



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA  
Laboratorio de Cardiología Molecular

Efecto de la pirfenidona sobre los  
mecanismos de regulación del  $\text{Ca}^{++}$   
citosólico del fibroblasto cardiaco en un  
modelo de fibrosis “in vitro”.

Tesis

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS**

PRESENTA

**L.T.F. Julio Cesar Zimbro Morales**

DIRECTOR DE TESIS

**D.C. José Everardo Avelino Cruz**

NOVIEMBRE 2017

*Dedicado a todos mis seres queridos. Familia, amigos y tú.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a todas las personas que influyeron de alguna manera para la realización de este trabajo. En especial agradezco al Dr. Everardo y a mis compañeros ya que fueron parte indispensable para la realización de este trabajo, agradezco el tiempo y el conocimiento que me transmitieron durante mi estancia en la maestría. Agradezco también a la Dra. Gómez, al Dr. Galindo y al Dr. Berra por las recomendaciones que me hicieron para lograr un trabajo de mayor calidad. También quiero agradecer a mi familia ya que el apoyo, tiempo y conocimiento que me brindaron fueron trascendentales para culminar la tesis. A Mafer, que desde la distancia encontré a alguien con quien pasar momentos extraños pero divertidos e interesantes. También agradezco a mis amigos que si bien ya no nos hemos visto tan seguido como hemos querido, la amistad es inquebrantable. Por último quiero agradecer a la VIEP por el apoyo otorgado con número de oficio 3057/2017 para finalizar la tesis y al CONCACYT por el apoyo CVU 711111 otorgado para el desarrollo de este trabajo.



# ÍNDICE

## Contenido

AGRADECIMIENTOS.....	3
ÍNDICE .....	5
ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN .....	8
INTRODUCCIÓN.....	10
Fibroblasto.....	11
Matriz extracelular.....	12
Fibrosis Cardiaca .....	13
El Ca <sup>2+</sup> y su papel en la fibrosis cardiaca. ....	16
Mecanismos de regulación del Ca <sup>2+</sup> en el fibroblasto.....	17
Pirfenidona .....	18
JUSTIFICACIÓN.....	19
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVOS.....	20
Objetivo General.....	20
Objetivos Particulares .....	20
DIAGRAMA DE TRABAJO .....	22
MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
Animales.....	23
Cultivo de fibroblastos cardiacos.....	23
Tratamientos.....	23
Tratamiento con Angiotensina II.....	24
Tratamiento con Pirfenidona.....	24
Tratamiento con Losartán.....	24
Tratamiento con Angiotensina II y Pirfenidona.....	24
Tratamiento con Angiotensina II y Losartán.....	24
Tratamiento con Angiotensina II, Pirfenidona y Losartán.....	24
Medición de la concentración intracelular del Ca <sup>2+</sup> .....	25
Inmunofluorescencia .....	25

Soluciones .....	26
Análisis estadístico.....	26
RESULTADOS. ....	27
Efecto agudo de la pirfenidona sobre los niveles intracelulares de Ca <sup>2+</sup> de los fibroblastos cardiacos. ....	28
Efecto crónico de la pirfenidona en los mecanismos de regulación de calcio de los fibroblastos cardiacos. ..	30
Transitorios de calcio inducidos por la fuga de calcio del retículo endoplásmico y por la entrada de calcio operada por los almacenes intracelulares .....	31
Efecto de la inhibición de NCX y PMCA.....	46
Liberación de calcio del RE inducida por la activación del receptor a IP3.....	53
<i>Efecto del losartán sobre la liberación de calcio del RE inducida por la activación de los receptores a IP3 .</i>	57
<i>Efecto de la pirfenidona sobre la liberación de calcio del RE estimulado por la activación de los receptores a IP3 en los fibroblastos tratados con Ang II</i> .....	58
<i>Efecto del losartán sobre la liberación de calcio inducida por la activación del receptor a IP3 en los fibroblastos fibróticos.....</i>	59
DISCUSIÓN.....	61
Diferenciación de los fibroblastos cardiacos. ....	61
Efecto agudo de la pirfenidona en los niveles basales de Ca <sup>2+</sup> .....	62
Efecto crónico de la pirfenidona en los mecanismos homeostáticos de Ca <sup>2+</sup> .....	63
Fibroblastos cardiacos en condiciones no fibróticas.....	63
Fibroblastos cardiacos en condiciones fibróticas. ....	64
CONCLUSIONES. ....	69
BIBLIOGRAFÍA.....	70

## ABREVIATURAS

ACE: Enzima convertidora de angiotensina

Ang I: Angiotensina I

Ang II: Angiotensina II.

AT1: Receptor tipo 1 de angiotensina II.

AT2: Receptor tipo 2 de angiotensina II.

bFGF: Factor básico de crecimiento de fibroblasto.

CCR2: Receptor de quimiocina tipo 2.

CTGF: Factor de crecimiento de tejido conectivo

Cx:Conexina

ET-1: Endotelina-1.

FGF: Factor de crecimiento de fibroblasto.

IECAS: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.

IL: Interleucina.

MC: Mastocito

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1.

MEC: Matriz extracelular.

MMPs: Metaloproteinasas de Matriz.

NCX: Intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PMCA:  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática

RAS: Sistema renina-angiotensina

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SEN: Solución extracelular normal

SERCA:  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo sarco/endoplásmico

SOCE: Entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  operada por los almacenes intracelulares

SOCs: Canales operados por reservas

TGF- $\beta$ 1: Factor de Crecimiento Transformante Beta -1.

TIMPs: Inhibidores tisulares de metaloproteinasas de matriz.

TNF- $\alpha$ : Factor de Necrosis Tumoral Alfa.

T $\beta$ RII: Receptor tipo II de TGF- $\beta$ .

$\alpha$ -SMA: Actina del músculo liso alfa

NO: Óxido nítrico

## RESUMEN

La fibrosis cardiaca hace referencia a una excesiva acumulación de las proteínas que conforman a la matriz extracelular. Esta situación acompaña a diversas patologías cardiacas como el infarto, la hipertensión arterial y a la diabetes mellitus, entre otras. La fibrosis cardiaca es modulada por diversos factores dentro de los cuales se encuentra al calcio. Actualmente no existe un medicamento eficaz contra la fibrosis cardiaca limitándose el tratamiento al uso de fármacos como el losartán que enlentecen su progreso. La pirfenidona es un fármaco que ha sido aprobado para el uso en humanos por la FDA para el tratamiento de fibrosis pulmonar idiopática. Estudios en animales también ha comprobado que su efecto antifibrótico se puede extrapolar a otro tipo de fibrosis como la cardiaca. Aunque diversos trabajos han demostrado que la pirfenidona modifica los niveles de diferentes moléculas asociadas a la fibrosis como el TNF- $\alpha$  o el TGF- $\beta$ 1, no existen aún trabajos que aborden el efecto de esta droga en los mecanismos de regulación del calcio en el fibroblasto cardiaco, protagonista de esta patología. Para determinar esto, se usaron cultivos primarios de fibroblastos cardiacos de rata de la cepa Long-Evans y mediante microfluorometría se estudió el efecto de la pirfenidona en los mecanismos reguladores de calcio. Los resultados obtenidos muestran que la Ang II 100nM provoca en los fibroblastos cardiacos la expresión del marcador fibrótico  $\alpha$ -SMA. Por otra parte, el tratamiento agudo con pirfenidona no muestra tener efectos en la homeostasis del calcio del fibroblasto cardiaco tanto en condiciones normales como en condiciones de fibrosis. Los efectos crónicos de la pirfenidona en los fibroblastos cardiacos en situación de fibrosis se dan principalmente por cambios en la actividad de NCX y PMCA, efectos que no se ven en los fibroblastos cardiacos en situaciones normales. Por otra parte, el losartán también mostró tener efectos en la regulación del calcio en los fibroblastos cardiacos en condiciones normales donde se observó que había una mayor entrada de calcio por los SOC y tanto en los fibroblastos cardiacos en condiciones normales como en condiciones fibróticas, modificó la actividad de las proteínas extrusoras.

En conclusión se puede decir que la Ang II promueve la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos. La aplicación aguda de pirfenidona no provoca cambio en los niveles intracelulares de calcio mientras que la aplicación crónica de pirfenidona modula la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  en los fibroblastos tratados con Ang II, aumentando la liberación de calcio, la entrada de calcio a través de



los SOC y la extrusión del ion. El losartán aplicado de manera crónica modula la entrada de calcio y el proceso de extrusión del ion en los fibroblastos controles y tratados con Ang II.

## INTRODUCCIÓN.

El corazón es un órgano encargado de la distribución de la sangre hacia todo el cuerpo. Esto lo logra gracias al trabajo coordinado que tienen diversos tipos de células en el corazón como los miocitos cardiacos, las células endoteliales y los fibroblastos. Los miocitos cardiacos son células especializadas en la contracción muscular que ocupan el 75% del volumen de todo el corazón aunque, en relación a la cantidad, solo son un tercio del total de las células que existen en el corazón (Sabri, 2002). Las células endoteliales son otro tipo de células que se encuentran en la cara interna de los vasos sanguíneos y de las cavidades del corazón sirviendo como revestimiento. Los fibroblastos por otra parte, tienen un papel fundamental en la creación y manutención de la matriz extracelular y esta, cuando incrementa su extensión de manera anormal recibe el nombre de fibrosis cardiaca (Segura, Frazier, & Buja, 2012). Este estado puede ser provocado por diversos estados patológicos o actividades que demandan un gran actividad física o alteraciones metabólicas en el corazón, e.g. hipertensión arterial, diabetes mellitus o la práctica de la halterofilia. Las consecuencias funcionales que puede acarrear la fibrosis cardiaca pueden ser desde inexistentes si el grado de fibrosis es mínimo o bien llegar hasta la insuficiencia cardiaca y la muerte en los casos de fibrosis severa.

Actualmente no existe un tratamiento capaz de frenar o revertir este proceso, sin embargo, si se cuentan con fármacos que ayudan a que el progreso de la fibrosis sea más lento. Dentro de estas opciones terapéuticas se encuentran a los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs), betabloqueadores o los bloqueadores del receptor de Angiotensina II. Estas propuestas de tratamiento actúan en la vía del Sistema Renina-Angiotensina (RAS) como el losartán o sobre la inhibición de moléculas profibróticas como el Factor de Crecimiento Transformante Beta -1 (TGF- $\beta$ 1) dentro de los cuales destaca la pirfenidona (Brilla, Funck, & Rupp, 2000; Edgley, Krum, & Kelly, 2012; Roubille et al., 2014).

La pirfenidona es un fármaco que fue aprobado para el tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática desde octubre del 2014. Este ha sido probado en animales mostrando una eficacia en la reducción de la fibrosis cardiaca y disminuyendo la rigidez diastólica (Edgley et al., 2012; Mullard, 2017)

## Fibroblasto

El fibroblasto es una célula de origen mesenquimal que se encarga de la creación y manutención de la matriz extracelular. Morfológicamente son descritas como células que en general, carecen de una membrana basal y tienden a tener múltiples procesos o extensiones en forma de hoja. Contienen un núcleo oval (con 1 o 2 nucléolos), un retículo endoplasmático rugoso extensivo, un aparato de Golgi prominente y material granular citoplasmático abundante (figura 1). Tiene interacciones dinámicas con el cardiomiocito y mediante un trabajo coordinado, hacen funcionar al corazón como una bomba suministradora de sangre. Aunque los cardiomiocitos abarcan aproximadamente un 75% del volumen del tejido cardiaco, con respecto al número de células, solo representan el 30% mientras que los fibroblastos son el 70% del total aproximadamente (Vliegen, van der Laarse, Cornelisse, & Eulderink, 1991). La función principal del fibroblasto es crear, mantener y ante ciertos estímulos, modificar la dirección y crecimiento de la matriz extracelular, proceso que se conoce como remodelación. Si bien, la principal función que se le ha atribuido ha sido la anteriormente descrita, existe evidencia que sugiere que también tiene un papel importante en la transmisión de señales entre las diferentes células que conforman al tejido cardiaco. Esta transmisión se logra mediante las conexinas que mantienen una unión física entre fibroblastos (Cx 40) o entre fibroblastos y cardiomiocitos (Cx 45) (Kohl, 2005) (Camelliti, 2004). Los fibroblastos, mediante ciertos estímulos como el del TGF- $\beta$ 1 o la angiotensina II, pueden diferenciarse a miofibroblastos, un fenotipo con mayor capacidad de proliferación, migración, contracción (por la presencia de la actina de músculo liso  $\alpha$ ,  $\alpha$ -SMA) y secreción de proteínas (colágeno tipo I). Esta forma del fibroblasto solo se encuentra en situaciones patológicas en donde existe la presencia de fibrosis.

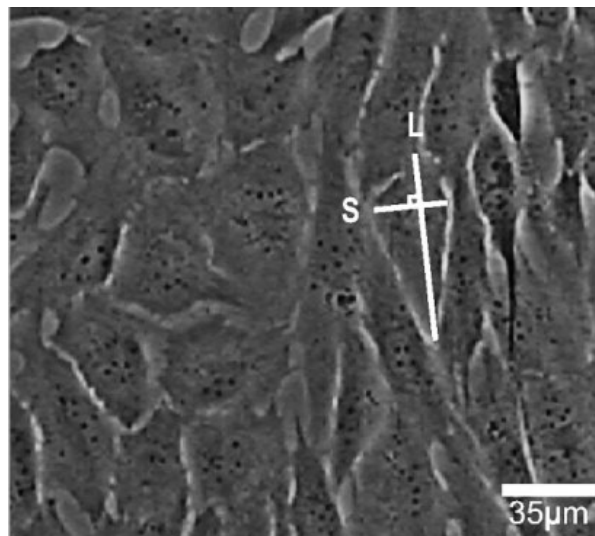


Figura 1. Fibroblasto cardiaco ventricular. Note que el fibroblasto cardiaco tiene un eje corto (S) y otro largo (L) (Burstein, Libby, Calderone, & Nattel, 2008).

## Matriz extracelular.

La matriz extracelular es una red de proteínas que mantiene la integridad estructural del tejido cardíaco y juega un papel importante en la regulación directa e indirecta de las propiedades eléctricas, mecánicas y bioquímicas del corazón. Múltiples señales del ambiente extracelular son transportadas a través de la matriz extracelular las cuales pueden modificar la morfología, función y fenotipo de las células cardíacas. Los fibroblastos son las células responsables de mantener la estructura y organización de la matriz extracelular mediante la secreción y el depósito de diversas proteínas como el colágeno tipo I y III, laminina y fibronectina. Además, los fibroblastos secretan diversas sustancias como factores de crecimiento, citocinas y metaloproteasas que intervienen en la remodelación de la matriz extracelular. Cabe destacar que en situaciones no patológicas, los niveles de remodelación son bajos (Maclean & Pasumarthi, 2014; Segura, Frazier, & Buja, 2014).

Debido básicamente a la capacidad que tienen los fibroblastos de poder remodelar a la matriz extracelular y de los cardiomiocitos para poder hipertrofiarse o hipotrofiarse, el corazón puede cambiar su estructura y su funcionamiento para adaptarse a nuevas situaciones, fenómeno llamado remodelación cardíaca. Estos cambios pueden ser benéficos como es el caso de la hipertrofia cardíaca provocada por ejercicio correctamente dosificado, mejorando la función sistólica y diastólica o pudiendo ser adversos como es el

caso de la insuficiencia cardiaca (Baudino & Carver, 2006; De Luca, Stefani, Pedrizzetti, Pedri, & Galanti, 2011; Karaahmet et al., 2010; Porter & Turner, 2009; Sun, Ma, Yong, & Lv, 2007).

## Fibrosis Cardiaca

Como hemos mencionado antes, la fibrosis cardiaca es una patología que es subyacente a muchas patologías cardiacas resultando en una excesiva acumulación de las proteínas que conforman a la matriz extracelular. Los fibroblastos, en especial, el fenotipo diferenciado denominado miofibroblasto, es responsable de este desequilibrio en la remodelación cardiaca.

Los fibroblastos producen dos tipos de fibrosis, una reactiva y una reparativa. La fibrosis reparativa mantiene la integridad estructural después de la muerte de los cardiomiocitos, cubriendo el espacio dejado por estos, mientras que la fibrosis reactiva es una respuesta a la sobrecarga o la inflamación y provoca la expansión de la matriz extracelular entre el músculo (MacLean & Pasumarthi, 2014; Yue, Xie, & Nattel, 2010). Figura 2.

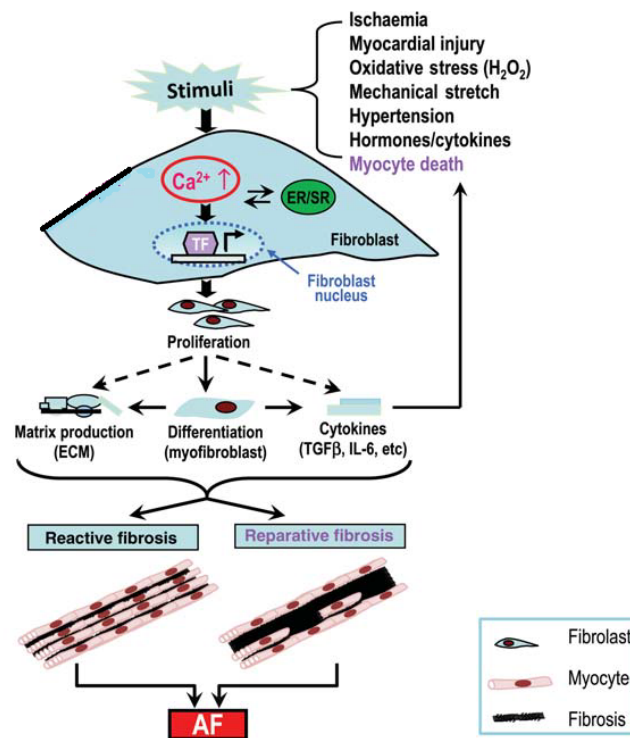


Figura 2. Diagrama esquemático de la fibrogénesis cardiaca. En respuesta a una variedad de estímulos, los fibroblastos cardíacos proliferan, se diferencian, sintetizan las proteínas de la matriz extracelular y producen citoquinas inflamatorias que a su vez retroalimentan de manera positiva al sistema regenerando el proceso de fibrogénesis. La acumulación de matriz extracelular causa la

fibrosis cardíaca que puede ser reparativa o bien reactiva. Tomado y modificado de (Yue, Xie, & Nattel, 2011).

En general, la fibrosis en el miocardio es generada por uno o varios de los siguientes factores: una perfusión anormal el tejido cardiaco, aumento del volumen y presión de las cavidades del corazón y una predisposición genética. Estos factores inician vías de señalización comandadas por las catecolaminas, la aldosterona, los péptidos natriuréticos y el sistema renina-angiotensina que activan a enzimas como la colagenasa, la elastasa o las metaloproteasas que inician el proceso de remodelación cardiaca, generando la fibrosis. La fibrosis favorece a la disfunción tanto sistólica como diastólica y a la aparición de arritmias; esto es debido al incremento de la rigidez del tejido, desacoplamiento contráctil, una perfusión alterada y un desacoplamiento eléctrico que conllevan a una insuficiencia cardiaca y eventos cardiacos adversos provocando la muerte del individuo (Broberg & Burchill, 2015; López Salazar et al., 2006; Salazar, Miqueo, López, Iraola, & Martínez, 2006)Figura 3.

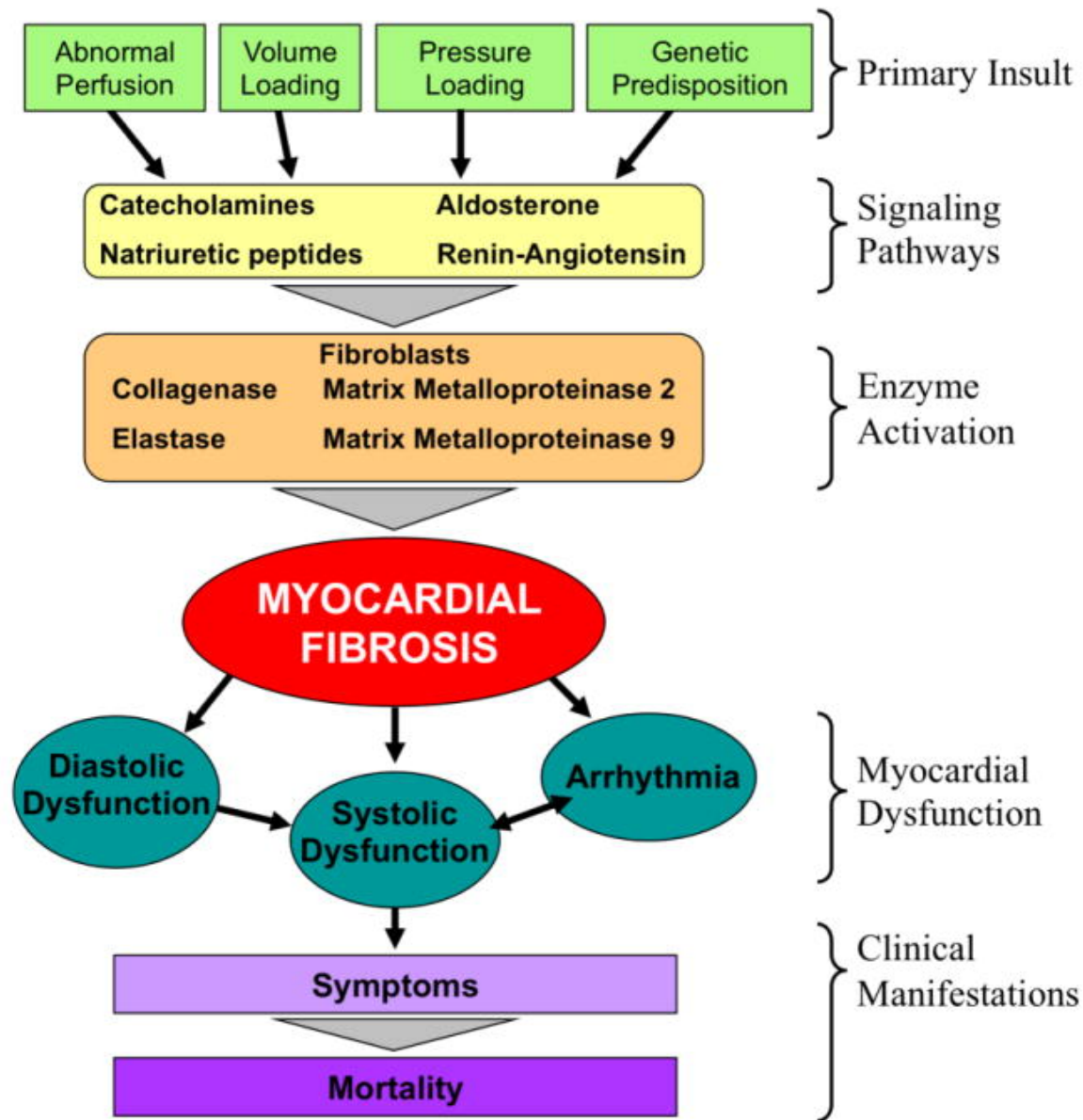


Figura 3. Esquema simplificado de la insuficiencia cardiaca. La fibrosis miocárdica es generada por la actividad de algunas enzimas como la colagenasa, la elastasa y las metaloproteinasas 2 y 9 que degradan a la matriz extracelular y permiten una mayor migración de los fibroblastos cardiacos los cuales secretan una cantidad anormal de proteínas que generan una disfunción en el miocardio, desarrollando de esta manera, diferentes manifestaciones clínicas que terminan en la muerte (Broberg & Burchill, 2015).

Diversas señales moleculares son generadas por los fibroblastos, los cardiomiocitos o también aquellas que intervienen en el proceso de reparación como los macrófagos o monocitos, para activar vías que desencadenan el proceso de la fibrosis cardiaca. (Kong, Christia, & Frangogiannis, 2014;

Macleán & Pasumarthi, 2014). En la siguiente tabla se resumen a los factores más importantes que promueven a la fibrosis cardiaca.

Tabla 1. Factores promotores de la fibrosis cardiaca.  
Modificado de (Segura et al., 2014)

Factor regulador	Contribución
TGF-β1	Deposición de colágeno
	Diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto
	Aumento de la síntesis de las proteínas de la ECM.
	Inhibición de la actividad proteasa degradadora de la ECM.
	Síntesis de colágeno
RAAS-Ang II	Hipertrofia y fibrosis.
	Expresión de TGF-β1
	Proliferación de los fibroblastos
	Síntesis de colágeno
	Aumento de la síntesis de las proteínas de la ECM.
MMPs	Degradación y remodelación de ECM.
TNF-α	Regulación de las MMPs
	Activación de los genes de MMPs

### El Ca<sup>2+</sup> y su papel en la fibrosis cardiaca.

El Ca<sup>2+</sup> es un ion al cual, en las últimas décadas, se le ha dado un papel importante como segundo mensajero puesto que interviene como transductor de señales en procesos tan variados como la excitabilidad, exocitosis, motilidad, apoptosis o transcripción de proteínas. La diferencia de concentración del Ca<sup>2+</sup> entre el interior (100nm) y el exterior (1-2mM) es grande, de 10,000 a 20,000 veces mayor en el exterior que en el interior por lo cual se requiere de sistemas eficaces para mantener el equilibrio de este ion. Con respecto a su papel en el desarrollo de la fibrosis cardiaca, se ha demostrado que tiene capacidad para modular la expresión de proteínas que componen a la matriz extracelular. En un estudio in vivo, el mibefradil, un bloqueador mixto de canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L y T redujo la producción de colágeno así como la diferenciación de fibroblastos en las ratas que



recibieron angiotensina II (Ang II) o aldosterona (Ramires, Sun, & Weber, 1998). En otros trabajos, se ha visto que la proliferación inducida por Ang II se ve reducida por la quelación del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en conjunto con una disminución de la actividad de la PKC (Olson, Shamhart, Naugle, & Meszaros, 2008) aunque también se ha visto que solo la quelación externa de  $\text{Ca}^{2+}$  por EGTA impide la proliferación inducida por sustancia P de los fibroblastos cardiacos de la rata (Kumaran & Shivakumar, 2002).

En otro estudio se observó que la Ang II puede incrementar la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en el fibroblasto cardiaco siendo relevante esto en el desarrollo de la fibrosis cardiaca ya que la Ang II está involucrada en muchos procesos de esta patología como lo es la síntesis de proteínas, la proliferación de los fibroblastos y la expresión de otras moléculas profibróticas como el TGF- $\beta$ 1 (Dobaczewski, Chen, & Frangogiannis, 2012; Villarreal, Kim, Ungab, Printz, & Dillman, 1993).

También se ha visto involucrados los sistemas que regulan las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  como lo es el caso del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  (NCX). Usando KB-R7943 como bloqueador de NCX se vio disminuida la movilidad, contracción y proliferación de los miofibroblastos cardiacos (Raizman et al., 2007).

