

Yamasaki, Y. *et al.* (1997) 'Ultra-high-resolution scanning electron microscopy of the sarcoplasmic reticulum of the rat atrial myocardial cells', *Anatomical Record*, 248(1), pp. 70–75. doi: 10.1002/(SICI)1097-0185(199705)248:1<70::AID-AR8>3.0.CO;2-J.

Yamazaki, T. *et al.* (2012) 'The antifibrotic agent pirfenidone inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice', *Hypertension Research*. Nature Publishing Group, 35(1), pp. 34–40. doi: 10.1038/hr.2011.139.

Yasui, K., Palade, P. and Györke, S. (1994) 'Negative control mechanism with features of adaptation controls Ca²⁺ release in cardiac myocytes', *Biophysical Journal*, 67(1), pp. 457–460. doi: 10.1016/S0006-3495(94)80501-6.

Ye, Z. and Song, H. (2008) 'Antioxidant vitamins intake and the risk of coronary heart disease: Meta-analysis of cohort studies', *European Journal of Preventive Cardiology*, 15(1), pp. 26–34. doi: 10.1097/HJR.0b013e3282f11f95.

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. doi: 10.1085/jgp.114.6.787.

Zhang, X. *et al.* (2004) 'Ethanol and acetaldehyde in alcoholic cardiomyopathy: from bad to ugly en route to oxidative stress', *Alcohol*, 32, pp. 175–186. doi: 10.1016/j.alcohol.2004.01.005.

Zhou, H. *et al.* (2005) 'Pirfenidone inhibits obliterated airway disease in mouse tracheal allografts', *the journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International society for Heart Transplantation*, 24(10), pp. 1577–1585.

Zima, A. V. *et al.* (2008) 'Termination of cardiac Ca²⁺ sparks: Role of intra-SR [Ca²⁺], release flux, and intra-SR Ca²⁺ diffusion', *Circulation Research*, 103(8). doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.183236.

Zima, A. V. *et al.* (2010) 'Ca²⁺ spark-dependent and -independent sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in normal and failing rabbit ventricular myocytes', *Journal of Physiology*, 588(23), pp. 4743–4757. doi: 10.1113/jphysiol.2010.197913.

Zima, A. V. and Blatter, L. A. (2006) 'Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters', *Cardiovascular Research*, 71(2), pp. 310–321. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.02.019.