### **Mecanismos de regulación del $\text{Ca}^{2+}$ en el fibroblasto.**

Existen diversas proteínas tanto en la membrana externa de la célula como en las membranas internas que funcionan como bombas, canales e intercambiadores para el  $\text{Ca}^{2+}$  sin contar a las proteínas que se encuentran en el citosol funcionando como buffer para el  $\text{Ca}^{2+}$  como la calmodulina. Como se mencionó antes, es de vital importancia mantener la homeostasis del ion debido a que este juega un papel importante en todos los procesos fisiológicos de la célula, homeostasis que se logra por la presencia de estas proteínas. Debido al papel que juega el  $\text{Ca}^{2+}$  en el proceso de contracción muscular, existen muchos estudios que abordan como es que se regula este ion en el cardiomiocito, célula efectora del proceso de contracción, sin embargo, no existen muchos trabajos que aborden a los sistemas que regulan al  $\text{Ca}^{2+}$  en el fibroblasto cardiaco. Chen y col. en el 2009 usaron a una línea celular de fibroblastos cardiacos auriculares para su estudio sobre los mecanismos de regulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en estas células, describiendo a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, los receptores a  $\text{IP}_3$  y los canales operados por las reservas de  $\text{Ca}^{2+}$  internas (SOC, por su siglas en inglés: Store Operated Channels) como los mecanismos que generan un incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula, mientras

que los mecanismos que se encargan de la remoción del  $\text{Ca}^{2+}$  involucran a la bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA), la bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo sarco/endoplásmico (SERCA) y NCX (Chen et al., 2009).

## **Pirfenidona.**

La pirfenidona (5-metil-1-fenil-2(1H)-piridona) es una droga sintética aprobada en varios países para el tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática. Inicialmente el interés por esta droga fue por su efecto antiinflamatorio, sin embargo, su importante efecto antifibrótico redefinió los intereses por este compuesto (Avila, Osornio-Garduño, Ríos-Pérez, & Ramos-Mondragón, 2014; Fisher et al., 2017; Kim & Keating, 2015; Schaefer, Ruhrmund, Pan, Seiwert, & Kossen, 2011). Diversos estudios como los de han demostrado que la pirfenidona puede tener un efecto potencial en el tratamiento de la fibrosis en diferentes órganos como lo puede ser la fibrosis renal, hepática y pulmonar (Cho & Kopp, 2010; Kakugawa et al., 2004; Komiya et al., 2017). Específicamente en el corazón, en un estudio se observó que la pirfenidona reduce la fibrosis auricular izquierda inducida por la insuficiencia cardíaca congestiva y la susceptibilidad a desarrollar fibrilación auricular (Lee et al., 2006). En otro estudio, se evaluó la capacidad de la pirfenidona para limitar la fibrosis posterior a un infarto de miocardio en un modelo de rata con reperfusión posterior a la isquemia. El tratamiento con pirfenidona se inició 1 semana después de la reperfusión isquémica y continuó durante 4 semanas. Esto resultó en una reducción del porcentaje del área de infarto en los tejidos adyacentes. Este resultado se asoció con una preservación de la función cardíaca (fracción de eyección ventricular izquierda) y una reducción en la susceptibilidad a las arritmias ventriculares (Nguyen, Ding, Wilson, Marcus, & Olgin, 2010). Con relación al  $\text{Ca}^{2+}$ , en un estudio hecho en cardiomiocitos adultos de la rata, se encontró que la pirfenidona aumenta la conductancia de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L en el cardiomiocitos sin afectar su expresión (Ramos-Mondragón et al., 2012).

Su efecto antifibrótico parece estar dado por una disminución de la expresión de TGF- $\beta$ 1, la más prominente citoquina profibrótica, sin embargo, la vía exacta aún no está esclarecida, por lo cual resulta relevante saber cómo es que lo logra, lo cual nos lleva a hacer esta investigación.

## JUSTIFICACIÓN

La fibrosis cardiaca es una complicación de numerosas patologías cardiacas. Se ha demostrado que la fibrosis intersticial y perivascular provoca una disfunción sistólica y diastólica, además de que puede estar implicada en la generación de arritmias (Salazar et al., 2006). Estas disfunciones miocárdicas pueden generar diversas manifestaciones clínicas que en el último de los casos provocarían la muerte del individuo. El  $\text{Ca}^{2+}$  ocupa un papel determinante en la generación de la fibrosis cardiaca. Los estudios demuestran que la proliferación, diferenciación, migración y secreción de proteínas por parte del fibroblasto cardiaco son mediadas por el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Se ha observado en modelos “in vitro” que el bloqueo de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L disminuye la producción de colágeno y la diferenciación mientras que el bloqueo de los extrusores del  $\text{Ca}^{2+}$  como el NCX inhiben la proliferación, la migración y la contracción de proteínas (Dobaczewski et al., 2012; Kumaran & Shivakumar, 2002; Olson et al., 2008; Raizman et al., 2007; Ramirez et al., 1998; Villarreal et al., 1993).

La pirfenidona es un fármaco antifibrótico usado el tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática, sin embargo, en ensayos experimentales, también se ha demostrado su potencial terapéutico para el tratamiento de la fibrosis en diversos órganos dentro de los que se incluye al corazón. Se sabe que es capaz de inhibir la expresión de varias citocinas inflamatorias como la IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , interferon- $\gamma$ , al TGF- $\beta$ 1 y puede eliminar especies de oxígeno reactivas en cultivos de fibroblastos de corazón y pulmón de rata. También ha demostrado potenciar la actividad de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L de los cardiomiocitos (Avila et al., 2014; Ramos-Mondragón et al., 2012).

Tomando en cuenta estos datos, es evidente el protagonismo del  $\text{Ca}^{2+}$  en la fibrosis cardiaca y el potencial antifibrótico de la pirfenidona en el corazón, por esta razón, en este trabajo queremos determinar si los mecanismos regulación del calcio intracelular en los fibroblastos cardiacos pueden ser modulados por la presencia de la pirfenidona.

## HIPÓTESIS

La pirfenidona modula los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  en los fibroblastos cardiacos.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

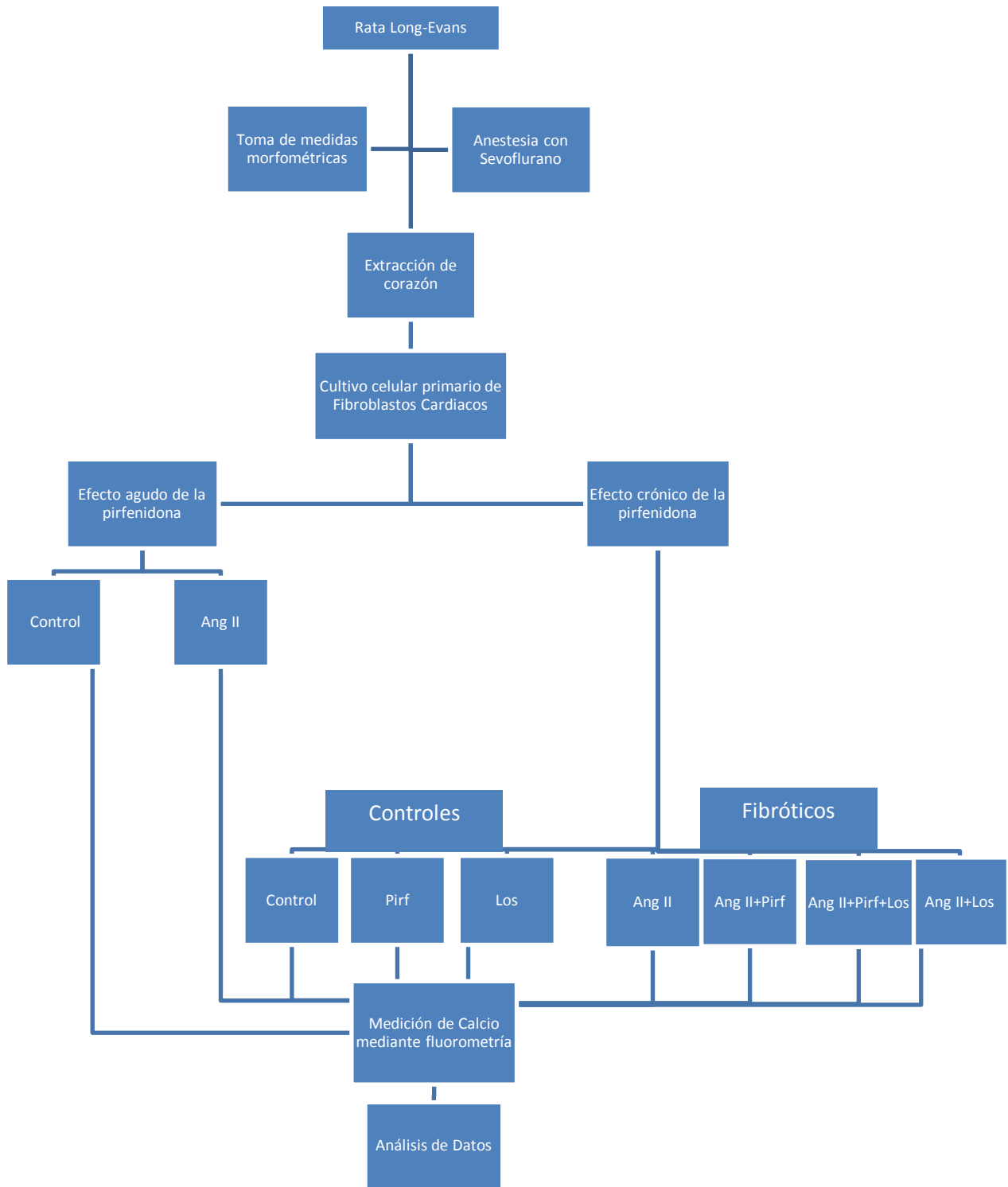
Determinar el efecto de la pirfenidona sobre los mecanismos de regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico del fibroblasto cardiaco en un modelo de fibrosis "in vitro".

### Objetivos Particulares

1. Generar un modelo de fibrosis "in vitro".
2. Caracterizar los mecanismos de regulación de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en los fibroblastos cardiacos en el grupo control y con fibrosis
  - a. Identificar los mecanismos que generan aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico.
    - i. Determinar la SOCE mediante el vaciamiento pasivo del retículo endoplásmico al bloquear la actividad de la SERCA.
    - ii. Determinar la liberación de calcio del RE por la activación de los receptores de IP3 mediante la estimulación con Ang II.
  - b. Identificar los mecanismos de remoción de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico.
    - i. Bloquear la actividad de SERCA y PMCA para determinar la participación del NCX en la extrusión del calcio citosólico.
    - ii. Bloquear la actividad de SERCA y NCX para determinar la participación de PMCA en la extrusión del calcio citosólico.
3. Evaluar el efecto de la pirfenidona sobre los mecanismos de regulación de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en los fibroblastos cardiacos
  - a. Caracterizar el efecto agudo que tiene la aplicación de pirfenidona sobre los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  en los fibroblastos cardiacos provenientes de la cepa Long-Evans en el grupo control y con fibrosis.
  - b. Caracterizar el efecto de la pirfenidona sobre los mecanismos que aumentan el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en los fibroblastos cardiacos en el grupo control y con fibrosis.

- i. Determinar la SOCE mediante el vaciamiento pasivo del retículo endoplásmico al bloquear la actividad de la SERCA.
  - ii. Determinar la liberación de calcio del RE por la activación de los receptores de IP3 mediante la estimulación con Ang II.
  
- c. Caracterizar el efecto de la pirfenidona sobre los mecanismos de remoción del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en los fibroblastos cardiacos en el grupo control y con fibrosis.
  - i. Bloquear la actividad de SERCA y PMCA para determinar la participación del NCX en la extrusión del calcio citosólico.
  - ii. Bloquear la actividad de SERCA y NCX para determinar la participación de PMCA en la extrusión del calcio citosólico.

# DIAGRAMA DE TRABAJO



## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **Animales**

Se utilizaron ratas Long-Evans macho de 13 a 14 semanas de edad con un peso entre 250 y 300 gramos. Los animales fueron obtenidos del bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. El cuidado, manejo y uso de los animales fue de acuerdo con la NORMA oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999.

### **Cultivo de fibroblastos cardiacos**

Para el cultivo, cada rata se anestesió con sevoflurano para la extracción del corazón. Una vez extraído, el corazón fue perfundido en un sistema de Langendorff con solución tirode normal para remover la sangre del órgano; mientras tanto, se retiraron los pulmones y el tejido conectivo circundante del corazón. Luego se colocó al corazón en solución tirode sin  $\text{Ca}^{2+}$  y se lavó 4 veces con solución tirode libre de  $\text{Ca}^{2+}$  en condiciones de esterilidad para luego retirar las aurículas y cortar en trozos de aproximadamente  $1 \text{ mm}^3$  los ventrículos cardiacos. La suspensión celular que se obtuvo fue incubada a  $37^\circ\text{C}$  en solución de tirode suplementada con colagenasa (1mg/ml) y proteasa (0.1mg/ml). A los 35 minutos de incubación en agitación constante es donde se obtiene la mayor cantidad posible de fibroblastos y en ese momento se detuvo la acción enzimática agregando suero fetal bovino a una concentración final de 10%. Posteriormente el sobrenadante fue recuperado y centrifugado a 400 G durante 10 minutos. El sobrenadante fue eliminado y la pastilla de células fue resuspendida en 8ml de DMEM, suplementado con suero al 10% para luego ser sembrado en 4 cajas Petri de 35mm. Después de 3 horas se cambió el medio de cultivo para eliminar a las células que no se adhirieron al fondo de la caja petri. Las células se mantuvieron en DMEM-FBS 10% a  $36^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  5% hasta el momento de su uso.

### **Tratamientos.**

Una vez que el cultivo primario alcanzó el 100% de confluencia, los fibroblastos fueron resembrados en cajas petri con fondo de vidrio de un grosor de 0.18mm y con un área de cultivo de  $0.81\text{cm}^2$  a una densidad de 20,000 células/ $\text{cm}^2$ . Un día después, el cultivo se mantuvo en medio libre de suero por 24 horas para homogenizar la fase celular y posteriormente se trataron a los fibroblastos con los respectivos fármacos de cada grupo como se describe a continuación.

### **Tratamiento con Angiotensina II**

Para tratar a los fibroblastos cardiacos con Angiotensina II, se usó DMEM-FBS 10% y A/A al 1% con una concentración de Angiotensina II al 100nm por 48 horas para inducir la condición de fibrosis (Neub, et.al, 1994; Cheng-Chin, et.al, 2004).

### **Tratamiento con Pirfenidona**

Las células tratadas con pirfenidona fueron puestas bajo la acción de este fármaco en DMEM-FBS 10% y A/A al 1% a una concentración de 300µM por 48 horas para estudiar los efectos que tiene sobre los mecanismos de regulación del Ca<sup>2+</sup> citosólico del fibroblasto cardiaco basados en las dosis recomendadas por la FDA y diversos estudios que usan a la pirfenidona (Takashi, et.al., 2014; Hilberg, et.al., 2007; Rubino, et.al., 2009).

### **Tratamiento con Losartán.**

El losartán es un medicamento usado para el tratamiento de la fibrosis cardiaca por lo cual se usó como control positivo. Las células fueron tratadas con losartán en DMEM-FBS 10% y A/A al 1% a una concentración de 1mM por 48 horas (Buford, et.al., 2007)

### **Tratamiento con Angiotensina II y Pirfenidona.**

Para ver el efecto que tiene la pirfenidona en los fibroblastos cardiacos en estado de fibrosis, se trataron a las células con Angiotensina II al 100nM y Pirfenidona al 300nM en DMEM-FBS 10% y A/A al 1%. (Neub, et.al, 1994; Cheng-Chin, et.al, 2004; Takashi, et.al., 2014; Hilberg, et.al., 2007; Rubino, et.al., 2009).

### **Tratamiento con Angiotensina II y Losartán.**

Para comparar el efecto que tiene la pirfenidona en los fibroblastos cardiacos en estado de fibrosis con el efecto que tiene el losartán sobre estas mismas células, los fibroblastos cardiacos fueron tratados con Angiotensina II al 100nM y losartán al 1mM por 48 horas. (Neub, et.al, 1994; Cheng-Chin, et.al, 2004; Buford, et.al., 2007).

### **Tratamiento con Angiotensina II, Pirfenidona y Losartán.**

Para determinar si hay un efecto potenciado por el uso de ambos fármacos en los fibroblastos cardiacos en estado de fibrosis se usó Angiotensina II al 100nM, Pirfenidona al 300µM y losartán al 1mM en DMEM-FBS 10% y A/A al 1% por 48 horas. (Neub, et.al, 1994; Cheng-Chin, et.al, 2004; Takashi, et.al., 2014; Hilberg, et.al., 2007; Rubino, et.al., 2009; Buford, et.al., 2007).



### Medición de la concentración intracelular del $\text{Ca}^{2+}$ .

Las células tratadas fueron lavadas con PBS estéril y luego cargadas con Fluo 4 AM a una concentración de  $2\mu\text{M}$  durante 90 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Después del tiempo de incubación, los fibroblastos cardiacos fueron mantenidos en solución extracelular normal en un incubador húmedo hasta el momento de su uso. La medición se hizo con el microscopio invertido Nikon Eclipse-TiU y con el equipo de medición de  $\text{Ca}^{2+}$  PTI Delta Ram 814- Photon Technology el cual emite un haz de luz con una longitud de onda de  $480\text{nm}$ , misma que excita al Fluo 4 AM acoplado al  $\text{Ca}^{2+}$  y que al ser estimulado, emite un haz de luz con una longitud de onda de  $510\text{nm}$ . El equipo capta y transforma las señales luminosas a eléctricas que, traducidas por un convertidor análogo-digital, se convierten en señales digitales que forman a las imágenes captadas por el microscopio.

### Inmunofluorescencia

Para determinar el cambio de fenotipo en los fibroblastos se analizó la expresión de la  $\alpha$ -SMA, una proteína que, de acuerdo a la literatura, puede ser usada como marcador de fibrosis (Ramires, Sun, & Weber, 1998; Yu et al., 2014). Inicialmente, habíamos considerado utilizar la técnica de RT-PCR para determinar los cambios en los niveles de expresión del mensajero que codificaba tanto para la  $\alpha$ -SMA como para el colágeno, sin embargo, decidimos usar la inmunofluorescencia ya que esta nos permite analizar los cambios en la expresión final de la proteína, además de corroborar su organización en fibras de estrés. Para esto se sembraron fibroblastos cardiacos obtenidos de los cultivos primarios en cubreobjetos previamente tratados con gelatina al 2%. Posteriormente, se realizó el tratamiento correspondiente a los fibroblastos cardiacos con Ang II de la misma manera que con los fibroblastos usados en el registro de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  con microfluorescencia. Una vez hecho esto, las células se fijaron con Metanol/Acetona 50/50 por 5 minutos a  $-20^\circ\text{C}$ . Posteriormente se lavó 3 veces cada cubreobjeto con PBS frio cada 5 minutos. Luego, los cubreobjetos con los fibroblastos fueron incubados en BSA al 1% por 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente fueron incubados con el anticuerpo de  $\alpha$ -SMA policlonal de conejo (1:100) en BSA al 1% por 1 hora a temperatura ambiente. Pasado esto, se lavaron los cubreobjetos 3 veces con PBS cada 5 minutos y en seguida, se incubaron nuevamente a los cubreobjetos con el anticuerpo secundario Anti-conejo asociado a Alexa-Fluor 488 (1:200). Después se lavaron nuevamente a los cubreobjetos con PBS 3 veces cada 5 minutos y se tiñeron y montaron en portaobjetos. Los núcleos celulares fueron contrateñidos con DAPI.

## Soluciones

Para la disección del corazón se empleó solución tirode con NaCl 140mM, KCl 5.4mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1mM, HEPES 10mM, Glucosa 10mM y CaCl<sub>2</sub> 1.8mM en agua desionizada ajustado a un pH de 7.38. Esta misma solución pero sin CaCl<sub>2</sub> 1.8mM se empleó para hacer la digestión enzimática.

Para llevar a cabo los protocolos de medición del Ca<sup>2+</sup> se usó SEN con NaCl 136mM, KCl 4mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, HEPES 10mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8mM y glucosa 11mM en agua desionizada ajustado a un pH de 7.4 y en el caso de los protocolos donde se requería SEN sin Ca<sup>2+</sup> se agregó EGTA 0.5mM si suplementar con CaCl<sub>2</sub>.

## Análisis estadístico.

Los resultados son presentados mediante el valor de la media ± error estándar de la media. Para comprobar la existencia de diferencias entre dos grupos se realizó la prueba T de Student no pareada. Para comprobar la existencia de diferencias de dos grupos con respecto a un control se usó un ANOVA. Se consideró una diferencia significativa cuando el valor de p < 0.05. En los gráficos se denota el número de animales utilizados como "N" y el número de células registradas como "n". El software Imagemaster, Image J y GraphPad se usaron para el análisis de los datos.

## RESULTADOS.

Para determinar si el tratamiento con Ang II 100nM producía la diferenciación del fibroblasto hacia miofibroblasto, fenotipo fibrótico del fibroblasto, usamos la técnica de inmunofluorescencia para evaluar cualitativamente la presencia de  $\alpha$ -SMA, proteína usada como marcador fibrótico. En la siguiente figura se puede observar la presencia de las fibras de  $\alpha$ -SMA en las células tratadas con Ang II a diferencia de los fibroblastos control donde no existe presencia de estas fibras.

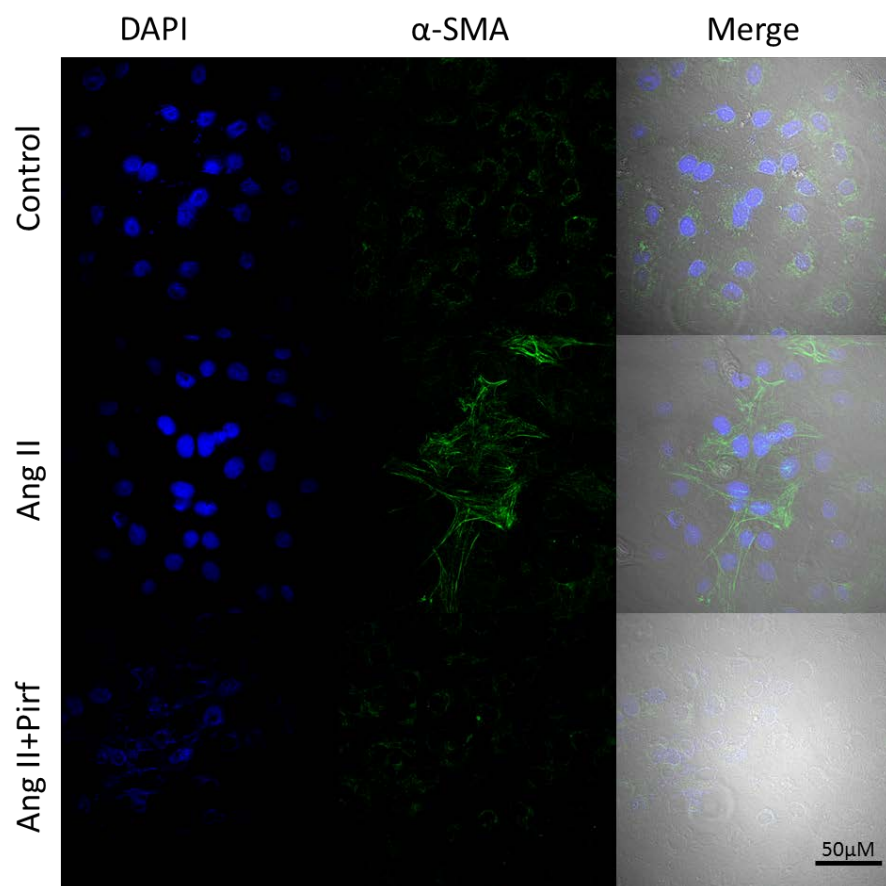


Figura 4.  $\alpha$ -SMA evaluada por inmunofluorescencia. En los fibroblastos cardiacos control (paneles superiores) se puede observar una inmunoreactividad inespecífica para la  $\alpha$ -SMA (color verde alrededor de los núcleos teñidos en color azul). En los fibroblastos cardiacos tratados con Ang II 100nM (paneles intermedios) se hace evidente la presencia de las fibras de estrés de  $\alpha$ -SMA. En los fibroblastos cardiacos tratados con Ang II 100nM y Pirfenidona 300 $\mu$ M (paneles inferiores) se observa nuevamente la ausencia de  $\alpha$ -SMA.

## Efecto agudo de la pirfenidona sobre los niveles intracelulares de $\text{Ca}^{2+}$ de los fibroblastos cardiacos.

Para averiguar si la pirfenidona tenía un efecto inmediato sobre los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , aplicamos el fármaco de manera aguda en los fibroblastos del grupo control y del grupo fibrótico. El protocolo consistió en aplicar después de un periodo de registro basal en solución extracelular normal (SEN), el fármaco durante 300 segundos y luego lavar. Las concentraciones usadas de pirfenidona fueron:  $0.3\mu\text{M}$ ,  $1\mu\text{M}$ ,  $3\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ,  $30\mu\text{M}$ ,  $100\mu\text{M}$  y  $300\mu\text{M}$  (Takashi,2010; Hilberg et.al., 2012; Rubino et.al., 2009, Hilberg et.al., 2007).

En los siguientes gráficos se puede observar que las diferentes concentraciones de pirfenidona aplicadas de manera aguda no afectan los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  en los fibroblastos cardiacos de la condición control (Figura 5).

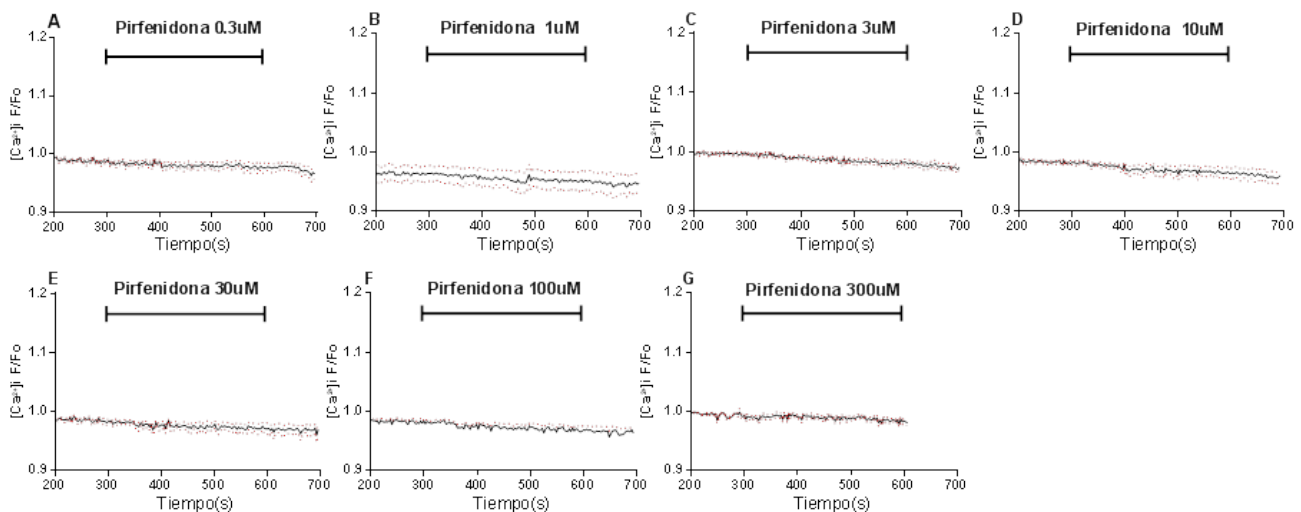


Figura 5. Efecto agudo de la pirfenidona en fibroblastos cardiacos del grupo control. Se muestra el promedio de los trazos obtenidos por el efecto agudo de la pirfenidona a  $0.3\mu\text{M}$  (A),  $1\mu\text{M}$  (B),  $3\mu\text{M}$  (C),  $10\mu\text{M}$  (D),  $30\mu\text{M}$  (E),  $100\mu\text{M}$  (F) y  $300\mu\text{M}$  (G). La aplicación del fármaco no indujo cambios en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en ninguna de las condiciones experimentales probadas.  $N=3$ ,  $n=11$ .

En los cultivos de fibroblastos que fueron tratados durante 48 horas con Ang II para inducir la fibrosis se realizó también la aplicación aguda de pirfenidona y podemos observar en los gráficos de la figura 6 que en estas condiciones el fármaco tampoco afecto los niveles basales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Figura 6).

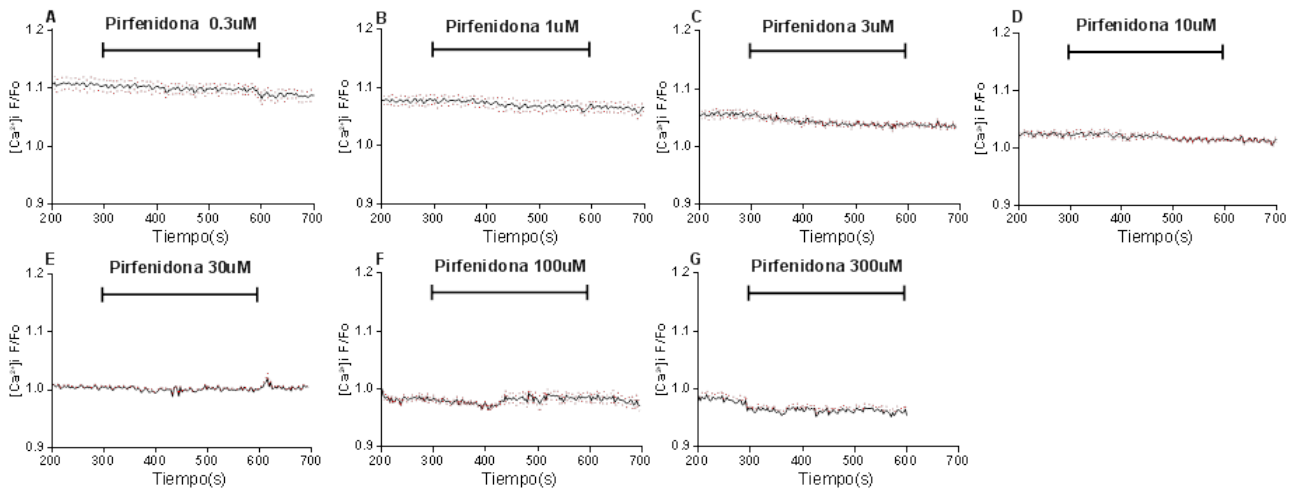


Figura 6. Efecto agudo de la pirfenidona en fibroblastos cardiacos tratados con Ang II. Se muestra el promedio de los trazos obtenidos por el efecto agudo de la pirfenidona a 0.3 $\mu\text{M}$  (A), 1 $\mu\text{M}$  (B), 3 $\mu\text{M}$  (C), 10 $\mu\text{M}$  (D), 30 $\mu\text{M}$  (E), 100 $\mu\text{M}$  (F) y 300 $\mu\text{M}$  (G). La aplicación de pirfenidona no cambi6 la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  citos6lico. N=3, n=7.

## **Efecto crónico de la pirfenidona en los mecanismos de regulación de calcio de los fibroblastos cardiacos.**

Los mecanismos de regulación del calcio en los fibroblastos cardiacos han sido poco estudiados, sin embargo, existen trabajos que describen a los principales actores en este proceso homeostático. Chen et.al. propone como principales mecanismos que generan un aumento en la concentración del calcio citosólico en los fibroblastos cardiacos a los receptores de IP3 mientras como principales mecanismos de eliminación del calcio citosólico propone a la SERCA, PMCA y NCX.

En este proyecto, nuestro interés es determinar si el tratamiento crónico con pirfenidona es capaz de alterar el funcionamiento de estos mecanismos de regulación del calcio como una posible explicación por la cual la droga ejerce su efecto antifibrótico. Los protocolos usados así como los resultados obtenidos son mencionados a continuación.

### Transitorios de calcio inducidos por la fuga de calcio del retículo endoplásmico y por la entrada de calcio operada por los almacenes intracelulares

El protocolo para determinar la capacidad de almacenamiento del retículo endoplásmico y la entrada de calcio operada por los almacenes intracelulares (SOCE por sus siglas en inglés: Store Operated Calcium Entry) fue de la siguiente manera:

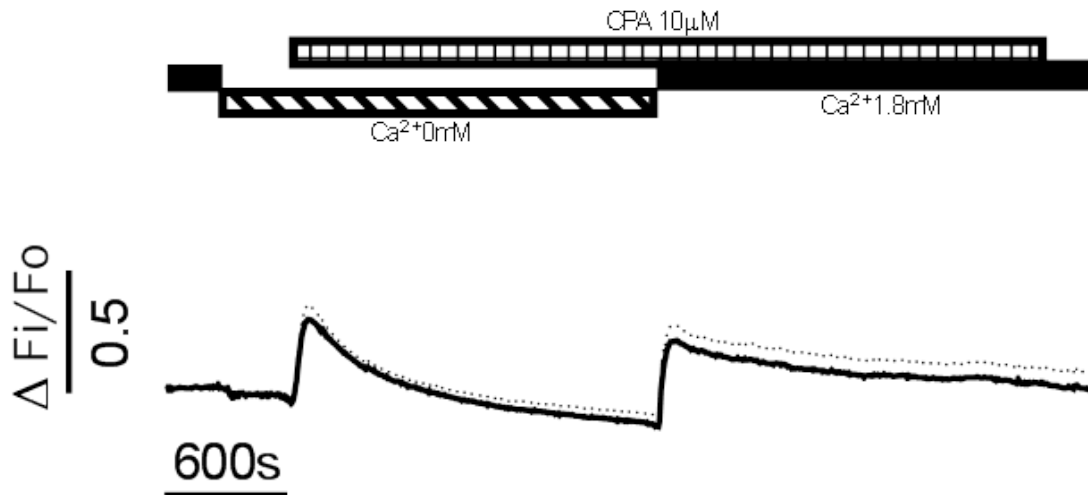


Figura 7. Protocolo CPA 10µM. En el trazo se observan dos picos, el primero corresponde a la fuga de calcio del retículo endoplásmico y el segundo a la entrada de calcio operada por los almacenes intracelulares de calcio.

Se considera al retículo endoplásmico como el principal almacén de calcio. Para determinar si los fibroblastos con los diferentes tratamientos alteraban su capacidad para almacenar dicho ión en el retículo endoplásmico, se utilizó CPA 10 µM por 30 minutos en SEN sin presencia de  $Ca^{2+}$  para lograr una inhibición temporal de la SERCA en los fibroblastos estudiados. El CPA 10 µM impide la recaptura de  $Ca^{2+}$  y al estar en un ambiente sin presencia de  $Ca^{2+}$  extracelular, existe un aumento en la fluorescencia provocado por la liberación de calcio de los almacenes intracelulares hacia el citosol. En el caso de los próximos 30 minutos, las células estudiadas se mantuvieron con CPA 10 µM en SEN con presencia de  $Ca^{2+}$ , donde se registró otro aumento de la fluorescencia debido a SOCE activada por el previo vaciamiento del retículo. Este mecanismo fue estudiado para discernir si los diferentes tratamientos modificaron los parámetros medidos en SOCE. (Chen et al, 2009). En la siguiente figura se puede observar el valor promedio obtenido en los registros con este protocolo.

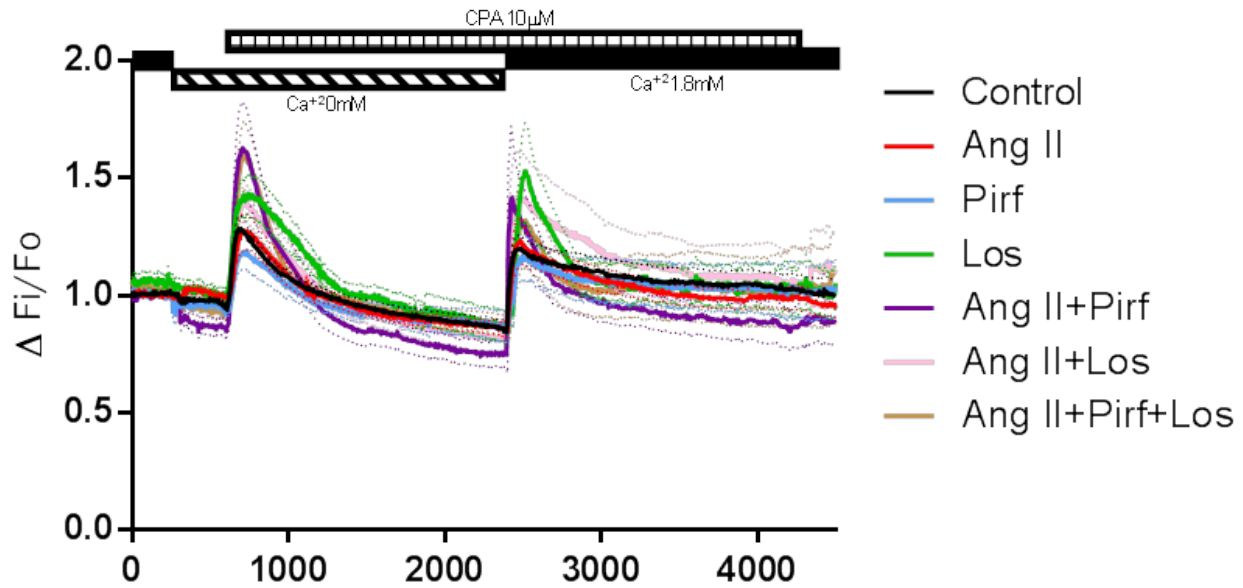


Figura 8. Media de los trazos en el registro de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico obtenida por la fuga del retículo endoplásmico y SOCE en las diferentes condiciones.

Los parámetros analizados en cada uno de los trazos registrados fueron los siguientes:

- Amplitud: informa de la concentración máxima de calcio alcanzada ya sea por la fuga del retículo endoplásmico o por SOCE
- Integral: otorga información sobre la cantidad total de calcio liberado por la fuga del retículo endoplásmico o de la cantidad total de calcio entrante por SOCE
- Tiempo al pico: funciona como un indicador de la velocidad de los mecanismos de fuga de calcio del retículo endoplásmico o de SOCE para llegar a la máxima concentración del ion calcio.
- Tau de decaimiento al 63%: funciona como indicador de la velocidad de los mecanismos de extrusión del calcio citosólico, NCX y PMCA, al 63%.
- Tau de decaimiento al 50%: funciona como indicador de la velocidad de los mecanismos de extrusión del calcio citosólico, NCX y PMCA, al 50%.



*Efecto de la fibrosis sobre la liberación y entrada de calcio.*

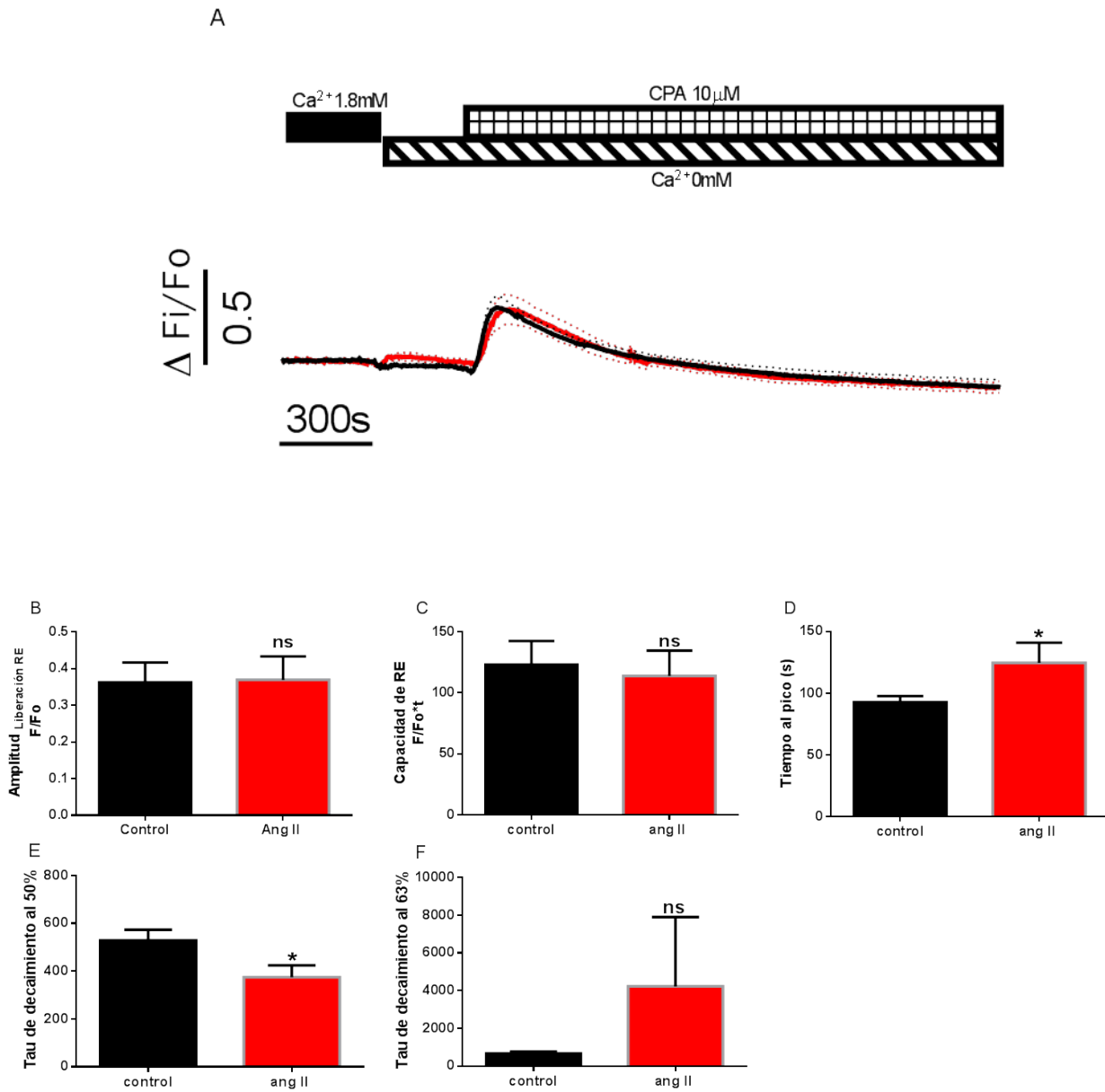


Figura 9.  $\text{Ca}^{2+}$  liberado por la fuga de calcio del retículo en los fibroblastos en condición fibrótica. Existe un aumento de la fluorescencia asociada a un aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico por efecto del bloqueo de SERCA por el CPA (A). Los fibroblastos en condición fibrótica (rojo) requirieron un mayor tiempo para alcanzar la concentración pico de  $\text{Ca}^{2+}$  (D) y un menor tiempo para retornar al estado basal (E). N=4  $n_{\text{control}}=15$   $n_{\text{angII}}=11$ .

Para el caso de los fibroblastos tratados con Ang II 100nM, se puede observar en la imagen A de la Figura 9, un aumento del tiempo requerido para alcanzar la máxima concentración de calcio por la fuga desde el retículo endoplásmico y una disminución del tiempo necesario para alcanzar nuevamente el valor basal de calcio. Esta información pone en evidencia que en los fibroblastos en situación de fibrosis disminuye la velocidad a la que se fuga el calcio del retículo endoplásmico y aumenta la velocidad de extrusión del calcio citosólico ( $p < 0.05$ ). Ver Figura 9, gráficos D y E.

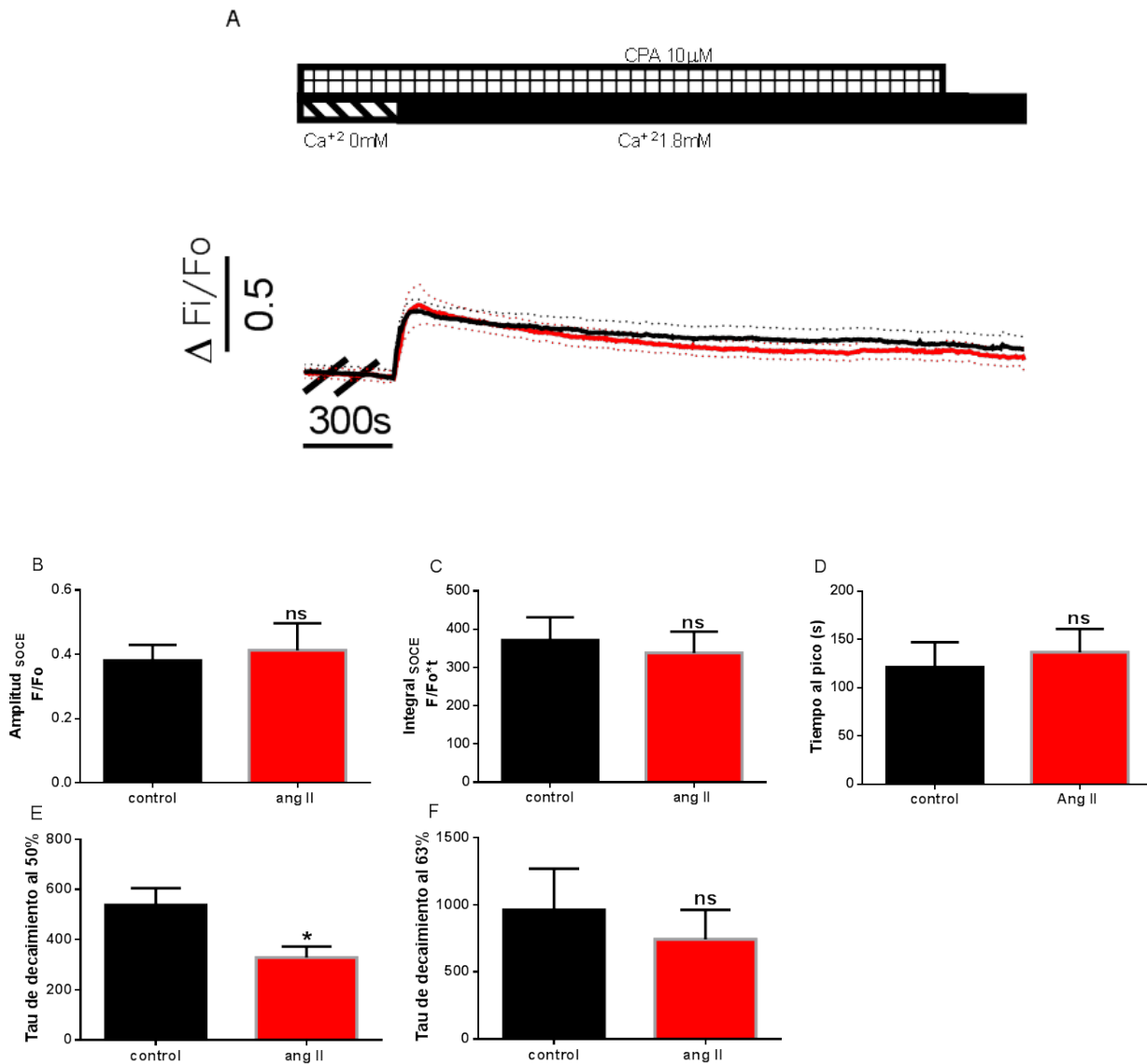


Figura 10. Entrada de calcio en los fibroblastos de la condición fibrótica. No encontramos cambios en la velocidad de entrada del calcio (D), en la concentración máxima de calcio (B) ni en la cantidad total de calcio (C) que entró cuando se activaron los SOC. Solo la velocidad de extrusión de calcio disminuyó en casi un 50% (E).  $N=4$   $n_{control}=15$   $n_{angII}=11$ . \*  $p < 0.05$

Para el caso de SOCE, los fibroblastos en condición de fibrosis únicamente mostraron una mayor velocidad por parte de PMCA y NCX para extruir al calcio citosólico medida al 50% del retorno a la basal; esto puede observarse en la imagen A de la Figura 10 corroborado con el gráfico E con una  $*p < 0.05$ .

*Efecto de la pirfenidona sobre la liberación y entrada de calcio.*

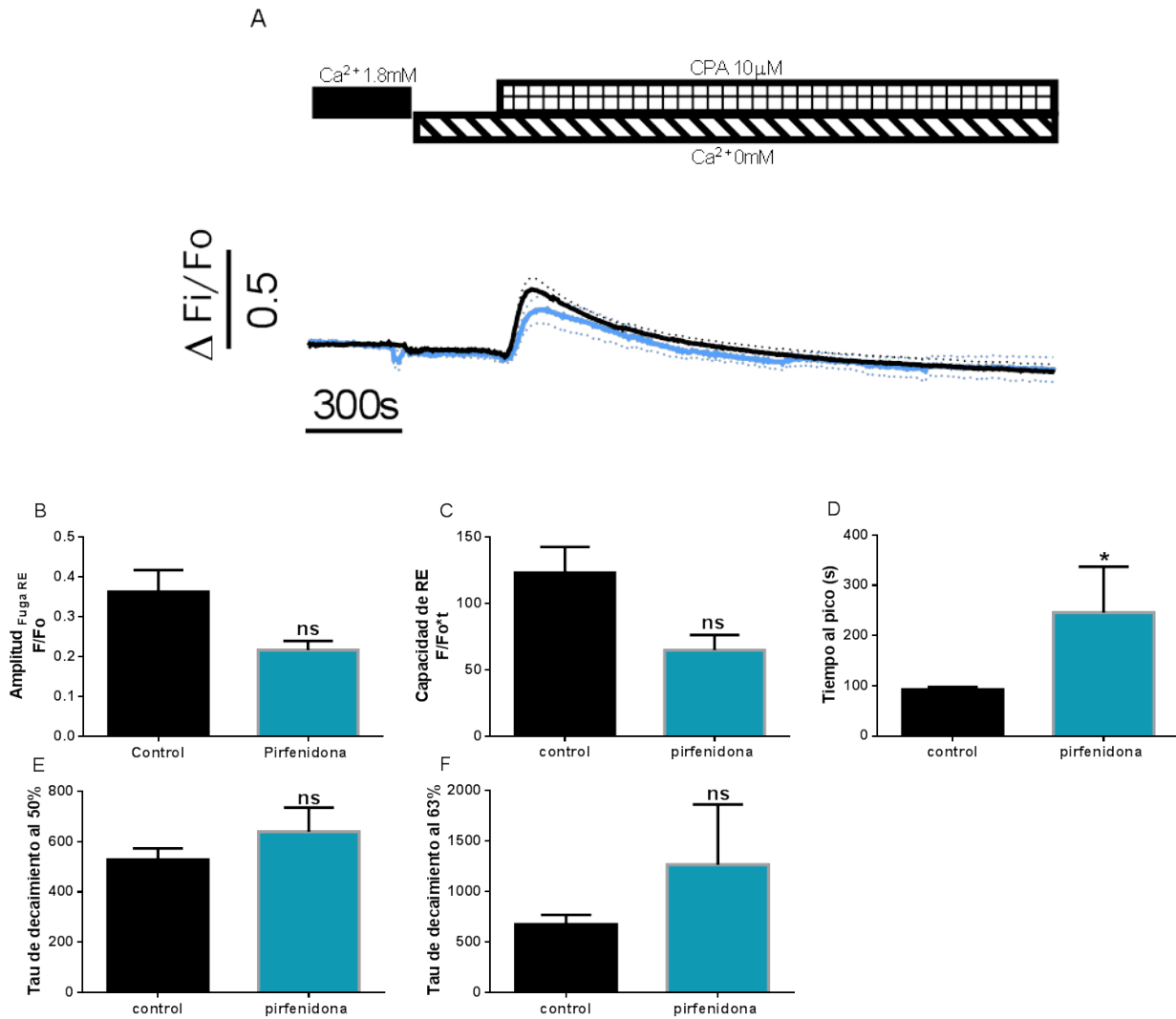


Figura 11. Calcio liberado por la fuga del retículo endoplásmico en los fibroblastos tratados con pirfenidona. Existe un aumento de la fluorescencia asociada a un aumento de la concentración de calcio citosólico por efecto del bloqueo de SERCA por el CPA (A). Los fibroblastos tratados con pirfenidona requirieron un mayor tiempo para alcanzar la concentración máxima de calcio (D).  $N=3$   $n_{control}=15$   $n_{pirf}=7$ .

Para el caso de los fibroblastos del grupo control que fueron tratados con Pirfenidona, podemos observar en la Figura 11A y 11D que el tiempo para alcanzar la concentración máxima de calcio aumento de manera significativa ( $p < 0.05$ ) y que existe una tendencia a disminuir la cantidad de calcio liberado (11B y 11C).

Cuando analizamos el efecto de la pirfenidona sobre la entrada de calcio, no encontramos diferencias significativas ni en la amplitud de la respuesta, el tiempo en llegar a la concentración máxima o en la velocidad de extrusión del calcio.

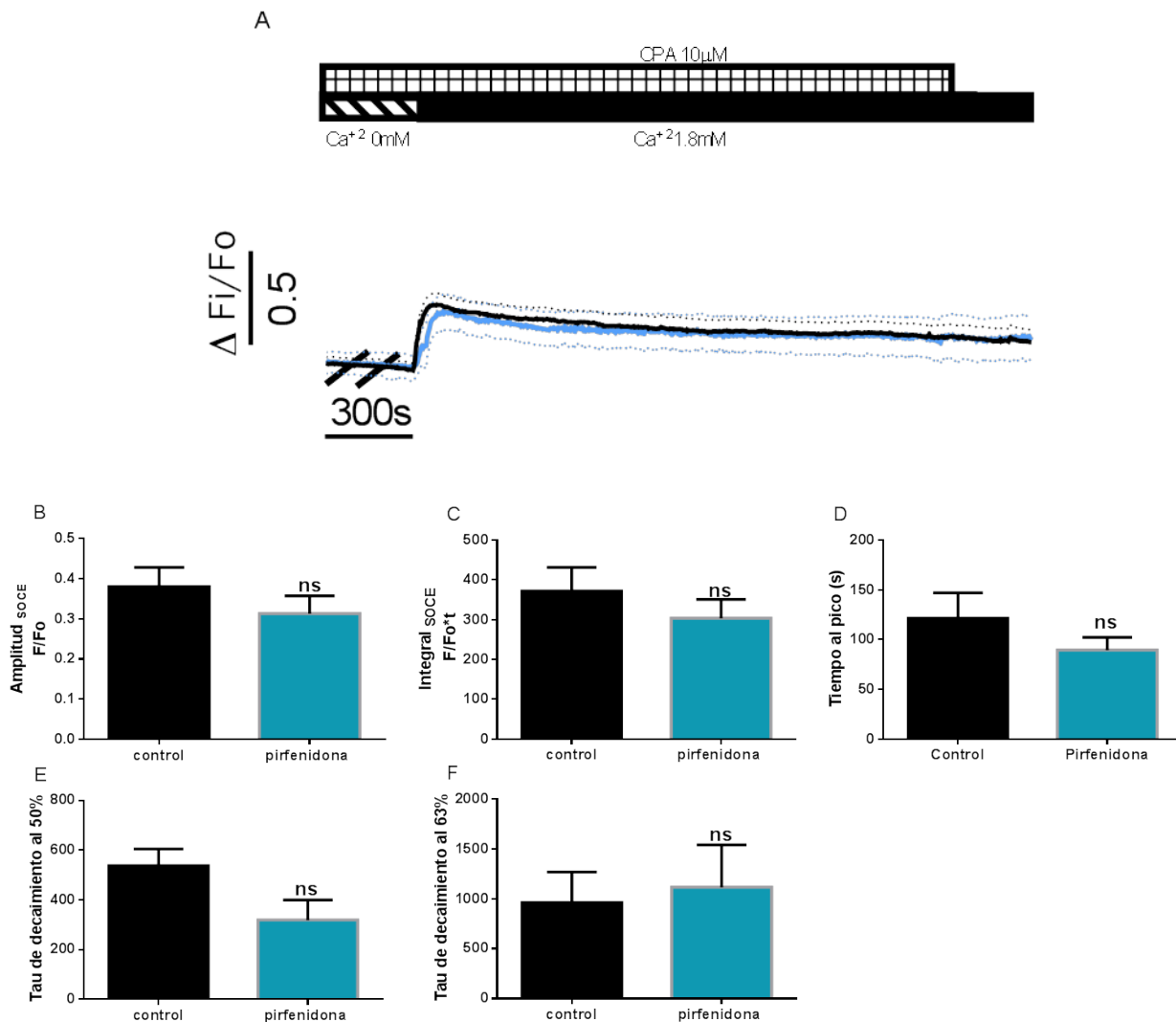


Figura 12. SOCE en los fibroblastos tratados con pirfenidona. Existe un aumento de la fluorescencia asociada a un aumento de la concentración de calcio citosólico por efecto del bloqueo de SERCA por el CPA y a la SOCE (A). No hubo efectos de la pirfenidona sobre los parámetros medidos en SOCE en los fibroblastos. N=3  $n_{control}=15$   $n_{pirf}=7$

**Efecto del losartán sobre la liberación y entrada de calcio.**

A petición del comité tutorial, decidimos incluir un grupo experimental en el cual tratamos a los fibroblastos con losartán, otro antifibrótico antagonista de los receptores de angiotensina AT1. El tratamiento con losartán a la concentración de 1mM tuvo un efecto claro sobre la liberación de calcio del RE y a pesar de que se aprecia un aumento en la cantidad de calcio liberado y en la amplitud de la respuesta, solo la velocidad de liberación fue menor y estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) (Figura 13A-D). No encontramos diferencias significativas en la velocidad de extrusión del ion.

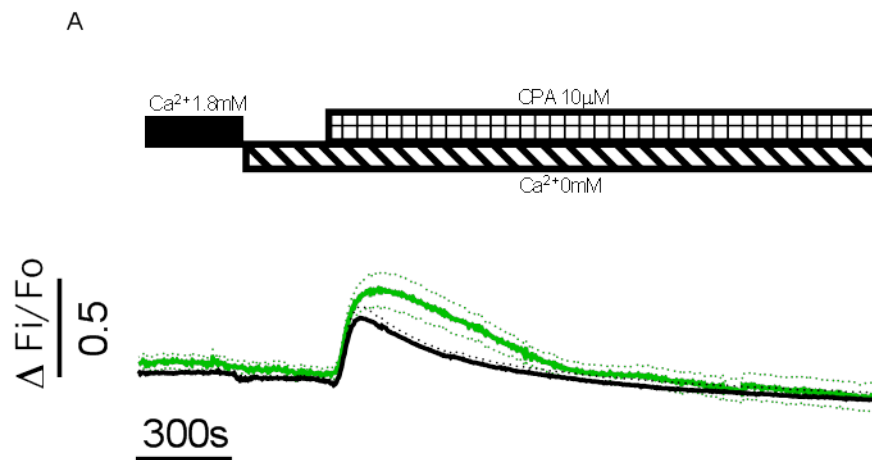
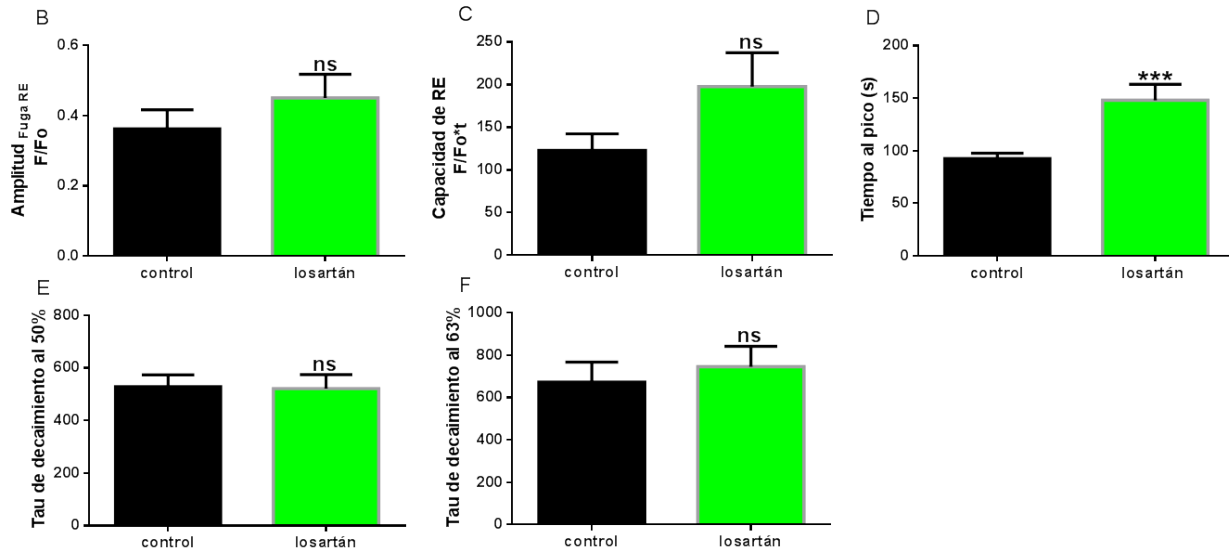
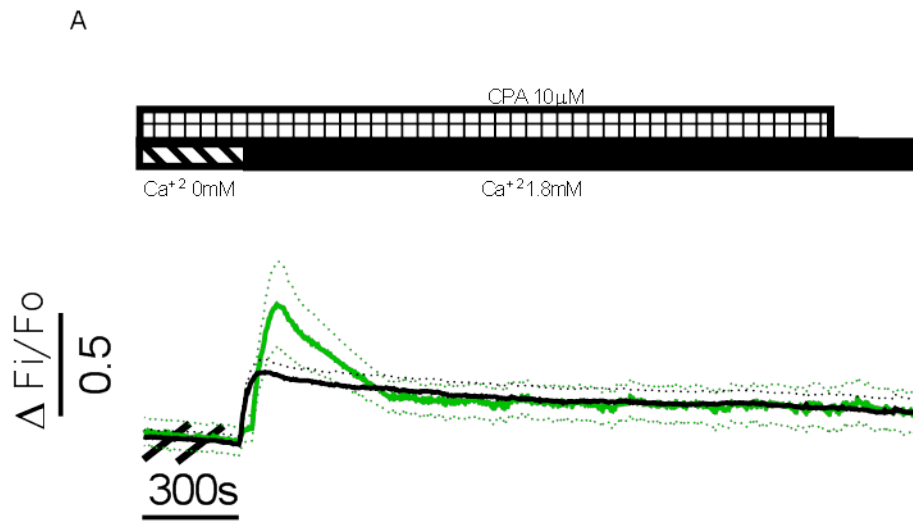


Figura 13. Calcio liberado del retículo endoplásmico en los fibroblastos tratados con losartán. Existe un aumento de la fluorescencia asociada a un aumento de la concentración de calcio citosólico por efecto del bloqueo de SERCA por el CPA (A). Los fibroblastos tratados con losartán requirieron un mayor tiempo para alcanzar la concentración pico de calcio (D). NO hubo cambios en la amplitud de la señal regis



trada (B), en la integral (C) o en las velocidades de decaimiento (E y F).  $N=3$   $n_{control}=15$   $n_{los}=10$ .

En el caso de SOCE, el tratamiento con losartán aumentó la concentración máxima de calcio alcanzada por este mecanismo y duplicó la cantidad total de calcio entrante (Figuras 14A-D;  $p<0.001$ ) a pesar de que el tiempo medio de extrusión se redujo en un 50% (Figura 14E).



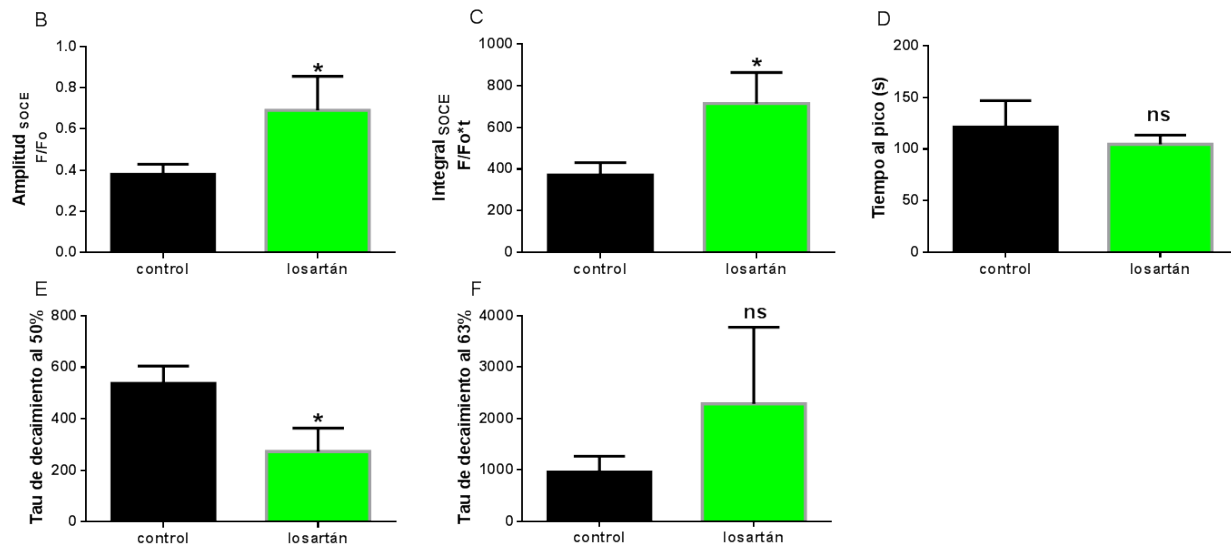


Figura 14. SOCE en los fibroblastos tratados con losartán. Existe un aumento de la fluorescencia asociada a un aumento de la concentración de calcio citosólico por efecto de la SOCE(A). El losartán aumento la cantidad de calcio entrante (C), alcanzando una mayor concentración de calcio citosólico (B), no obstante, la velocidad de extrusión, medida como la tau de decaimiento al 50% aumentó al doble (E). N=3 n<sub>control</sub>=15 n<sub>los</sub>=10

***Efecto la pirfenidona sobre la liberación y entrada de calcio en los fibroblastos tratados con Ang II.***

En la Figura 15 podemos observar que en la condición fibrótica, la liberación del calcio de RE en los fibroblastos tratados con pirfenidona, aumentó en un 90%, sin cambio significativos en el tiempo al pico ni en la cantidad total de calcio liberado (Figura 15A-D). Además, hubo un aumento en la velocidad de extrusión de calcio medido, disminuyendo el valor de la Tau<sub>0.5</sub> y de la Tau<sub>0.63</sub>, en un 30 y 60%, respectivamente (Figura 15E y F; p<0.001).

A

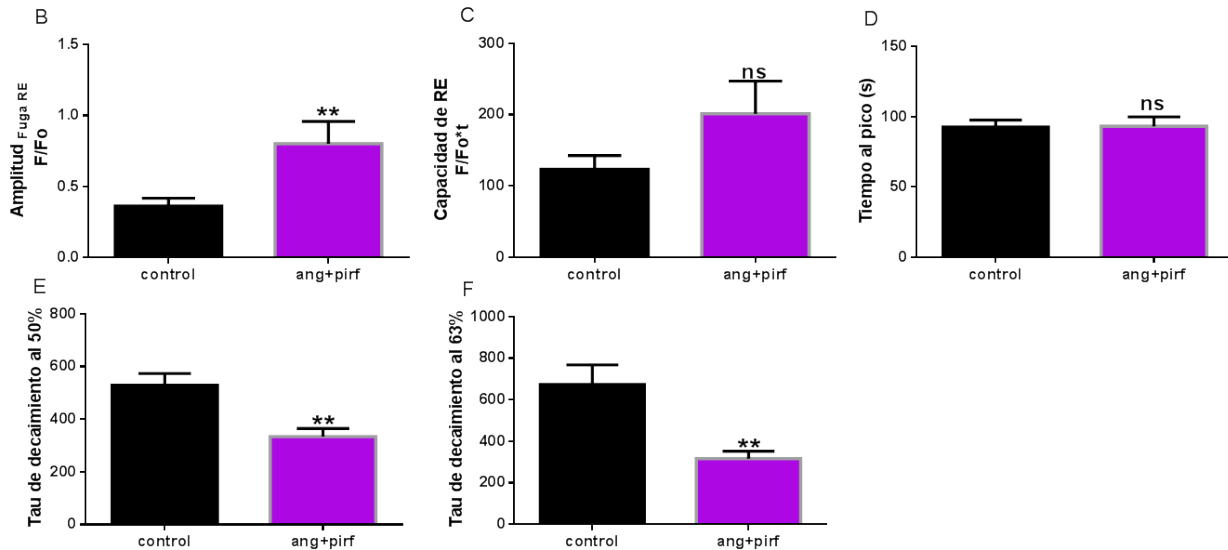
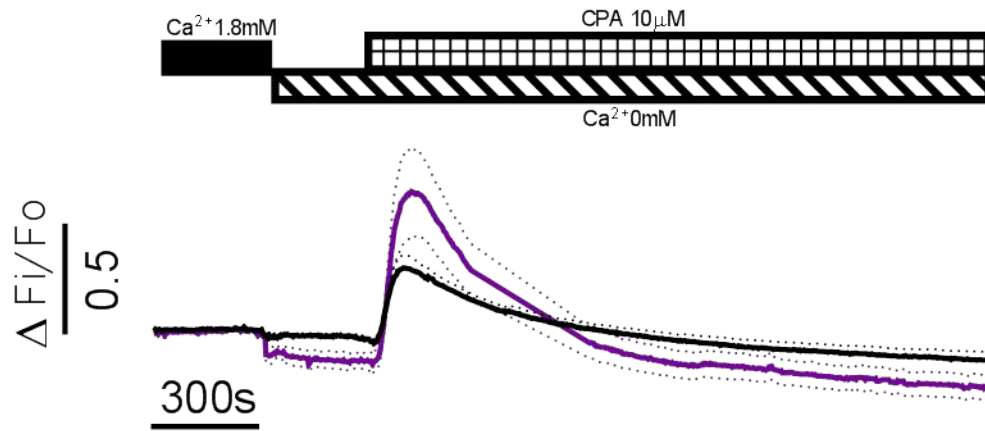


Figura 15. Calcio liberado del retículo endoplásmico en los fibroblastos en condiciones de fibrosis tratados con pirfenidona. Existe un aumento de la fluorescencia asociada a un aumento de la concentración de calcio citosólico por efecto del bloqueo de SERCA por el CPA (A). El tratamiento con pirfenidona aumentó la concentración pico de calcio que se alcanza con la fuga del retículo (B) y disminuyó el tiempo para retornar a la basal de calcio (E y F).  $N=3$   $n_{control}=15$   $n_{ang+pirf}=9$ .

Por lo que respecta a la entrada de calcio, observamos un aumento al doble en la cantidad total de calcio entrante y más de dos veces la concentración máxima, sin encontrar cambios significativos en el tiempo al pico de la respuesta o en la velocidad de extrusión del calcio. (Figura 16).



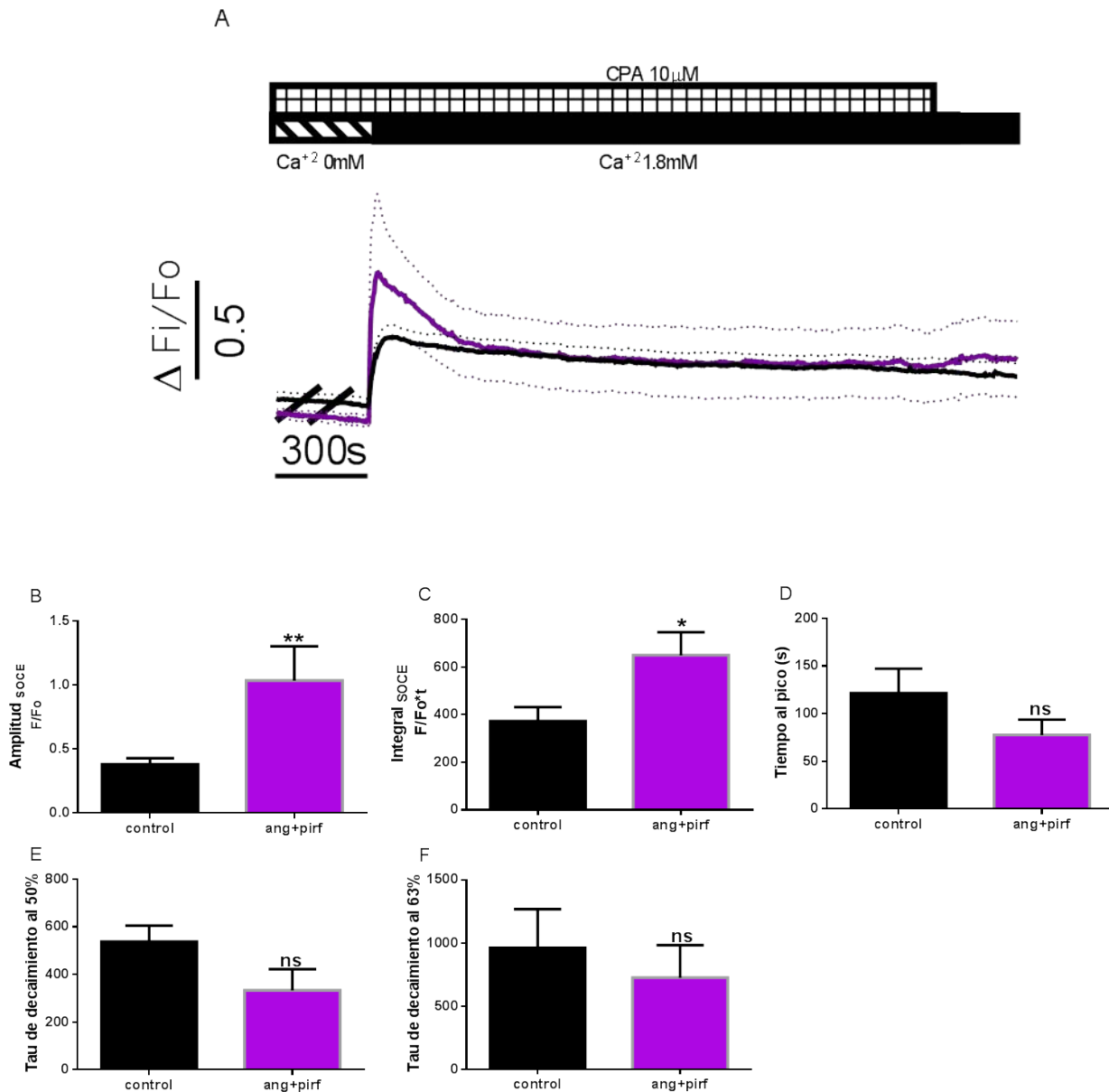


Figura 16. SOCE en los fibroblastos en condiciones de fibrosis tratados con pirfenidona. Existe un aumento de la fluorescencia asociada a un aumento de la concentración de calcio citosólico por efecto de la SOCE (A). El tratamiento aumento la cantidad de calcio liberado por la fuga del retículo (C), alcanzando una mayor concentración de calcio citosólico (B) sin modificar de manera significativa los tiempos al pico (D) y de extrusión de calcio (E) (F). N=3 n<sub>control</sub>=15 n<sub>angII+pirf</sub>=9.

### *Efecto del losartán sobre la liberación y entrada de calcio en los fibroblastos tratados con Ang II*

El tratamiento con losartán a una concentración de 1 mM, aumentó en aproximadamente un 20% la liberación (Figura 17A) y la entrada de calcio (Figura 18A), sin embargo, en ambos casos el efecto no

fue estadísticamente significativo. Tampoco encontramos diferencias en los otros parámetros estudiados.

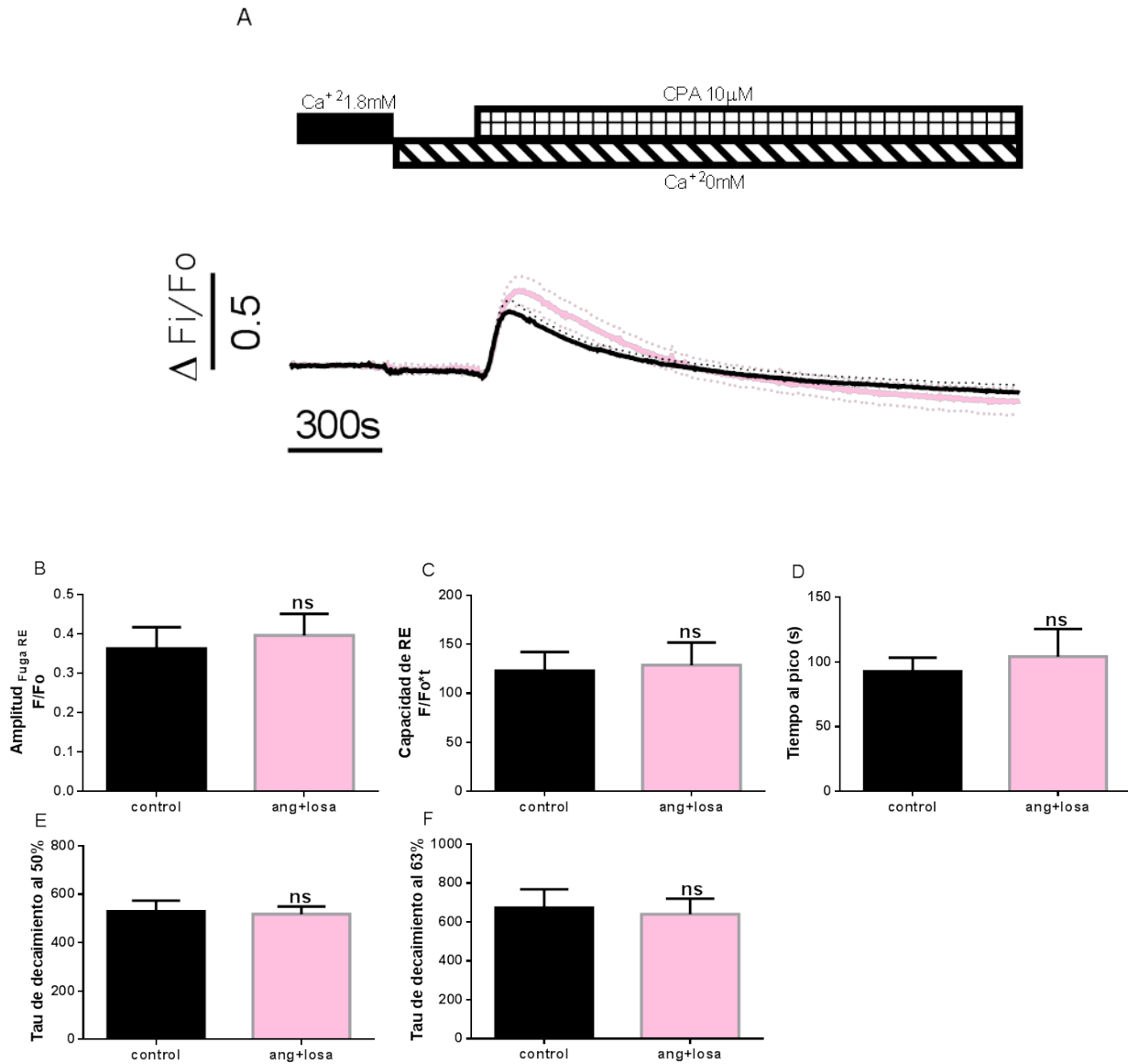


Figura 17. Calcio liberado del retículo endoplásmico en los fibroblastos en condiciones de fibrosis tratados con losartán. Existe un aumento de la fluorescencia asociada a un aumento de la concentración de calcio citosólico por efecto del bloqueo de SERCA por el CPA (A). El tratamiento con losartán no modificó de manera significativa los parámetros medidos de la fuga de calcio. N=3 n<sub>control</sub>=15 n<sub>angII+los</sub>=10

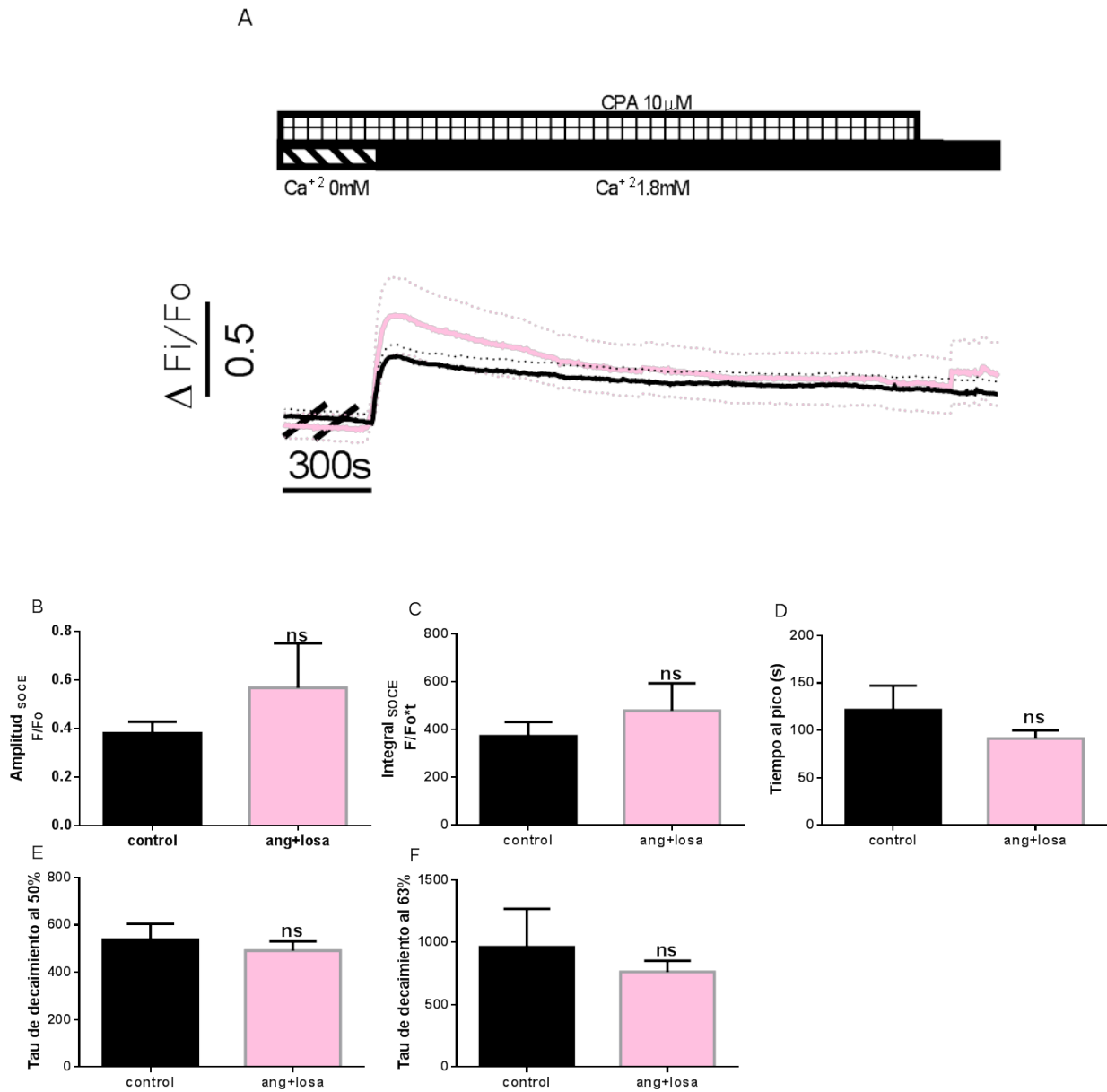


Figura 18. SOCE en los fibroblastos en condiciones de fibrosis tratados con losartán. Existe un aumento de la fluorescencia asociada a un aumento de la concentración de calcio citosólico por efecto de la SOCE (A). El tratamiento con losartán no modificó de manera significativa los parámetros medidos en SOCE. N=3 n<sub>control</sub>=15 n<sub>angII+los</sub>=10.

**Efecto de la co-aplicación de losartán y pirfenidona sobre la liberación y entrada de calcio en los fibroblastos tratados con Ang II.**

La liberación de calcio del RE aumentó al doble de la condición control en los fibroblastos fibróticos tratados de manera conjunta con pirfenidona y losartán ( $p < 0.05$ ). Este efecto se vio acompañado de una tendencia a incrementar la cantidad total de calcio liberado (Figura 19A-C); ambas respuestas son muy similares a las encontradas al tratar los fibroblastos fibróticos solo con la pirfenidona.

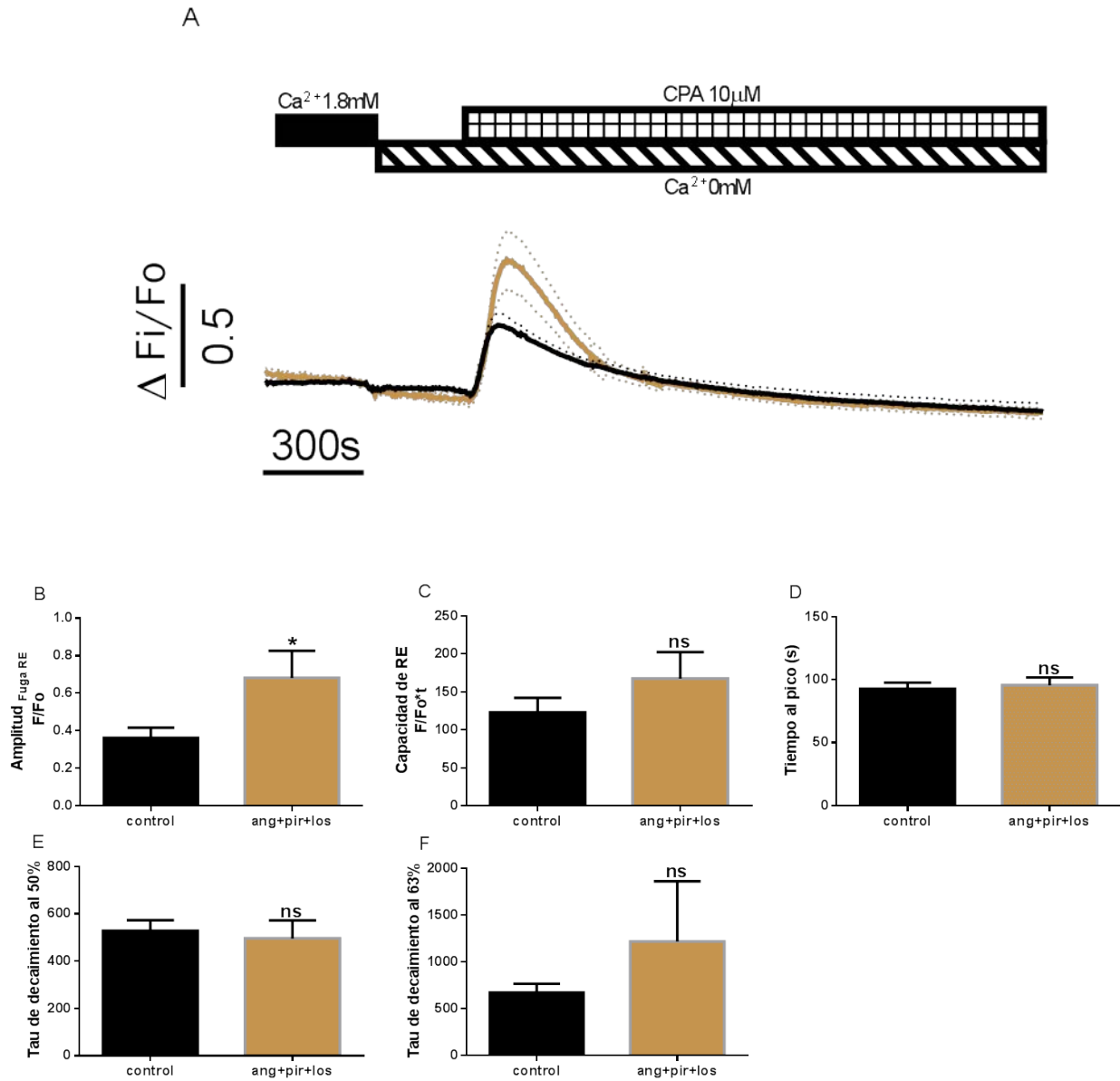


Figura 19. Calcio liberado del retículo en los fibroblastos en condiciones de fibrosis tratados con pirfenidona y losartán. Existe un aumento de la fluorescencia asociada a un aumento de la concentración de calcio citosólico por efecto del bloqueo de SERCA por el CPA (A). El tratamiento con pirfenidona y losartán aumentó la concentración máxima alcanzada por la fuga de calcio (B).  $N = 3$   $n_{control} = 15$   $n_{angII+pirf+los} = 11$

Para el caso de la entrada de calcio a través de los SOC, el tratamiento con ambos fármacos en la condición fibrótica aumentó la concentración máxima de calcio alcanzada y disminuyó a la mitad el tiempo de extrusión del calcio al 50% (Figura 20A, B y E). Aunque la concentración de calcio total entrante aumentó a prácticamente el doble de la condición control, el efecto no fue estadísticamente significativo.

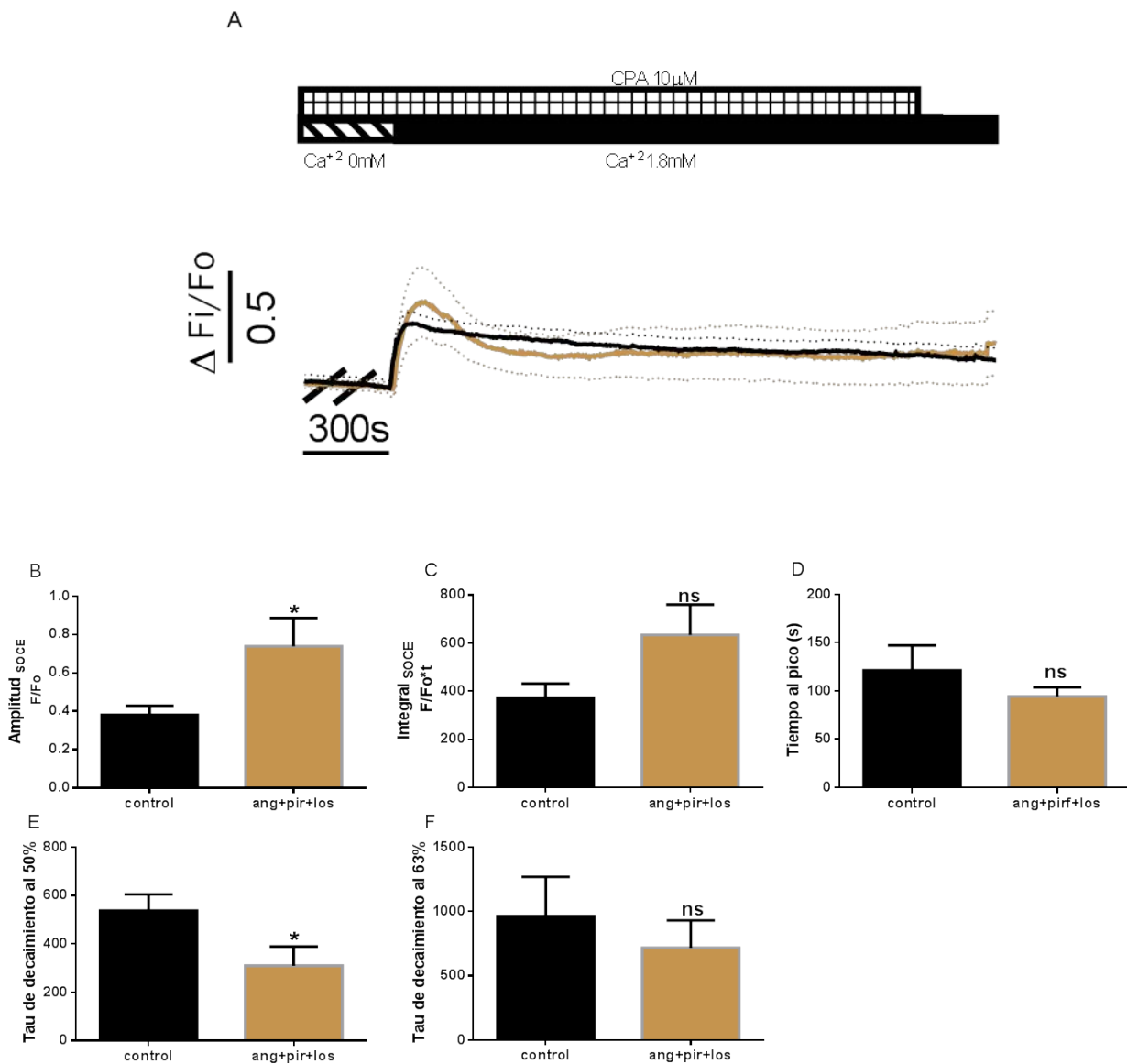


Figura 20. SOCE en los fibroblastos en condiciones de fibrosis tratados con pirfenidona y losartán. Existe un aumento de la fluorescencia asociada a un aumento de la concentración de calcio citosólico por efecto de la SOCE (A). El tratamiento aumentó la cantidad de calcio pico alcanzada por SOCE (B) y disminuyó el tiempo para regresar a la basal calcio al 50% (E). N=3 n<sub>control</sub>=15 n<sub>ang+pirf+los</sub>=11

### Efecto de la inhibición de NCX y PMCA.

PMCA y NCX son descritos en la literatura como dos de los principales mecanismos de extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$  por lo que para estudiar el efecto de los diversos tratamientos en estos mecanismos se realizó lo siguiente:

Para estudiar la contribución de PMCA sobre la extrusión de calcio, utilizamos el protocolo que a continuación se describe:

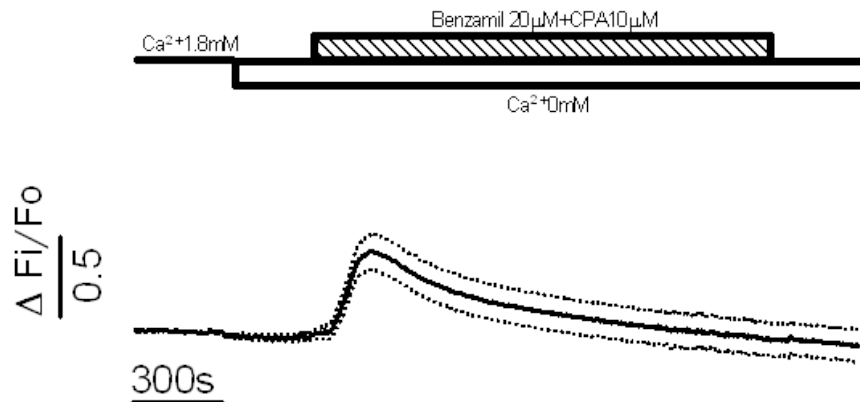


Figura 21. Protocolo Benzamil  $20 \mu\text{M}$ . El pico observado en el trazo corresponde a la fuga de calcio del retículo endoplásmico bajo el efecto del Benzamil, bloqueador de NCX.

En este protocolo se co-aplicaron dos drogas: el CPA para bloquear la actividad de la SERCA y el Benzamil para bloquear el NCX. Ambas drogas se co-aplicaron durante 25min en ausencia de calcio y el aumento resultante en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular sería debido a la fuga de calcio del RE y a la extrusión del ion por un mecanismo diferente del NCX, muy probablemente por la actividad de la PMCA, que de acuerdo a la literatura, es uno de los principales mecanismos de extrusión de calcio junto con el NCX (Brini & Carafoli, 2011).

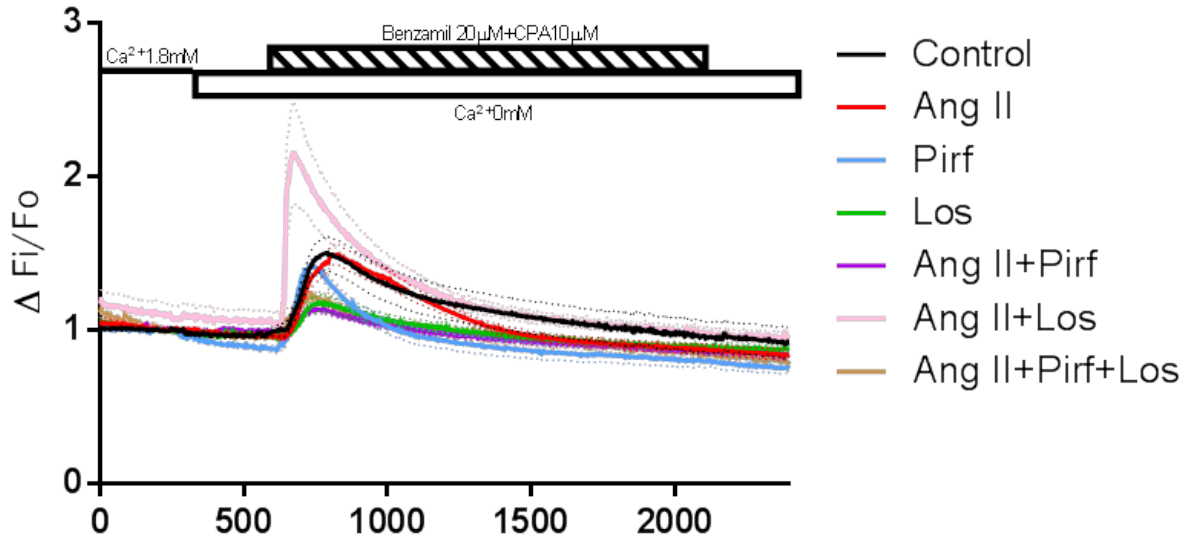


Figura 22. Trazos promedio de la señal de calcio evocada por fuga de calcio desde el RE. En cada una de las condiciones de co-aplicó benzamil 20 $\mu$ M para bloquear la actividad del NCX.

Para estudiar la contribución de NCX en la extrusión de calcio, utilizamos el protocolo que a continuación se describe:

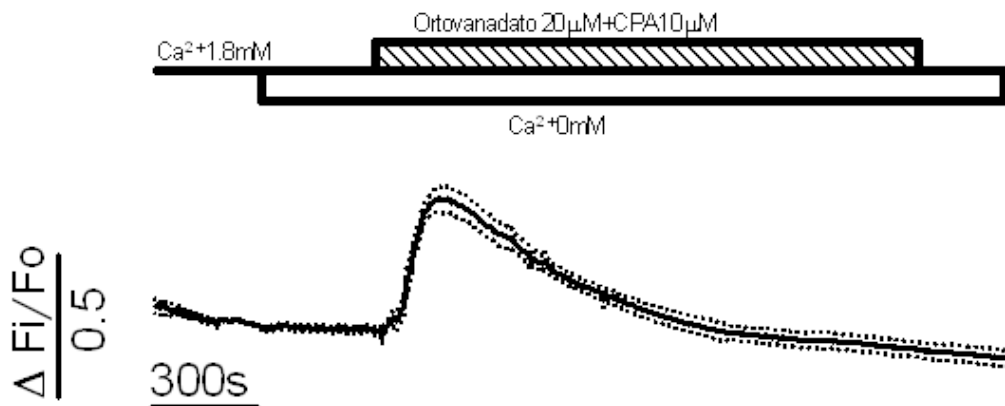


Figura 23. Protocolo Ortovanadato 20 $\mu$ M. El pico observado en el trazo corresponde a la fuga de calcio del retículo endoplásmico bajo el efecto del Ortovanadato, un bloqueador de la PMCA.

Para este registro seguimos bloqueando a SERCA para permitir un aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico por la fuga del retículo endoplásmico pero siendo modulada por NCX. Para lograr esto, se usó CPA al  $10\mu\text{M}$  como bloqueador de SERCA y al Ortovanadato  $20\mu\text{M}$  para bloquear a PMCA durante 25 minutos en SEN sin presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Al final del protocolo, las células son mantenidas en SEN sin presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  para no evocar a SOCE. En la siguiente Figura se puede observar el trazo de las medias obtenido en los registros con este protocolo.

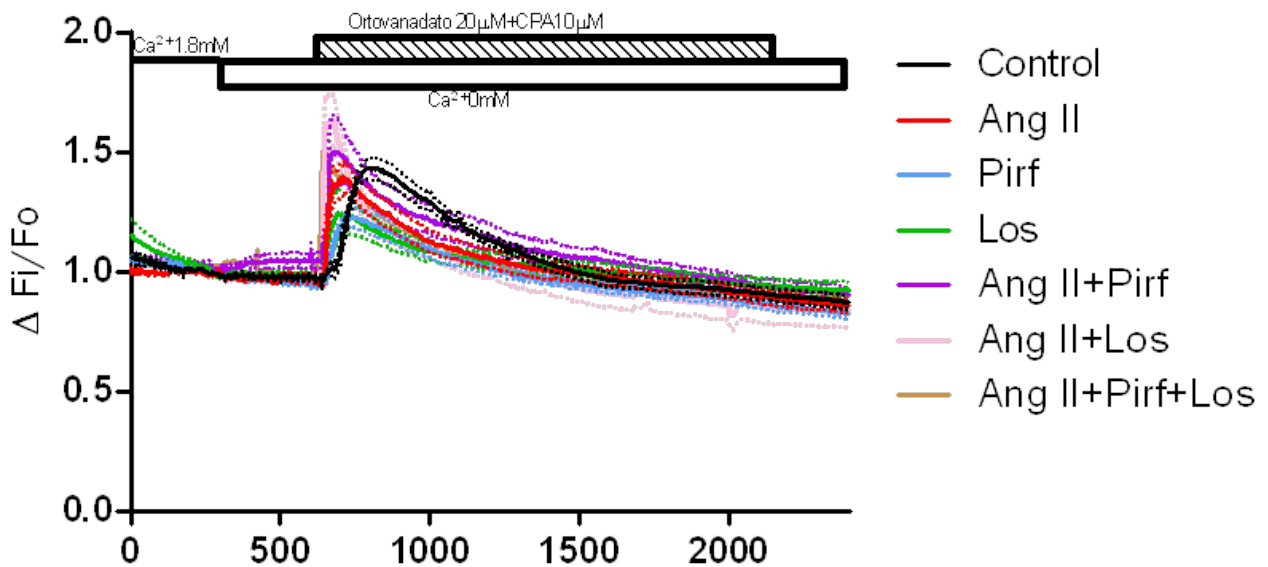


Figura 24. Trazos promedio de la señal de calcio evocada por fuga de calcio desde el RE. En cada una de las condiciones de co-aplicó orthovanadato  $20\mu\text{M}$  para bloquear la actividad del NCX.

Los parámetros que evaluamos en las respuestas evocadas fueron los mismos que describimos anteriormente: amplitud, área bajo la curva, tiempo al pico y tau de extrusión.

En la siguiente figura se muestran las diferencias encontradas usando CPA en cada una de las condiciones y el efecto del Ortovanadato y Benzamil como bloqueadores de PMCA y NCX respectivamente.



C

I

Figura 25. Efecto del Ortovanadato y Benzamil en la extrusión de calcio liberado desde el RE. El uso de CPA y Ortovanadato o CPA y Benzamil tuvo efectos distintos en las diferentes condiciones.

—

En la figura 25A observamos que en los fibroblastos controles, al bloquear la actividad del NCX con el benzamil, el transitorio de calcio aumenta en amplitud y en duración, enlenteciéndose la fase de decaimiento (Figura 27 y 29). Cuando bloqueamos la actividad de la PMCA, el efecto sobre la amplitud del transitorio fue muy similar al observado con el benzamil, lo cual denota una participación equitativa de ambos mecanismos sobre la extrusión del calcio intracelular (Ver condición control en las figuras 26-29).

Cuando evaluamos el efecto del bloqueo de ambos mecanismos en los fibroblastos tratados con pirfenidona, en fibroblastos fibróticos y en los fibróticos tratados con losartán, encontramos que al usar el benzamil, el transitorio de calcio aumento en amplitud y en duración, sin embargo, al aplicar el ortovanadato, solo encontramos un ligero incremento en la amplitud, pero sin cambios en el resto del transitorio de calcio (Figura 25 B, C y F). En estos experimentos encontramos también una disminución en el tiempo al pico al usar ambas drogas (Figura 28). Esto denota que en estas condiciones experimentales, la PMCA y no el NCX tiene el papel preponderante en la extrusión del calcio. (Figura 26-29)

Por lo que respecta a las condiciones de fibroblastos tratados con losartán, fibroblastos fibróticos tratados con pirfenidona o co-tratados con pirfenidona y losartán, del bloqueo del intercambiador tuvo un efecto no esperado: la amplitud del transitorio de calcio y su duración, disminuyeron de manera drástica a pesar de que se enlenteció la velocidad de extrusión (Figura 25). Este efecto podría deberse a que en el pirfenidona como el losartán podrían estar activando mecanismos compensatorios (una sobreactivación de PMCA o NCX) o sobreactivando mecanismos de remoción de calcio, que normalmente tienen un papel menor en el tamponamiento de calcio, un ejemplo sería el MCU en la mitocondria (Figura 26-29). El bloqueo de la PMCA, no afectó de manera significativa la amplitud del transitorio de calcio en los fibroblastos fibróticos tratados con pirfenidona pero disminuyo la velocidad de extrusión al punto que la el valor final de la concentración de calcio es mayor que la condición sin bloqueador (Figura 25-29).

A continuación mostramos los gráficos del análisis cuantitativo, mediante los cocientes de cambio en los diferentes parámetros del transitorio de calcio, al aplicar los fármacos benzamil u ortovanadato (fármaco/ sin fármaco).

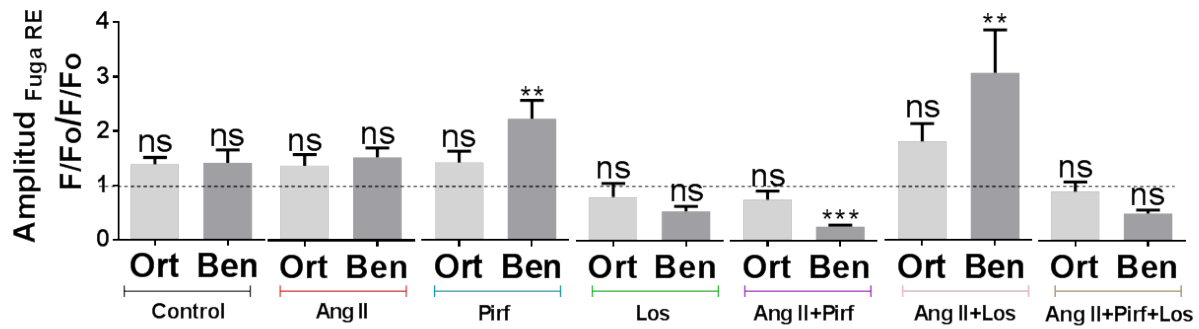


Figura 26. Efecto del benzamil y el ortovanadato sobre la amplitud del transitorio de calcio liberado del RE. Se muestran los cocientes de cambio al aplicar el benzamil, un bloqueador del NCX o el ortovanadato, un inhibidor de la PMCA, en las diferentes condiciones experimentales. N=3  $n_{control}=15$   $n_{angII}=11$   $n_{pirf}=7$   $n_{los}=10$   $n_{angII+pirf}=9$   $n_{angII+los}=10$   $n_{angII+pirf+los}=11$ .

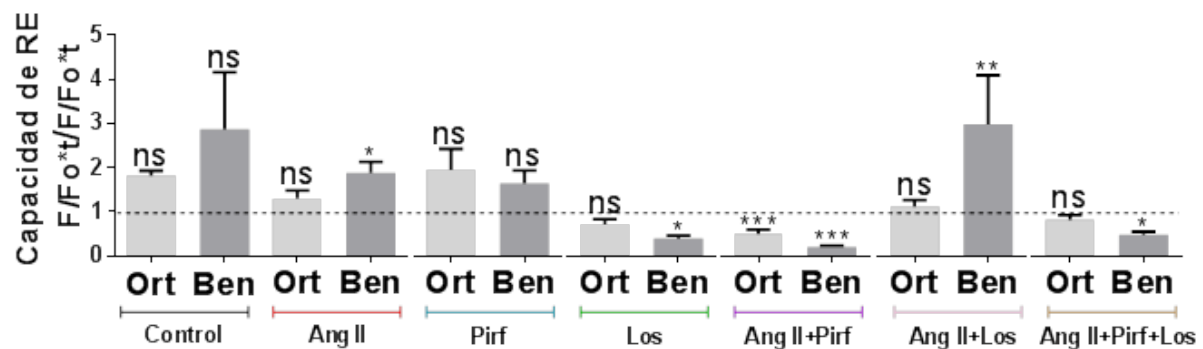


Figura 27. Efecto del benzamil y el ortovanadato sobre el calcio total del RE. Se muestran los cocientes de cambio al aplicar el benzamil, un bloqueador del NCX o el ortovanadato, un inhibidor de la PMCA, en las diferentes condiciones experimentales. N=3  $n_{control}=15$   $n_{angII}=11$   $n_{pirf}=7$   $n_{los}=10$   $n_{angII+pirf}=9$   $n_{angII+los}=10$   $n_{angII+pirf+los}=11$ .

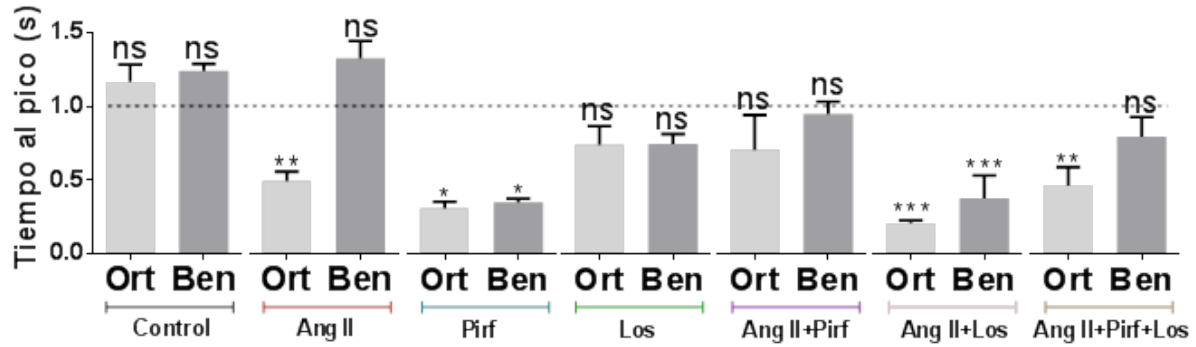


Figura 28. Efecto del benzamil y el ortovanadato sobre el tiempo al pico del transitorio evocado por la liberación de calcio de RE. Se muestran los cocientes de cambio al aplicar el benzamil, un bloqueador del NCX o el ortovanadato, un inhibidor de la PMCA, en las diferentes condiciones experimentales.  $N=3$   $n_{\text{control}}=15$   $n_{\text{angII}}=11$   $n_{\text{pirf}}=7$   $n_{\text{los}}=10$   $n_{\text{angII+pirf}}=9$   $n_{\text{angII+los}}=10$   $n_{\text{angII+pirf+los}}=11$ .

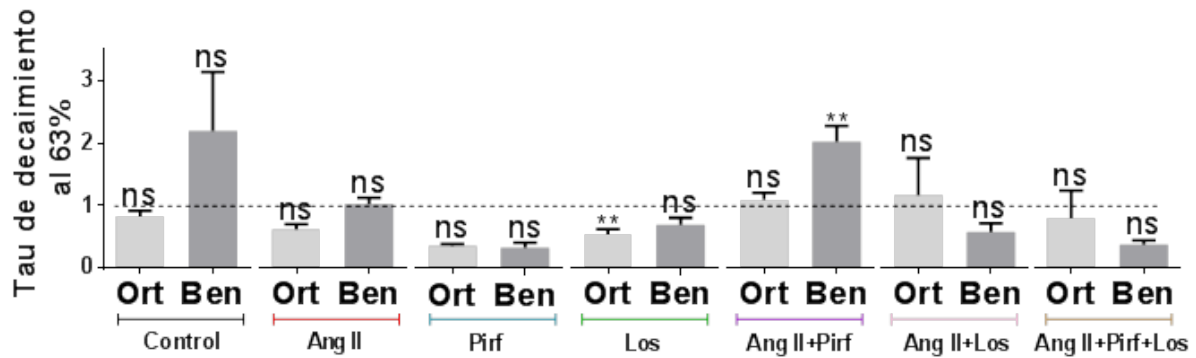


Figura 29. Efecto del benzamil y el ortovanadato sobre la velocidad de decaimiento del transitorio evocado por la liberación de calcio de RE. Se muestran los cocientes de cambio al aplicar el benzamil, un bloqueador del NCX o el ortovanadato, un inhibidor de la PMCA, en las diferentes condiciones experimentales.  $N=3$   $n_{\text{control}}=15$   $n_{\text{angII}}=11$   $n_{\text{pirf}}=7$   $n_{\text{los}}=10$   $n_{\text{angII+pirf}}=9$   $n_{\text{angII+los}}=10$   $n_{\text{angII+pirf+los}}=11$ .

### Liberación de calcio del RE inducida por la activación del receptor a IP3

El protocolo empleado para estimular los receptores IP3 y provocar la liberación de calcio de retículo endoplásmico fue el siguiente:

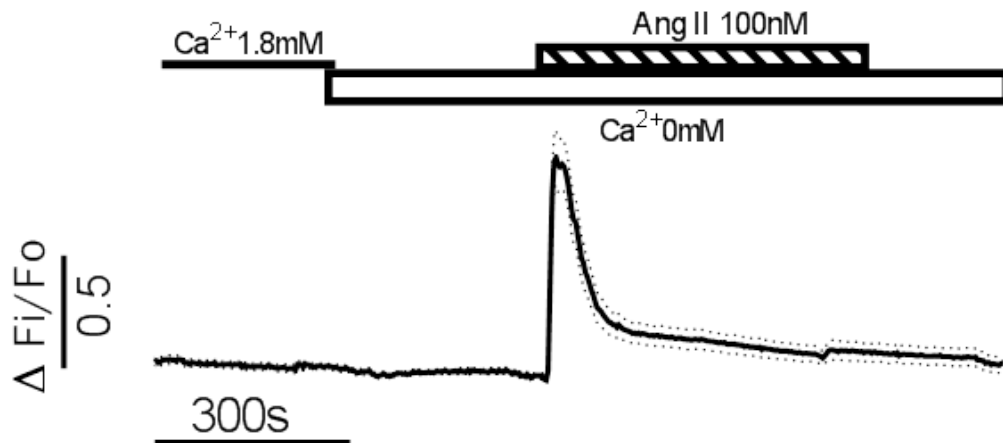


Figura 30. Protocolo Ang II 100nM. El pico en el trazo corresponde a la liberación de calcio del retículo mediante los receptores de IP3.

El protocolo consiste en aplicar Ang II la cual se une a los receptores AT1 y activa la vía de la PLC, generando a partir de la descomposición del  $\text{PIP}_2$  el DAG y el IP3. Este último activa a su receptor en el retículo endoplásmico y provoca la liberación de calcio hacia el citosol. De acuerdo a la literatura, la liberación de calcio inducido por la activación de los receptores a IP3 es el principal mecanismo de liberación de calcio en células no excitables eléctricamente. La concentración usada de Ang II fue de 100nM en solución libre de  $\text{Ca}^{2+}$  durante 10 minutos, esto para asegurar que el aumento intracelular de calcio se deba solo a la liberación y no a la entrada del ion. En la siguiente Figura se puede observar los trazos de las medias obtenidas para cada una de las condiciones experimentales.

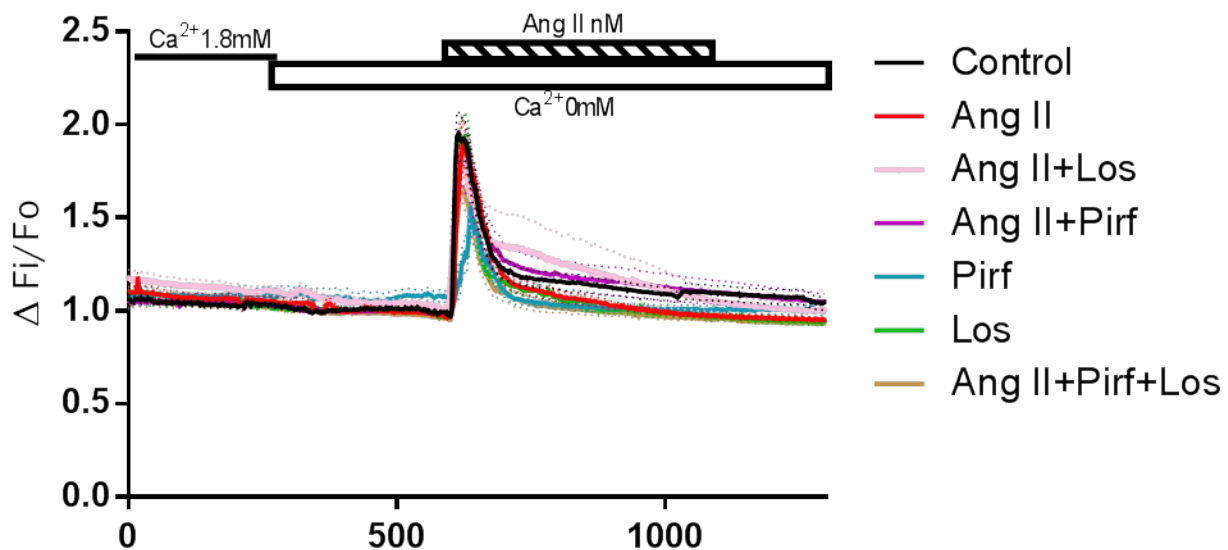


Figura 31. Trazos promedio de la liberación de calcio evocada por la estimulación de los receptores a IP3 mediante la aplicación de ANGII.

Los parámetros analizados en cada uno de los gráficos son la amplitud, el área bajo la curva, el tiempo al pico y la tau de extrusión.

## Liberación de calcio del RE por activación de los receptores a IP3 en los fibroblastos tratados con Ang II

La aplicación aguda de la Ang II provoca un aumento transitorio en la concentración intracelular de calcio. Tanto en la condición control como en la condición fibrótica, la Ang II provocó señales prácticamente idénticas, aumentando solo el tiempo al pico para alcanzar la concentración máxima de calcio en los FiC's fibróticos. Esta respuesta es muy similar a la encontrada en los experimentos donde evaluamos la liberación pasiva de calcio desde el RE bloqueando a la SERCA con el CPA (Figura 32).

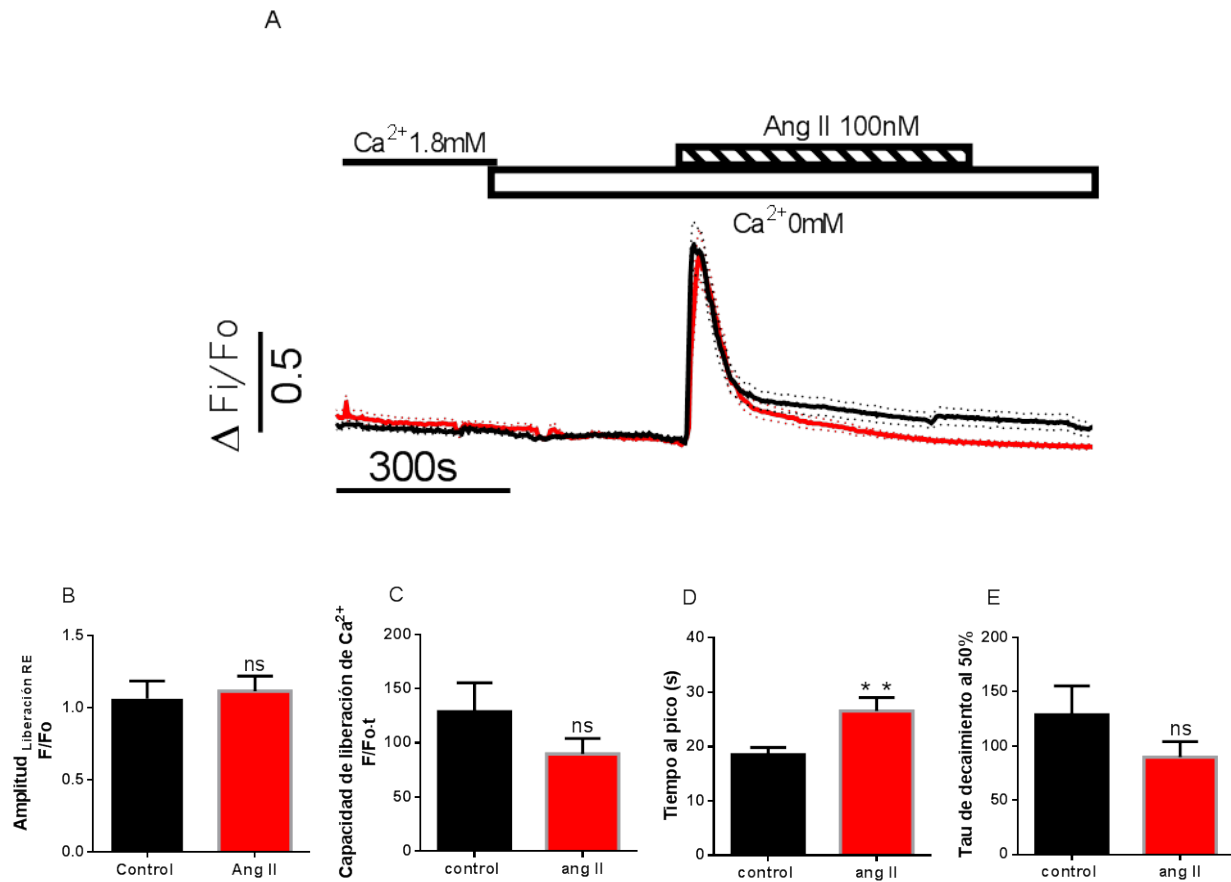


Figura 32. Estimulación de los receptores a IP3 en los fibroblastos en condiciones de fibrosis. Los fibroblastos fueron expuestos a Ang II con lo que se provocó un aumento en la fluorescencia asociada a un aumento en la concentración de calcio citosólico (A). No hubo cambios significativos en la amplitud (B), calcio liberado (C) o en la tau de decaimiento (E). En los fibroblastos fibróticos aumentó el tiempo al pico para alcanzar la concentración máxima de calcio (D). N=5.  $n_{control}=22$   $n_{Ang II}=20$

**Efecto del tratamiento con pirfenidona sobre la liberación de calcio inducida por la activación de los receptores a IP3.**

El tratamiento durante 48 horas con pirfenidona de los fibroblastos del grupo control indujo cambios en la respuesta evocada por la aplicación de la ANGII: la liberación de calcio del RE disminuyó en un 30% y la cantidad total de calcio liberado fue de solo un 15% del valor control (Figura 36A-C). Esta disminución tan drástica se explica por un enlentecimiento de la velocidad de liberación y por un aumento de la velocidad de extrusión del ion (Figura 33D y E).

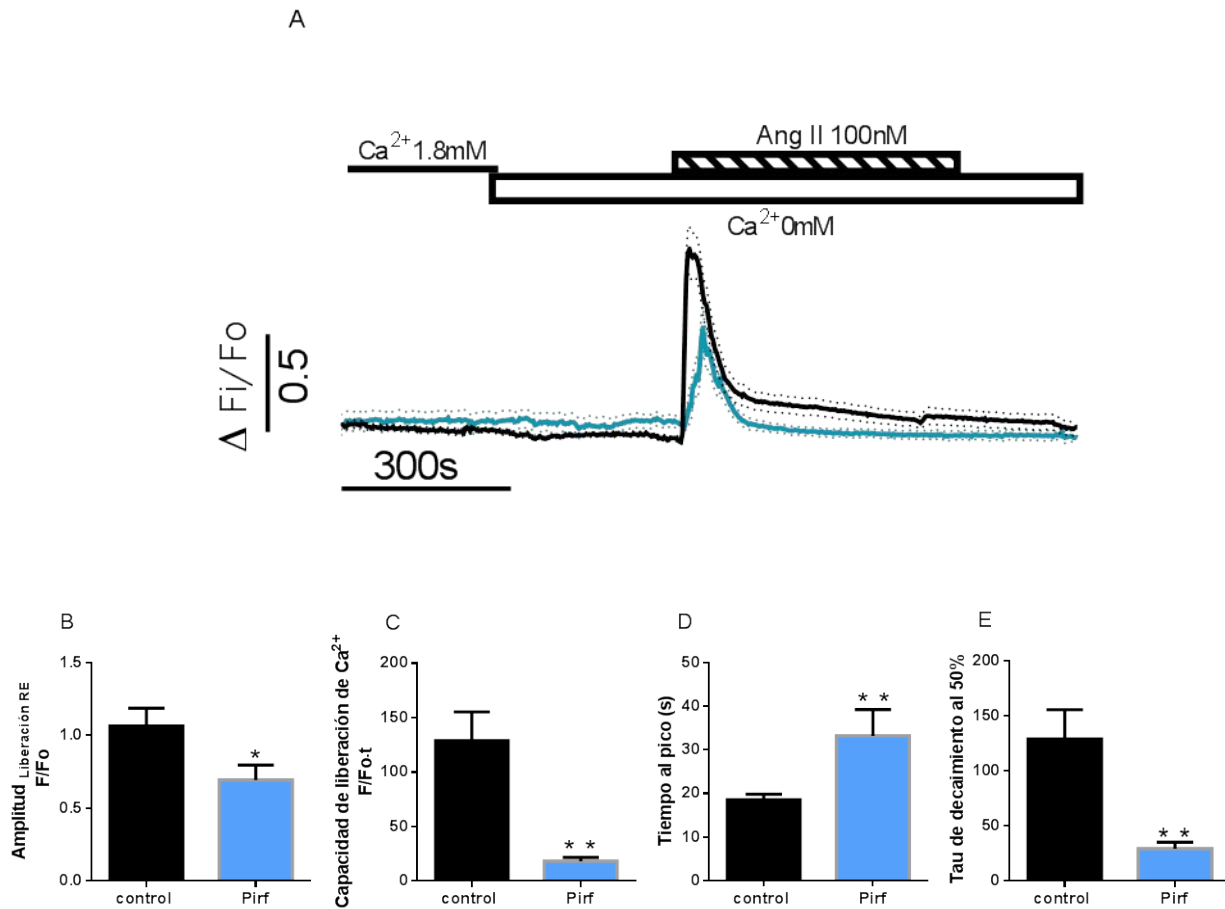


Figura 33. Estimulación de los receptores a IP3 en los fibroblastos tratados con pirfenidona. Los fibroblastos fueron expuestos a Ang II con lo que se provocó un aumento en la fluorescencia asociada a un aumento en la concentración de calcio citosólico (A). Los fibroblastos tratados con pirfenidona presentan una menor cantidad de calcio liberada por la activación de los receptores a IP3 (C) disminuyendo también la concentración máxima alcanzada (B) y requiriendo un mayor tiempo para lograr dicha concentración (D) y un menor tiempo para regresar al estado basal (E). N=4. n<sub>control</sub>=22 n<sub>pirf</sub>=14.



### Efecto del losartán sobre la liberación de calcio del RE inducida por la activación de los receptores a IP3.

Al igual que en los experimentos con CPA, el tratamiento con losartán durante 48h, no tuvo efectos significativos sobre la liberación de calcio del retículo endoplasmático inducida por la aplicación en este caso de ANG II (Figura 34).

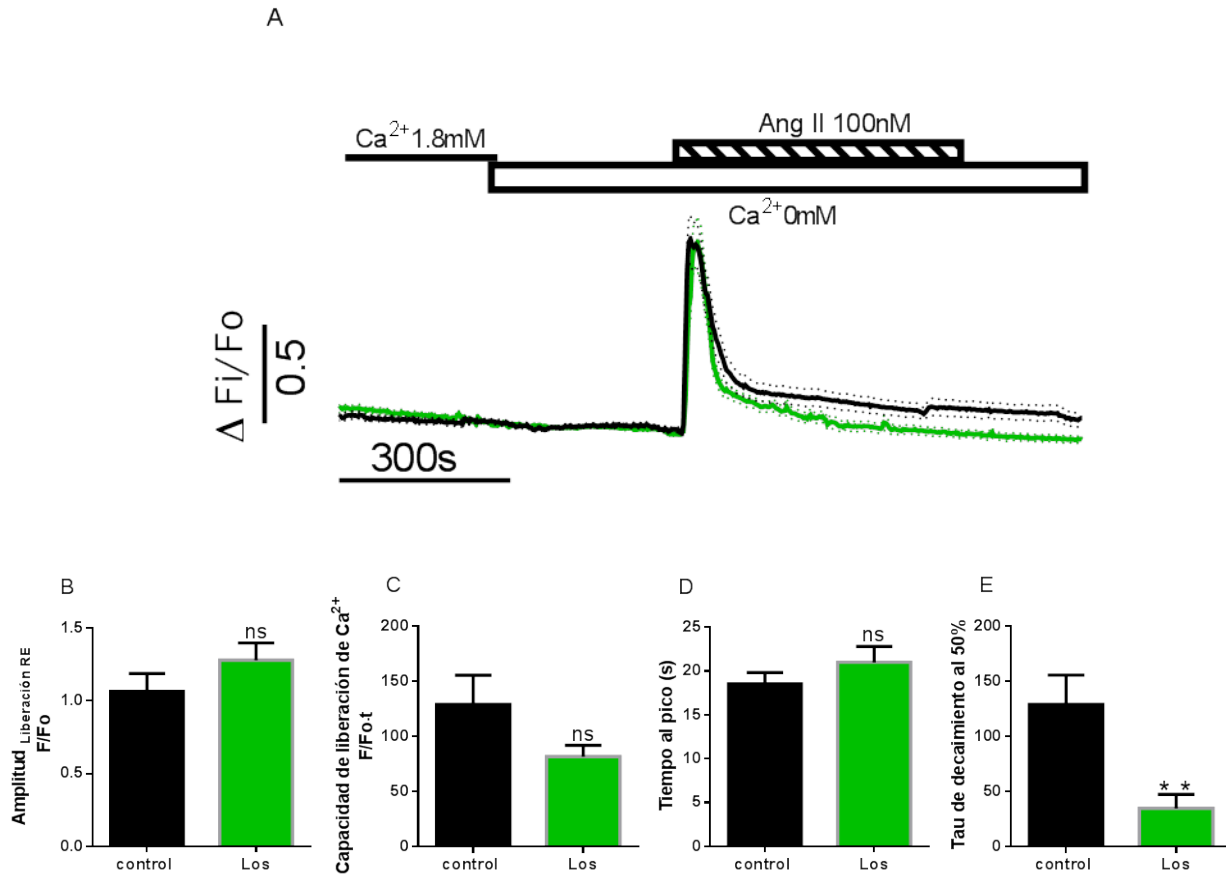


Figura 34. Estimulación de los receptores a IP3 en los fibroblastos tratados con losartán. Los fibroblastos fueron expuestos a Ang II con lo que se provocó un aumento en la fluorescencia asociada a un aumento en la concentración de calcio citosólico (A). Los fibroblastos tratados con losartán requieren un menor tiempo para regresar a las condiciones basales (E). No encontramos diferencias significativas en la amplitud (B), liberación total de calcio (C) ni en el tiempo al pico (D). N=5. n<sub>control</sub>=22 n<sub>los</sub>=24

*Efecto de la pirfenidona sobre la liberación de calcio del RE estimulado por la activación de los receptores a IP3 en los fibroblastos tratados con Ang II.*

El tratamiento de los fibroblastos en la condición fibrótica con la pirfenidona, restablece la amplitud del transitorio de calcio, la cantidad total de calcio liberado y la velocidad de liberación a valores similares a los encontrados en la condición control (Figura 35A-D), y aunque la velocidad de extrusión es mayor (Figura 35E), el balance final no afecta la cantidad total de calcio liberada.

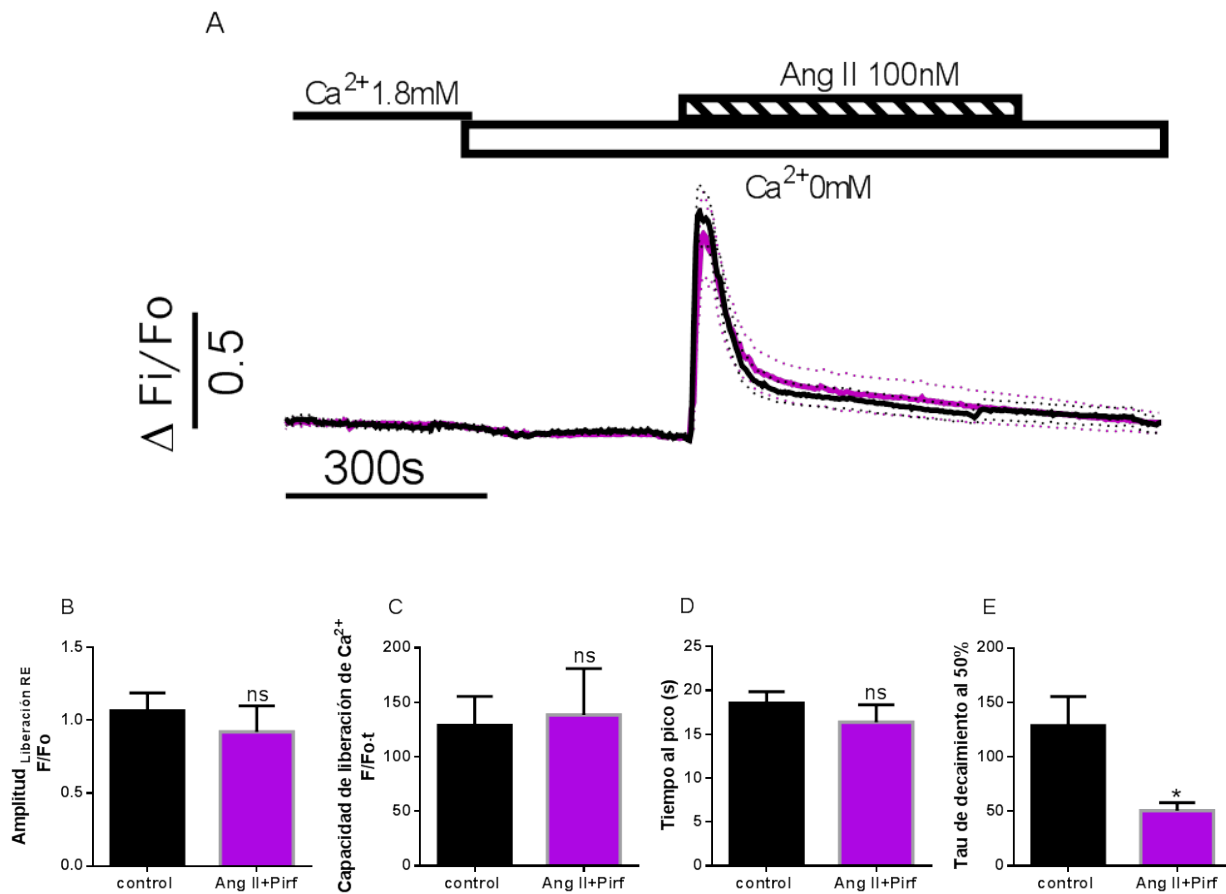


Figura 35. Estimulación de los receptores a IP3 en los fibroblastos en condiciones de fibrosis tratados con pirfenidona. Los fibroblastos fueron expuestos a Ang II con lo que se provocó un aumento en la fluorescencia asociada a un aumento en la concentración de calcio citosólico (A). Los fibroblastos en condiciones de fibrosis tratados con pirfenidona requieren un menor tiempo para regresar a las condiciones basales (E). No encontramos diferencias en la amplitud (B), calcio liberado (C) ni en el tiempo al pico (D). N=4.  $n_{control}=22$   $n_{ang II+pirf}=11$

**Efecto del losartán sobre la liberación de calcio inducida por la activación del receptor a IP3 en los fibroblastos fibróticos.**

Cuando analizamos el efecto del losartán sobre la liberación pasiva de calcio del RE no obtuvimos diferencias significativas en presencia de este fármaco. Al estimular la liberación de calcio por la activación de los IP3-R, la respuesta evocada fue muy variable (en algunas células de un mismo vidrio se observaba como algunas disminuían la concentración de manera más rápida que otras) y aunque el valor promedio (Figura 36A) del transitorio de calcio es netamente diferente en la fase de decaimiento, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre ambas condiciones (Figura 36B-E).

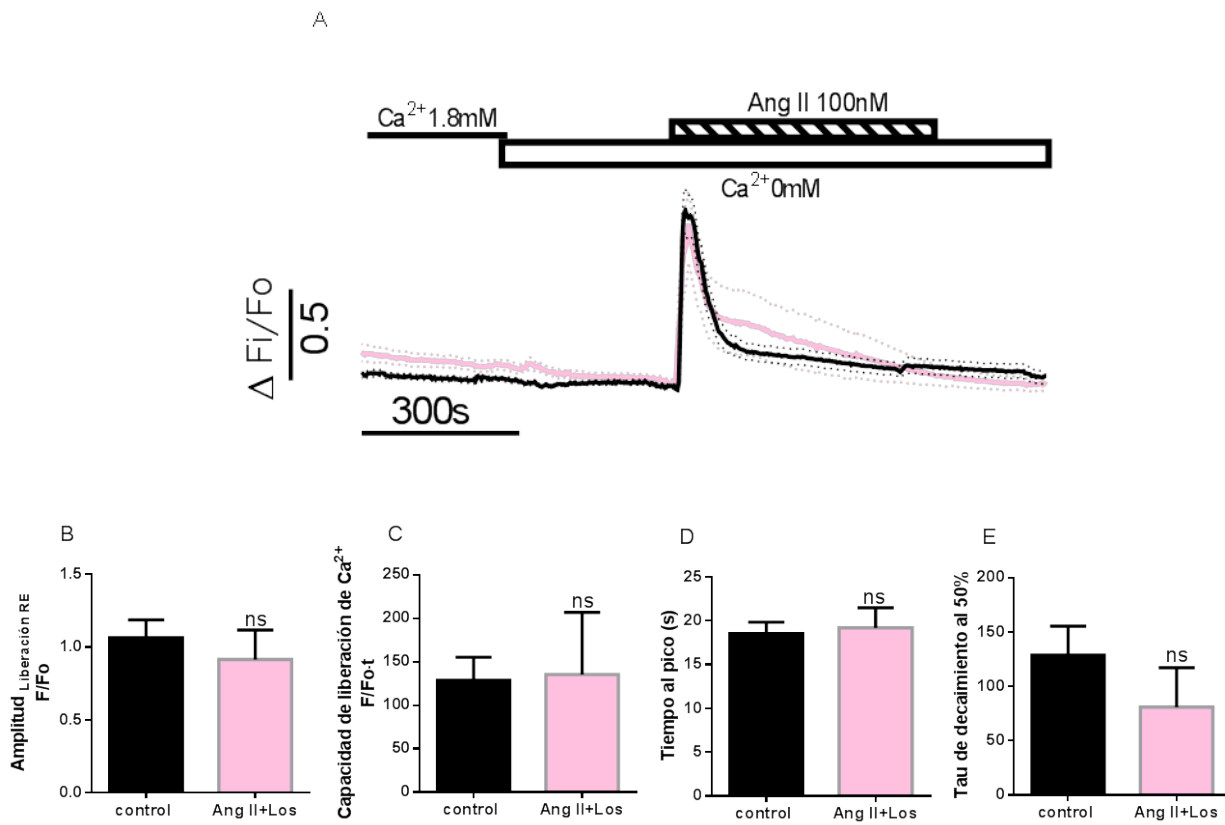


Figura 36. Estimulación de los R'IP3 en los fibroblastos en condiciones de fibrosis tratados con losartán. Los fibroblastos fueron expuestos a Ang II con lo que se provocó un aumento en la fluorescencia asociada a un aumento en la concentración de calcio citosólico (A) Los fibroblastos en condiciones de fibrosis tratados con losartán no mostraron tener diferencias en los parámetros medidos en la liberación de calcio (C), la amplitud (B) o en el tiempo al pico (D). N=4.  $n_{control}=22$   $n_{ang II+pirf}=10$ .

**Efecto del cotratamiento con pirfenidona y losartán sobre la liberación de calcio inducida por la activación de los receptores a IP3.**

El trazo de la figura 37A muestra el efecto obtenido en los fibroblastos en condición de fibrosis tratados con pirfenidona y losartán al estimularlos de manera aguda con Ang II 100nM. Se puede apreciar que existe una menor cantidad de calcio liberada por los receptores IP3 (C) \*p<0.05 y una mayor velocidad en la remoción del calcio citosólico (E) \*p<0.05. Pareciera que aunque la pirfenidona y el losartán son fármacos antifibróticos, los efectos que tienen sobre la liberación de calcio son antagónicos, ya que la presencia de losartán, parcialmente restablece la señal evocada por ANG II en los fibroblastos tratados con pirfenidona (Figura 33 y 37).

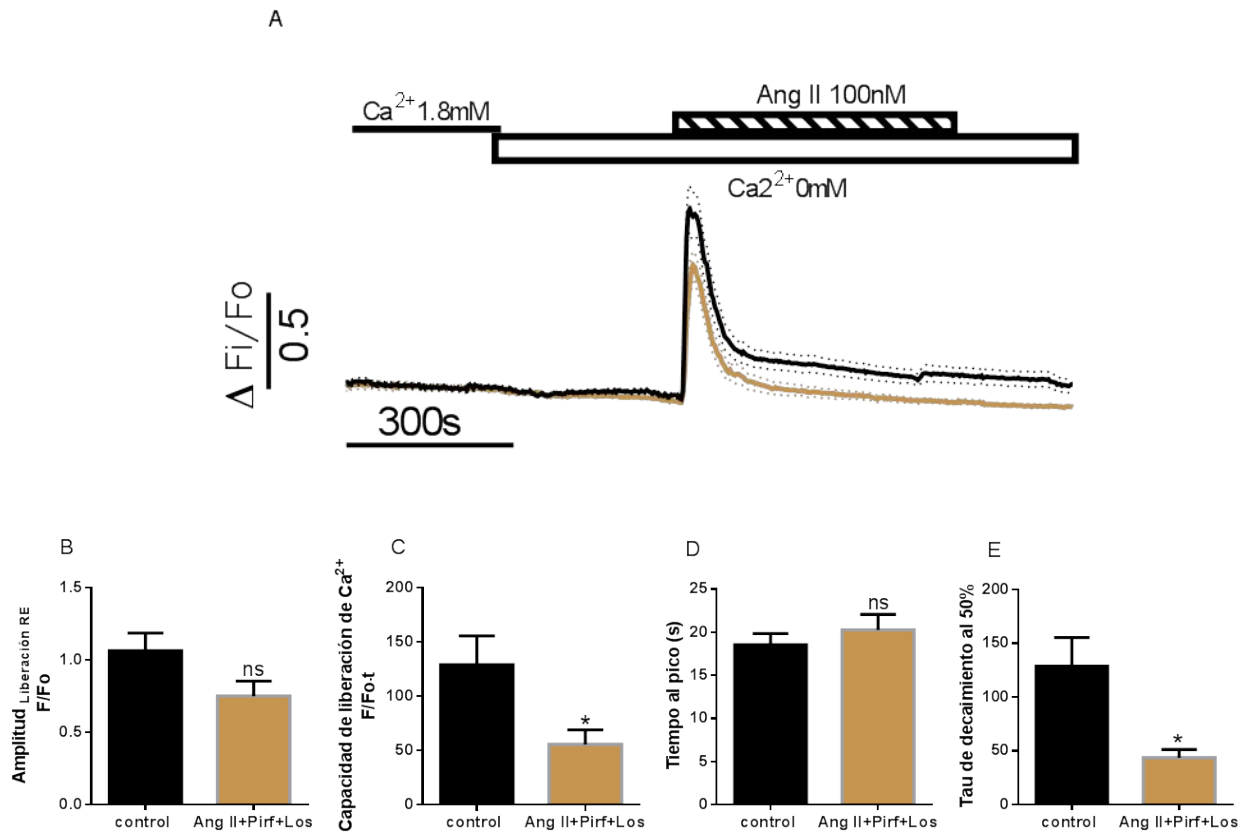


Figura 37. Estimulación de los receptores a IP3 en los fibroblastos en condiciones de fibrosis tratados con pirfenidona y losartán. Los fibroblastos fueron expuestos a Ang II con lo que se provocó un aumento en la fluorescencia asociada a un aumento en la concentración de calcio citosólico (A). Los fibroblastos en condiciones de fibrosis tratados con pirfenidona y losartán tuvieron una menor cantidad de calcio liberada por los receptores IP3 (C) así como un menor tiempo en regresar a su estado basal (E). Aunque la amplitud de la respuesta fue menor (B), no fue estadísticamente significativo al igual que el tiempo al pico (D). N=5. n<sub>control</sub>=22 n<sub>ang II+pirf</sub>=16.

## DISCUSIÓN

### Diferenciación de los fibroblastos cardiacos.

La fibrosis cardiaca es una enfermedad caracterizada por un exceso en la cantidad de las proteínas que componen a la matriz extracelular teniendo como consecuencia alteraciones en la función cardiaca. Las investigaciones que abordan a esta patología atribuyen al fibroblasto el papel protagonista debido a que se le considera como la principal fuente de secreción de las proteínas que conforman a la MEC (Kamimura et al., 2012; Porter & Turner, 2009; Segura et al., 2014). Esta célula es susceptible de ser estimulada por una variada cantidad de factores hormonales dentro de los que destaca la Ang II, un péptido vasoactivo que favorece el aumento de presión arterial. Con relación a la fibrosis cardiaca, se ha visto que la Ang II es capaz de inducir la secreción de diversas proteínas y sustancias relacionadas con la fibrosis como el colágeno tipo I y el TGF- $\beta$ 1. También se ha demostrado que interviene en el proceso de diferenciación del fibroblasto hacia miofibroblasto, un estadio celular caracterizado por la presencia de  $\alpha$ -SMA y una mayor capacidad tanto contráctil como secretoria. Esto lo logra debido a que al unirse con el receptor AT-1, genera una cascada de señalización que involucra a las MAPKs (JNK, p38 y ERK) las cuales fosforilan a Smad2 y Smad3 y forman un complejo junto con Smad4 que puede internalizarse en el núcleo, donde promueve la transcripción de los genes asociados con TGF- $\beta$ 1, colágeno tipo I, colágeno tipo III y fibronectina, entre otros. También el receptor AT-1 es capaz de activar a la vía de señalización JAK-STAT y promover la transcripción del TGF- $\beta$ 1 (Dobaczewski et al., 2012; Furukawa et al., 2003; Gabriel, 2009; Schiller, Javelaud, & Mauviel, 2004). La estimulación del receptor AT-2 también activa a las MPAKs promoviendo la síntesis de las proteínas y factores antes mencionados (Murphy et.al, 2015; Schnee et.al., 2000).

Diversos autores han estudiado el fenómeno de la fibrosis utilizando fibroblastos cardiacos y la estimulación con diversos factores para generar un ambiente pro-fibrótico y un modelo in vitro. Dentro de los factores utilizados destaca la Ang II. En este trabajo utilizamos Ang II a una concentración de 100nM, ya que de acuerdo a trabajos previos, esta concentración es suficiente para inducir la activación de los fibroblastos y la conversión hacia miofibroblastos. La presencia de este fenotipo se hace evidente por la aparición de la fibras de  $\alpha$ -SMA (figura 4) (Chung, Kao, Liou, & Chen, 2014; Kawano et al., 2000; Neuss, Regitz-Zagrosek, Hildebrandt, & Fleck, 1994).

Es importante señalar que a diferencia de otros trabajos donde utilizan fibroblastos cardiacos que al ser cultivados adquieren el fenotipo de miofibroblastos, en nuestro trabajo los fibroblastos utilizados

fueron siempre del pasaje 1 y como observamos en las imágenes de la inmunofluorescencia (Figura 4), en la condición control no fueron inmunoreactivos para la presencia de la  $\alpha$ -SMA, lo cual nos indica que los FiC's no se encontraban en estado activado. Este efecto pudiera deberse a que nosotros utilizamos solo el primer pasaje de cultivo y en otros trabajos utilizan también pasajes posteriores hasta llegar incluso al sexto (Twardowski & Black, 2014; Zhu et al., 2013).

Con el antecedente de un trabajo realizado por Ramos-Mondragón en el 2012 donde se observó que la pirfenidona aumentaba la conductancia de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L en los cardiomiocitos, surgió la curiosidad por ver el efecto que tenía esta droga en los mecanismos de regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  descritos en el fibroblasto cardiaco, célula a la que se le atribuye el protagonismo del desarrollo de la fibrosis cardiaca. Chen et.al han identificado diversos mecanismos reguladores de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, mismos que hemos estudiado en este proyecto como posibles vías por las cuales la pirfenidona pudiera tener el efecto antifibrótico que lo caracteriza.

### **Efecto agudo de la pirfenidona en los niveles basales de $\text{Ca}^{2+}$ .**

Para el caso del efecto agudo, los resultados mostrados en la figura 5 evidencian que ante la aplicación de la pirfenidona, la concentración intracelular de calcio en los fibroblastos no cambia por lo cual se puede deducir que en condiciones controles, el tratamiento con pirfenidona no es capaz por si solo de modular la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . De la misma manera, los fibroblastos en condición de fibrosis inducida por la aplicación durante 48 horas de Ang II (100nM) tampoco mostraron cambios en la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la aplicación aguda de pirfenidona (figura 6) por lo cual podemos concluir que la pirfenidona no tiene una acción inmediata que involucre al  $\text{Ca}^{2+}$  para reducir o revertir a la fibrosis cardiaca. Existen diversos trabajos que abordan a la problemática de la fibrosis cardiaca usando a la pirfenidona como tratamiento donde se puede observar el efecto antifibrótico que tiene la droga cuando se aplica en periodos que van desde días a semanas, lo que hace constatar que es necesario un período de tiempo largo para poder apreciar los efectos de la droga (Lee et al., 2006; Miric et al., 2001; Mirkovic et al., 2002; Yamazaki et al., 2012). En tiempos de tratamiento más cortos, existe un trabajo donde se aplicó pirfenidona por 3 horas a una concentración de 178 $\mu\text{M}$  con el objetivo de valorar los cambios en los niveles de TNF- $\alpha$  sin obtener alguna diferencia importante y teniéndose que triplicar la concentración de este fármaco para lograr una respuesta significativa (Grattendick, Nakashima, Feng, Giri, & Margolin, 2008). Por todo esto no es de extrañarse que no se

vea un efecto agudo de esta droga en la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  tanto en los fibroblastos en condiciones normales como en los que están en una situación de fibrosis.

### **Efecto crónico de la pirfenidona en los mecanismos homeostáticos de $\text{Ca}^{2+}$ .**

Posteriormente, se quiso valorar si los mecanismos descritos en la literatura como los principales reguladores de  $\text{Ca}^{2+}$  en el fibroblasto cardiaco pudieran ver afectado su funcionamiento por efecto del tratamiento crónico con pirfenidona.

#### **Fibroblastos cardiacos en condiciones no fibróticas.**

Para las condiciones en los fibroblastos cardiacos en condiciones normales, es decir, sin tratamiento con Ang II existieron cambios bajo el tratamiento, tanto con losartán como con pirfenidona.

El tratamiento con pirfenidona en los fibroblastos en condiciones normales tuvo importantes repercusiones en los mecanismos de regulación del  $\text{Ca}^{2+}$ . Como se vio, existe un aumento del tiempo al pico en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  (fig. 11) posiblemente provocado por un aumento de la capacidad de extrusión del  $\text{Ca}^{2+}$  por parte de NCX y PMCA y una disminución de la eficacia de los receptores de IP3 para aumentar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Estos hechos, sin embargo varían si se analiza a los extrusores de manera individual donde se observa que la modulación de la fuga de calcio por PMCA y NCX generan un mayor porcentaje de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (fig. 26) y un mayor porcentaje de la cantidad total de  $\text{Ca}^{2+}$  liberada por la fuga del retículo endoplásmico cuando es modulada por NCX (fig. 27) en comparación con los fibroblastos control donde el porcentaje de estos parámetros es mayor, lo cual sugiere que NCX y PMCA ven aumentada su función cuando trabajan de manera conjunta y se ve disminuida cuando lo hacen de manera individual. Con respecto a la estimulación de los receptores IP3, hay una menor cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  liberada por la activación de estos receptores con la aplicación aguda de Ang II (fig. 33), lo que sugiere que existe una menor intervención de estos receptores, ya sea por su función, su expresión o el grado de activación a través de la vía de la PLC. Sumado a esto, con el aumento de la eficacia de NCX y PMCA de manera conjunta como extrusores, se puede explicar el mayor tiempo al pico y la mayor velocidad a la hora de regresar a la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  basal (fig. 33). Estos resultados son importantes ya que no existen trabajos en la literatura que aborden los efectos de la pirfenidona en estos mecanismos en ningún tipo celular lo cual pudiera servir de guía para otros trabajos como lo de Walter en el 2014 donde se estudian los efectos adversos de esta droga (Walter et al., 2014).

Por otra parte, en los fibroblastos tratados con losartán se observa que el tratamiento crónico provoca una mayor concentración y cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  entrante a través de los SOC (fig. 14). A su vez, se observa que al bloquear la actividad de la PMCA y favorecer solo la extrusión a través del NCX, existe un porcentaje menor de la cantidad total de  $\text{Ca}^{2+}$  presente en el citosol por la fuga del retículo endoplásmico lo que indicaría que NCX desaloja al  $\text{Ca}^{2+}$  de manera más eficaz bajo el tratamiento crónico con losartán (fig 27). Por otra parte, PMCA también ve aumentada su función bajo este tratamiento debido a que disminuye la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  alcanzada por la fuga del retículo endoplásmico (fig. 27). Estos resultados demuestran que el losartán tiene efectos en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  en el fibroblasto cardiaco en condiciones normales sobre la actividad de NCX y PMCA. Si bien existen cambios significativos, en estudios referentes a la viabilidad celular como el de Öztürk en el 2011, el losartán parece no tener un efecto apoptótico en los fibroblastos en condiciones normales y sus efectos van más encaminados a una disminución de la proliferación de estas células (Ozturk, Tezel, & Yalcin, 2011).

#### **Fibroblastos cardiacos en condiciones fibróticas.**

Para el caso de los fibroblastos cardiacos bajo condiciones de fibrosis, observamos que la Ang II modifica la actividad de algunos de los mecanismos homeostáticos del  $\text{Ca}^{2+}$ . En primera instancia, los resultados observados muestran que la Ang II tiene un efecto en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico aumentando el tiempo para alcanzar la concentración máxima y aumentando la velocidad de extrusión (fig. 9). Esto también coincide con el aumento en la velocidad de extrusión del  $\text{Ca}^{2+}$  durante la entrada del ion a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por el vaciamiento del RE, los SOC (fig.10). Con esto podemos deducir que la actividad del NCX y de PMCA como extrusores del  $\text{Ca}^{2+}$  se ve aumentada en los fibroblastos cardiacos en estado fibrótico. Otro punto importante a notar es que existe una menor activación de los receptores de IP3 como generadores del aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico debido a que el tiempo al pico se ve aumentado lo cual quiere decir que los fibroblastos cardiacos en situación de fibrosis presentan una menor actividad de sus receptores IP3 (fig. 32). Esto, combinado con el aumento de la función que presentan NCX y PMCA como extrusores de  $\text{Ca}^{2+}$  puede explicar parte del mayor tiempo al pico requerido en la fuga de calcio (fig.9). Con respecto a SOCE, el tratamiento con Ang II no ejerció cambios significativos en los parámetros medidos a excepción de la velocidad de extrusión del  $\text{Ca}^{2+}$  que se ve aumentada como lo fue en el caso de la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico (fig. 10). Por otra parte se puede observar que existe una disminución de la cantidad de calcio liberada por la fuga del retículo endoplásmico



bajo los efectos del Benzamil y Ortovanadato en comparación con el control (fig 27) lo que confirma que tanto PMCA como NCX tienen su actividad aumentada en el proceso de fibrosis.

Existe una limitada información de los procesos homeostáticos del  $\text{Ca}^{2+}$  bajo el efecto de moléculas precursoras de la fibrosis cardiaca como lo es la Ang II en el fibroblasto cardiaco, sin embargo si se ha visto esto en otras células como los cardiomiocitos donde la actividad de NCX se vio aumentada en las ratas que se sometieron a la colocación de una banda aórtica con el objetivo de generar en ellas una hipertrofia ventricular izquierda la cual vieron acompañada con un incremento del colágeno extracelular, una característica de la fibrosis cardiaca (Røe et al., 2017). Este hecho coincide con nuestros resultados donde se observa un aumento en la extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$  por este mecanismo. Estudios hechos en fibroblastos cardiacos hablan de la importancia de NCX en el desarrollo de la fibrosis. Kamimura y colaboradores en el 2012 encontraron que al inhibir a NCX, desaparecieron los efectos producidos por la administración continua de Ouabaína durante 14 semanas la cual desarrollo fibrosis del ventrículo izquierdo en ratas Sprague-Dawley (Kamimura et al., 2012). Ikeda en el 2013 observó que la Ang II y el TGF- $\beta$ 1 promovieron la proliferación de los fibroblastos cardiacos pero al usar KB-R7943 como inhibidor NCX, esto no sucedió (Ikeda et al., 2013). El mismo bloqueador fue usado por Raizman en el 2007 en ratas Sprague-Dawley donde vio que la motilidad y proliferación de los miofibroblastos fue disminuida (Raizman et al., 2007). Por otra parte, el efecto de la Ang II, como molécula profibrótica, en PMCA no ha sido reportado en fibroblastos cardiacos sin embargo, Axelband en el 2009 encontraron que la Ang II a concentraciones bajas ( $10^{-10}$  mol / l) inhibía la actividad de PMCA en un 50% y que al aplicar posteriormente una concentración alta de Ang II ( $5 \times 10^{-7}$  mol / L), la función de PMCA se recuperaba, esto en células del túbulo proximal del riñón de oveja (Axelband et al., 2009). En el fenómeno de hipertrofia se ve presente el desarrollo de la fibrosis cardiaca ocasionada, entre otras causas, por la diabetes. Liang en el 2014, comparó la eliminación de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de múltiples mecanismos en células beta de ratones diabéticos db / db y encontró un aumento de la actividad de PMCA y NCX, misma situación que pudiera extrapolarse con nuestros resultados obtenidos en los fibroblastos cardiacos (Liang et al., 2014). Con respecto a los receptores IP<sub>3</sub>, Bokkala 1997 vio que la estimulación crónica con Ang II dio como resultado una disminución de la expresión de los receptores de IP<sub>3</sub> tipo I y III en las células epiteliales del hígado de la rata WB (Bokkala & Joseph, 1997). Si bien, las células son diferentes a las estudiadas en este trabajo, el tipo de receptores coincide con los encontrados en los fibroblastos cardiacos (Chen y cols en el 2009). Zhang en el 2017

encontró en los fibroblastos ventriculares un aumento en la expresión de STIM1 y ORAI1, dos participantes clave en SOCE, tras la exposición a la Ang II (Zhang et al., 2016). Si bien, se ha visto que SOCE está implicada en la expresión de ciertas proteínas relacionadas con el desarrollo de la fibrosis (Ross et al., 2017), en nuestros resultados no encontramos un efecto significativo de la Ang II en los parámetros medidos de este mecanismo. Esto puede deberse a la cepa usada, que en nuestro caso, fue Long-Evans mientras que en los otros trabajos se usaron ratas de la cepa Sprague-Dawley, así también como el tiempo de cultivo, los pasajes celulares usados, la duración del tratamiento y la concentración de la droga.

El tratamiento con pirfenidona en los fibroblastos en situación de fibrosis parece revertir algunos de los efectos generados por la Ang II. Se puede observar que el tratamiento en la condición fibrótica genera una mayor concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  alcanzada por la fuga del retículo y un mayor tiempo requerido en la remoción del  $\text{Ca}^{2+}$  respectivamente así como la normalización del tiempo al pico (fig. 15), parámetro afectado por la Ang II. Con esto se puede decir que los sistemas de extrusión del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico ven disminuida su actividad, efecto opuesto en el caso de los fibroblastos cardiacos tratados con Ang II. Esto también explicaría lo mostrado en la estimulación de los receptores de IP3 donde se observa que también se normalizó el tiempo al pico (fig. 35). Si analizamos el efecto del tratamiento de manera individual en PMCA y NCX, encontramos que existe un menor porcentaje en la amplitud (fig. 26) y en la concentración generada por la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  (fig. 27) lo cual indicaría que la actividad individual de estos sistemas estaría aumentada por efecto de la pirfenidona. Esto puede deberse a que una subida abrupta de calcio por la inhibición de los otros sistemas de remoción de calcio permitiría una mayor activación de PMCA por parte de la calmodulina. Así mismo, NCX se ha visto que aumenta su capacidad de extrusión conforme aumenta la concentración de calcio. Ambos hechos explicarían porque hay mayor actividad extrusora si trabajan de manera individual que cuando trabajan de manera conjunta. Esto demuestra que el efecto antifibrótico de la pirfenidona con relación al  $\text{Ca}^{2+}$  está mediado principalmente por la actividad de los extrusores que como ya hemos descrito antes, se les cataloga como un importante mecanismo en el desarrollo de la fibrosis cardiaca ocasionada por diversas patologías y factores fibróticos (Axelband et al., 2009; Kamimura et al., 2012; Liang et al., 2014; Raizman et al., 2007; Røe et al., 2017).

Para el caso de los fibroblastos en condiciones de fibrosis tratados con losartán se observa que en los parámetros medidos tanto en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico como en SOCE (fig. 17-18), no

existe una diferencia significativa con respecto al control lo cual habla del efecto antifibrótico que tiene usando como mediador al  $\text{Ca}^{2+}$ . Al analizar a NCX y PMCA de manera independiente, se observa que ambos sistemas al trabajar de manera individual bajo el efecto del losartán aumentaron aún más la concentración de calcio por efecto de la Ang II (fig. 26) y en el caso de PMCA, se observa una mayor cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  liberada por la fuga del retículo endoplásmico (fig. 27) cuando actúa como extrusor principal lo cual está asociado al menor tiempo al pico que presenta (fig. 28), mostrando de esta manera que el losartán tiene un importante efecto en ambos sistemas de extrusión, sin embargo, parece que invierte el efecto ocasionado por la Ang II, disminuyendo la actividad de estos mecanismos, cuando trabajan en conjunto. Ya en la literatura existen trabajos que abordan el efecto del losartán sobre los mecanismos de regulación del calcio en diferentes células. Axelband encontró que el losartán no tiene efectos en la actividad PMCA cuando esta se ve aumentada por efecto de la Ang II en las células del tubo proximal del riñón (Axelband et al., 2009). Con respecto a NCX, su expresión podría disminuir por efecto del tratamiento con losartán ya que se ha visto una sobreexpresión bajo los efectos de Ang II (Liu et al., 2016). En los trabajos anteriormente mencionados, se ha demostrado que losartán es un importante agente anti-fibrótico debido a la capacidad bloqueadora del receptor AT-1 y que los efectos que pudiera tener en los mecanismos de regulación del calcio en el fibroblasto cardiaco estarían dados por este bloqueo.

Por último, se puede observar que el tratamiento combinado para revertir el efecto de la fibrosis en los fibroblastos cardiacos presenta características de los efectos encontrados con el uso de la pirfenidona y losartán. Se observa que el co-tratamiento aumenta la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  por la fuga del retículo endoplásmico y por SOCE (fig. 19-20), cosa que sucede en el tratamiento con pirfenidona en los fibroblastos en condiciones de fibrosis que como ya se explicó anteriormente, es consecuencia de la disminución de la actividad de PMCA y NCX en conjunto. Por otra parte, se nota una disminución en la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  liberada por los receptores IP3 provocada por la aplicación de la Ang II (fig. 37). Todo esto habla de un efecto potenciado por el uso de ambos fármacos.

En nuestros resultados se observa que, con respecto al  $\text{Ca}^{2+}$ , pirfenidona y losartán actúan disminuyendo la actividad de NCX y PMCA cuando trabajan de manera conjunta y aumentándola cuando lo hacen de manera individual lo cual podríamos asociarlo al efecto antifibrótico que ejercen. No se puede afirmar si los efectos sobre los mecanismos moduladores del calcio se vean afectados más por un fármaco con respecto al otro con los resultados obtenidos en este trabajo debido a que

cada uno afecta de manera diferente a los diferentes sistemas. Li y cols 2017 evaluó el efecto de ambas drogas en diversos marcadores fibróticos como el  $\alpha$ -SMA, el colágeno, entre otros y concluyó que tanto la pirfenidona como el losartán tienen un similar efecto cardioprotectivo (Li et al., 2017).

Por último, como se ha mencionado anteriormente, NCX juega un papel importante en la capacidad de los fibroblastos para desarrollar fibrosis. Existen más trabajos que establecen esta relación a parte de los ya descritos como lo son los trabajos de Nakamura y cols en 1998 o el de Sakamoto y cols en el 2009 (Ebashi & Sciences, 1998; Sakamoto et al., 2009). Sin embargo, es importante darle una mención especial al trabajo de Romero donde se observa que el bloqueo de NCX con Benzamil disminuyó los niveles de TGF-B1, una molécula potencialmente fibrótica (Romero et al., 2005). En la literatura muchos investigadores han concluido que el efecto más importante de la pirfenidona como molécula anti-fibrótica es la disminución de los efectos y expresión de TGF-B1 (Lee et al., 2006; Oku et al., 2008; Shimizu et al., 1998), sin embargo, el mecanismo por el cual logra esto es desconocido. Con base a los resultados obtenidos en este proyecto y estableciendo una relación con el trabajo de Romero, NCX puede estar relacionado con el efecto inhibitorio de TGF-B1 por parte de la pirfenidona y secundario a esto, el efecto antifibrótico que se le atribuye. Con respecto a PMCA, se sabe que la presencia de TGF-B1 aumenta la expresión de PMCA. El hecho de que la pirfenidona disminuya a TGF-B1 disminuiría la expresión de PMCA y por ende, disminuiría la actividad de PMCA que, como muestran nuestros resultados, se ve aumentada por Ang II (Kuo et al., 1997).

Si bien también se ha mencionado la participación de los canales TPR como un mecanismo regulador del  $\text{Ca}^{2+}$ , el TRPM7 que es el que se expresa en la fibroblastos, tiene un papel preponderante en la regulación del magnesio intracelular por sobre la del calcio. Su activación incrementa con la disminución del pH extracelular y por tal motivo, su presencia adquiere relevancia en proceso fisiopatológicos como la isquemia.

## CONCLUSIONES.

- La Ang II promueve la aparición de fibras de estrés de  $\alpha$ -SMA, un marcador característico de los miofibroblastos.
- Los fibroblastos cardiacos expresan de manera funcional a la SERCA, la PMCA y NCX, como principales mecanismos de extrusión de calcio, y a los receptores a IP3 y los SOC's como proteínas que permiten el aumento de calcio citosólico.
- La aplicación aguda de pirfenidona no provoca cambio en los niveles intracelulares de calcio.
- La aplicación crónica de pirfenidona modula la homeostasis de  $Ca^{2+}$  solo en los fibroblastos tratados con ANG II, aumentando la liberación de calcio, la entrada de calcio a través de los SOC y la extrusión del ion.
- El losartan aplicado de manera crónica modula la entrada de calcio y el proceso de extrusión del ión en los fibroblastos controles y tratados con ANG II.

## BIBLIOGRAFÍA.

- Avila, G., Osornio-Garduño, D. S., Ríos-Pérez, E. B., & Ramos-Mondragón, R. (2014). Functional and structural impact of pirfenidone on the alterations of cardiac disease and diabetes mellitus. *Cell Calcium*, *56*(5), 428–435. <http://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.07.008>
- Axelband, F., Assunção-Miranda, I., de Paula, I. R., Ferrão, F. M., Dias, J., Miranda, A., ... Vieyra, A. (2009). Ang-(3-4) suppresses inhibition of renal plasma membrane calcium pump by Ang II. *Regulatory Peptides*, *155*(1–3), 81–90. <http://doi.org/10.1016/j.regpep.2009.03.014>
- Baudino, T., & Carver, W. (2006). Cardiac fibroblasts: friend or foe? *American Journal of ...*, (30), 1015–1026. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00023.2006>.
- Bokkala, S., & Joseph, S. K. (1997). Angiotensin II-induced down-regulation of inositol trisphosphate receptors in WB rat liver epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(19), 12454–12461.
- Brilla, C. G., Funck, R. C., & Rupp, H. (2000). Patients With Hypertensive Heart Disease. *Methods*, 1388–1393.
- Brini, M., & Carafoli, E. (2011). The plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(2), 1–17. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a004168>
- Broberg, C. S., & Burchill, L. J. (2015). Myocardial factor revisited: The importance of myocardial fibrosis in adults with congenital heart disease. *International Journal of Cardiology*, *189*(1), 204–210. <http://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.04.064>
- Burstein, B., Libby, E., Calderone, A., & Nattel, S. (2008). Differential behaviors of atrial versus ventricular fibroblasts: A potential role for platelet-derived growth factor in atrial-ventricular remodeling differences. *Circulation*, *117*(13), 1630–1641. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.748053>
- Chen, J.-B., Tao, R., Sun, H.-Y., Tse, H.-F., Lau, C.-P., & Li, G.-R. (2009). Multiple  $\text{Ca}^{2+}$  signaling pathways regulate intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  activity in human cardiac fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology*, (November), n/a-n/a. <http://doi.org/10.1002/jcp.22010>
- Cho, M. E., & Kopp, J. B. (2010). Pirfenidone: an anti-fibrotic therapy for progressive kidney disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, *19*(2), 275–283. <http://doi.org/10.1517/13543780903501539>
- Chung, C. C., Kao, Y. H., Liou, J. P., & Chen, Y. J. (2014). Curcumin suppress cardiac fibroblasts activities by regulating proliferation, migration, and the extracellular matrix. *Acta Cardiologica Sinica*, *30*(5), 474–482.
- De Luca, A., Stefani, L., Pedrizzetti, G., Pedri, S., & Galanti, G. (2011). The effect of exercise training on left ventricular function in young elite athletes. *Cardiovascular Ultrasound*, *9*(1), 27. <http://doi.org/10.1186/1476-7120-9-27>
- Dobaczewski, M., Chen, W., & Frangogiannis, N. G. (2012). Transforming Growth Factor (TGF) beta signaling in Cardiac Remodeling. *J Mol Cell Cardiol*, *51*(4), 600–606. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.10.033>. Transforming
- Ebashi, S., & Sciences, P. (1998). Expression of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger emerges in hepatic stellate cells after activation in association with liver fibrosis, *95*(April), 5389–5394.

- Edgley, A. J., Krum, H., & Kelly, D. J. (2012). Targeting fibrosis for the treatment of heart failure: A role for transforming growth factor- $\beta$ . *Cardiovascular Therapeutics*, *30*(1), 30–40. <http://doi.org/10.1111/j.1755-5922.2010.00228.x>
- Fisher, M., Nathan, S. D., Hill, C., Marshall, J., Dejonckheere, F., Thuresson, P.-O., & Maher, T. M. (2017). Predicting Life Expectancy for Pirfenidone in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Journal of Managed Care & Specialty Pharmacy*, *23*(3–b Suppl), S17–S24. <http://doi.org/10.18553/jmcp.2017.23.3-b.s17>
- Furukawa, F., Matsuzaki, K., Mori, S., Tahashi, Y., Yoshida, K., Sugano, Y., ... Inoue, K. (2003). p38 MAPK mediates fibrogenic signal through Smad3 phosphorylation in rat myofibroblasts. *Hepatology*, *38*(4), 879–889. <http://doi.org/10.1053/jhep.2003.50384>
- Gabriel, V. A. (2009). Transforming growth factor-beta and angiotensin in fibrosis and burn injuries. *Journal of Burn Care & Research : Official Publication of the American Burn Association*, *30*(3), 471–81. <http://doi.org/10.1097/BCR.0b013e3181a28ddb>
- Grattendick, K. J., Nakashima, J. M., Feng, L., Giri, S. N., & Margolin, S. B. (2008). Effects of three anti-TNF-?? drugs: Etanercept, infliximab and pirfenidone on release of TNF-?? in medium and TNF-?? associated with the cell in vitro. *International Immunopharmacology*, *8*(5), 679–687. <http://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.01.013>
- Ikeda, K., Nakajima, T., Yamamoto, Y., Takano, N., Tanaka, T., Kikuchi, H., ... Komuro, I. (2013). Roles of transient receptor potential canonical (TRPC) channels and reverse-mode Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger on cell proliferation in human cardiac fibroblasts: Effects of transforming growth factor  $\beta$ 1. *Cell Calcium*, *54*(3), 213–225. <http://doi.org/10.1016/j.ceca.2013.06.005>
- Kakugawa, T., Mukae, H., Hayashi, T., Ishii, H., Abe, K., Fujii, T., ... Kohno, S. (2004). Pirfenidone attenuates expression of HSP47 in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal*, *24*(1), 57–65. <http://doi.org/10.1183/09031936.04.00120803>
- Kamimura, D., Ohtani, T., Sakata, Y., Mano, T., Takeda, Y., Tamaki, S., ... Yamamoto, K. (2012). Ca<sup>2+</sup> entry mode of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger as a new therapeutic target for heart failure with preserved ejection fraction. *European Heart Journal*, *33*(11), 1408–1416. <http://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr106>
- Karaahmet, T., Tigen, K., Dundar, C., Pala, S., Guler, A., Kilicgedik, A., ... Basaran, Y. (2010). The effect of cardiac fibrosis on left ventricular remodeling, diastolic function, and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *Echocardiography*, *27*(8), 954–960. <http://doi.org/10.1111/j.1540-8175.2010.01170.x>
- Kawano, H., Do, Y. S., Kawano, Y., Starnes, V., Barr, M., Law, R. E., & Hsueh, W. a. (2000). Angiotensin II has multiple profibrotic effects in human cardiac fibroblasts. *Circulation*, *101*(10), 1130–1137. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.101.10.1130>
- Kim, E. S., & Keating, G. M. (2015). Pirfenidone: A review of its use in idiopathic pulmonary fibrosis. *Drugs*, *75*(2), 219–230. <http://doi.org/10.1007/s40265-015-0350-9>
- Komiya, C., Tanaka, M., Tsuchiya, K., Shimazu, N., Mori, K., Furuke, S., ... Ogawa, Y. (2017). Antifibrotic effect of pirfenidone in a mouse model of human nonalcoholic steatohepatitis. *Scientific Reports*, *7*(February), 44754. <http://doi.org/10.1038/srep44754>
- Kong, P., Christia, P., & Frangogiannis, N. G. (2014). The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *71*(4), 549–574. <http://doi.org/10.1007/s00018-013-1349-6>

- Kumaran, C., & Shivakumar, K. (2002). Calcium- and superoxide anion-mediated mitogenic action of substance P on cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *282*(5), H1855-62. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00747.2001>
- Kuo, T. H., Liu, B. F., Yu, Y. J., Wuytack, F., Raeymaekers, L., & Tsang, W. (1997). Co-ordinated regulation of the plasma membrane calcium pump and the sarco(endo)plasmic reticular calcium pump gene expression by Ca<sup>2+</sup>. *Cell Calcium*, *21*(6), 399–408. [http://doi.org/10.1016/s0143-4160\(97\)90051-8](http://doi.org/10.1016/s0143-4160(97)90051-8)
- Lee, K. W., Everett IV, T. H., Rahmutula, D., Guerra, J. M., Wilson, E., Ding, C., & Olgin, J. E. (2006). Pirfenidone prevents the development of a vulnerable substrate for atrial fibrillation in a canine model of heart failure. *Circulation*, *114*(16), 1703–1712. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.624320>
- Li, C., Han, R., Kang, L., Wang, J., Gao, Y., Li, Y., ... Tian, J. (2017). Pirfenidone controls the feedback loop of the AT1R/p38 MAPK/renin-angiotensin system axis by regulating liver X receptor- $\alpha$  in myocardial infarction-induced cardiac fibrosis. *Scientific Reports*, *7*(June 2016), 40523. <http://doi.org/10.1038/srep40523>
- Liang, K., Du, W., Lu, J., Li, F., Yang, L., Xue, Y., ... Chen, L. (2014). Alterations of the Ca<sup>2+</sup> signaling pathway in pancreatic beta-cells isolated from db/db mice. *Protein & Cell*, *5*(10), 783–794. <http://doi.org/10.1007/s13238-014-0075-7>
- Liu, B., Yang, L., Zhang, B., Kuang, C., Huang, S., & Guo, R. (2016). NF- $\kappa$ B-Dependent Upregulation of NCX1 Induced by Angiotensin II Contributes to Calcium Influx in Rat Aortic Smooth Muscle Cells. *Canadian Journal of Cardiology*, *32*(11), 1356. <http://doi.org/10.1016/j.cjca.2016.02.060>
- López Salazar, B., Ravassa Albéniz, S., Arias Guedón, T., González Miqueo, A., Querejeta, R., & Díez Martínez, J. (2006). Alteraciones del metabolismo del colágeno fibrilar en la cardiopatía hipertensiva. Situación actual y perspectivas. *Revista Española de Cardiología*, *59*(10), 1047–1057. <http://doi.org/10.1157/13093982>
- Maclean, J., & Pasumarthi, K. B. S. (2014). Signaling mechanisms regulating fibroblast activation, phenoconversion and fibrosis in the heart. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, *51*(6), 476–482.
- Miric, G., Dallemagne, C., Endre, Z., Margolin, S., Taylor, S. M., & Brown, L. (2001). Reversal of cardiac and renal fibrosis by pirfenidone and spironolactone in streptozotocin-diabetic rats. *British Journal of Pharmacology*, *133*, 687–694. <http://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704131>
- Mirkovic, S., Seymour, A.-M. L., Fenning, A., Strachan, A., Margolin, S. B., Taylor, S. M., & Brown, L. (2002). Attenuation of cardiac fibrosis by pirfenidone and amiloride in DOCA-salt hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology*, *135*(4), 961–968. <http://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704539>
- Mullard, A. (2017). 2016 FDA drug approvals. *Nature Reviews Drug Discovery*, *16*(2), 73–76. <http://doi.org/10.1038/nrd.2017.14>
- Neuss, M., Regitz-Zagrosek, V., Hildebrandt, A., & Fleck, E. (1994). Human cardiac fibroblasts express an angiotensin receptor with unusual binding characteristics which is coupled to cellular proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.*, *204*(3), 1334–1339. <http://doi.org/S0006291X8472609X> [pii]
- Nguyen, D. T., Ding, C., Wilson, E., Marcus, G. M., & Olgin, J. E. (2010). Pirfenidone mitigates left ventricular fibrosis and dysfunction after myocardial infarction and reduces arrhythmias. *Heart Rhythm*, *7*(10), 1438–1445. <http://doi.org/10.1016/j.hrthm.2010.04.030>
- Oku, H., Shimizu, T., Kawabata, T., Nagira, M., Hikita, I., Ueyama, A., ... Arimura, A. (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), 400–408.



<http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.06.046>

- Olson, E. R., Shamhart, P. E., Naugle, J. E., & Meszaros, J. G. (2008). Angiotensin II-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation is mediated by protein kinase C?? and intracellular calcium in adult rat cardiac fibroblasts. *Hypertension*, *51*(3), 704–711. <http://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.098459>
- Ozturk, C. N., Tezel, E., & Yalcin, O. (2011). Evaluation of Effects of Losartan on Random Pattern Skin Flap Model of Rats. *Turkish Journal of Trauma and Emergency Surgery*, *17*(2), 97–102. <http://doi.org/10.5505/tjtes.2011.98958>
- Porter, K. E., & Turner, N. A. (2009). Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling. *Pharmacology and Therapeutics*, *123*(2), 255–278. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.05.002>
- Raizman, J. E., Komljenovic, J., Chang, R., Deng, C., Bedosky, K. M., Rattan, S. G., ... Dixon, I. M. C. (2007). The participation of the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger in primary cardiac myofibroblast migration, contraction, and proliferation. *Journal of Cellular Physiology*, *213*(2), 540–551. <http://doi.org/10.1002/jcp.21134>
- Ramires, F. J., Sun, Y., & Weber, K. T. (1998). Myocardial fibrosis associated with aldosterone or angiotensin II administration: attenuation by calcium channel blockade. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *30*(3), 475–83. <http://doi.org/10.1006/jmcc.1997.0612>
- Ramos-Mondragón, R., Galindo, C. A., García-Castañeda, M., Sánchez-Vargas, J. L., Vega, A. V., Gómez-Viquez, N. L., & Avila, G. (2012). Chronic potentiation of cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels by pirfenidone. *Cardiovascular Research*, *96*(2), 244–254. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvs248>
- Røe, Å. T., Aronsen, J. M., Skårdal, K., Hamdani, N., Linke, W. A., Danielsen, H. E., ... Louch, W. E. (2017). Increased passive stiffness promotes diastolic dysfunction despite improved Ca<sup>2+</sup> handling during left ventricular concentric hypertrophy. *Cardiovascular Research*, (C), 1161–1172. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvx087>
- Romero, R., Rivera, A., Lanc, V., Bicho, M. D. P., Conlin, P. R., & Ricupero, D. A. (2005). Na<sup>+</sup> / Ca<sup>2+</sup> Exchanger Activity Modulates Connective Tissue Growth Factor mRNA Expression in Transforming Growth Factor  $\alpha$ 1- and, *280*(15), 14378–14384. <http://doi.org/10.1074/jbc.M410052200>
- Ross, G. R., Bajwa, T., Edwards, S., Emelyanova, L., Rizvi, F., Holmuhamedov, E. L., ... Jahangir, A. (2017). Enhanced store-operated Ca<sup>2+</sup> influx and ORA1 expression in ventricular fibroblasts from human failing heart. *Biology Open*, *1*(414), bio.022632. <http://doi.org/10.1242/bio.022632>
- Roubille, F., Busseuil, D., Merlet, N., Kritikou, E. A., Rhéaume, E., & Tardif, J.-C. (2014). Investigational drugs targeting cardiac fibrosis. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, *12*(1), 111–25. <http://doi.org/10.1586/14779072.2013.839942>
- Sakamoto, K., Owada, Y., Shikama, Y., Wada, I., Waguri, S., Iwamoto, T., & Kimura, J. (2009). Involvement of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in migration and contraction of rat cultured tendon fibroblasts. *The Journal of Physiology*, *587*(Pt 22), 5345–5359. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.172080>
- Salazar, B. L., Miqueo, A. G., López, Í. L., Iraola, R. Q., & Martínez, J. D. (2006). Consecuencias clínicas de la fibrosis miocárdica en la cardiopatía hipertensiva. *Hipertensión*, *23*(2), 57–62. [http://doi.org/10.1016/S0212-8241\(06\)71723-6](http://doi.org/10.1016/S0212-8241(06)71723-6)
- Schaefer, C. J., Ruhrmund, D. W., Pan, L., Seiwert, S. D., & Kossen, K. (2011). Antifibrotic activities of pirfenidone in animal models. *European Respiratory Review*, *20*(120), 85–97.

<http://doi.org/10.1183/09059180.00001111>

- Schiller, M., Javelaud, D., & Mauviel, A. (2004). TGF- $\beta$ -induced SMAD signaling and gene regulation: Consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *Journal of Dermatological Science*, *35*(2), 83–92. <http://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2003.12.006>
- Segura, A. M., Frazier, O. H., & Buja, L. M. (2014). Fibrosis and heart failure. *Heart Failure Reviews*, *19*(2), 173–185. <http://doi.org/10.1007/s10741-012-9365-4>
- Shimizu, T., Kuroda, T., Hata, S., Fukagawa, M., Margolin, S. B., & Kurokawa, K. (1998). Pirfenidone improves renal function and fibrosis in the post-obstructed kidney. *Kidney International*, *54*(1), 99–109. <http://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.00962.x>
- Sun, B., Ma, J. Z., Yong, Y. H., & Lv, Y. Y. (2007). The upper limit of physiological cardiac hypertrophy in elite male and female athletes in China. *European Journal of Applied Physiology*, *101*(4), 457–463. <http://doi.org/10.1007/s00421-007-0517-5>
- Twardowski, R. L., & Black, L. D. (2014). Cardiac Fibroblasts Support Endothelial Cell Proliferation and Sprout Formation but not the Development of Multicellular Sprouts in a Fibrin Gel Co-Culture Model. *Annals of Biomedical Engineering*, *42*(5), 1074–1084. <http://doi.org/10.1007/s10439-014-0971-2>
- Villarreal, F. J., Kim, N. N., Ungab, G. D., Printz, M. P., & Dillman, W. H. (1993). Identification of Functional Angiotensin II Receptors on Rat Cardiac Fibroblasts. *Circulation*, *88*(6), 2849–2861.
- Vliegenhart, H. W., van der Laarse, a, Cornelisse, C. J., & Eulerink, F. (1991). Myocardial changes in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. A study on tissue composition, polyploidization and multinucleation. *European Heart Journal*, *12*(4), 488–494.
- Walter, R. F. H., Zarogoulidis, P., Mairinger, F. D., Werner, R., Darwiche, K., Zarogoulidis, K., & Freitag, L. (2014). Cell viability of fibroblasts to pifenidone and sirolimus: A future concept for drug eluting stents. *International Journal of Pharmaceutics*, *466*(1–2), 38–43. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.03.003>
- Yamazaki, T., Yamashita, N., Izumi, Y., Nakamura, Y., Shiota, M., Hanatani, A., ... Yoshiyama, M. (2012). The antifibrotic agent pirfenidone inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. *Hypertension Research*, *35*(1), 34–40. <http://doi.org/10.1038/hr.2011.139>
- Yu, Y., Chen, S., Xiao, C., Jia, Y., Guo, J., Jiang, J., & Liu, P. (2014). TRPM7 is involved in angiotensin II induced cardiac fibrosis development by mediating calcium and magnesium influx. *Cell Calcium*, *55*(5), 252–260. <http://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.02.019>
- Yue, L., Xie, J., & Nattel, S. (2011). Molecular determinants of cardiac fibroblast electrical function and therapeutic implications for atrial fibrillation. *Cardiovascular Research*, *89*(4), 744–753. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvq329>
- Zhang, B., Jiang, J., Yue, Z., Liu, S., Ma, Y., Yu, N., ... Liu, P. (2016). Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry (SOCE) contributes to angiotensin II-induced cardiac fibrosis in cardiac fibroblasts. *Journal of Pharmacological Sciences*, *132*(3), 171–180. <http://doi.org/10.1016/j.jphs.2016.05.008>
- Zhu, F., Li, Y., Zhang, J., Piao, C., Liu, T., Li, H.-H., & Du, J. (2013). Senescent Cardiac Fibroblast Is Critical for Cardiac Fibrosis after Myocardial Infarction. *PLoS ONE*, *8*(9), e74535. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0074535>