



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

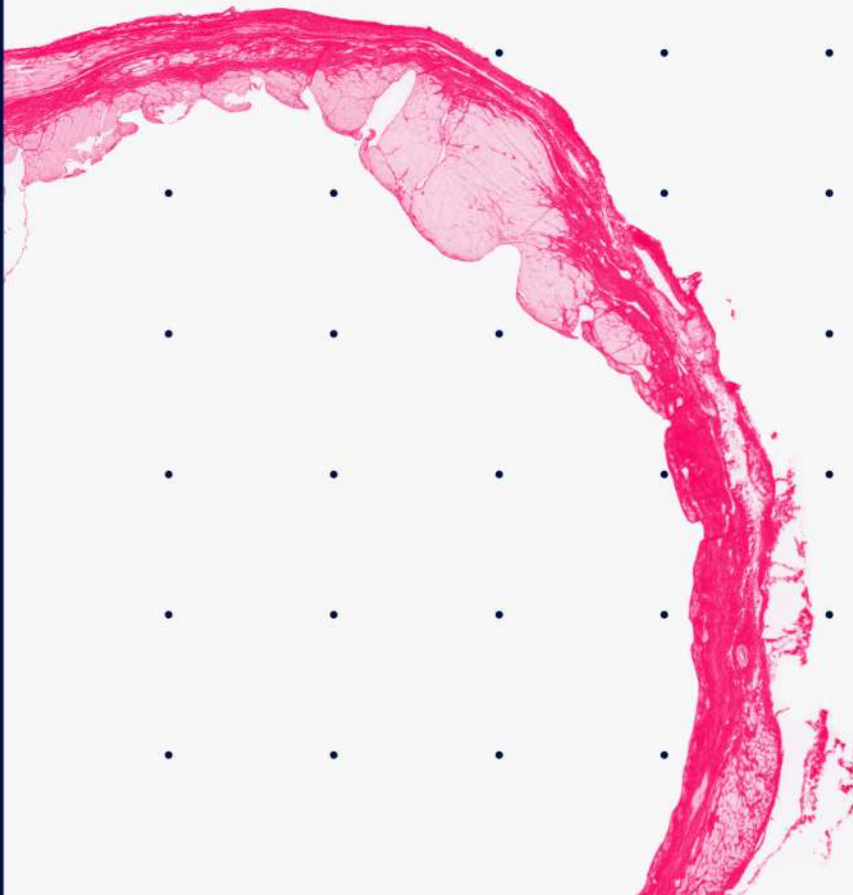
**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

LA INHIBICIÓ DE LES PROTEASES  
**CALPAÏNES** COM A ESTRATÈGIA  
FARMACOLÒGICA EN EL TRACTAMENT  
DEL REMODELAT VENTRICULAR

**David Aluja González**

Tesi doctoral. Barcelona, 2021







**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
DEPARTAMENT DE MEDICINA**

**TESI DOCTORAL**

**LA INHIBICIÓ DE LES PROTEASES CALPAÏNES COM A  
ESTRATÈGIA FARMACOLÒGICA EN EL TRACTAMENT DEL  
REMODELAT VENTRICULAR.**

Tesi presentada per David Aluja González per optar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona

Directors:                      Javier Inserte Igual  
   David García-Dorado † (2015-2019)

Tutor:                              Ignacio Ferreira González

Tesi adscrita al Programa de Doctorat en Medicina del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Barcelona, 2021



## Agraïments

Escric aquestes línies durant les últimes hores del que ha sigut l'any més estrany de la meua vida. Sí, un any per oblidar en molts aspectes, però sempre se'n poden treure notes positives. En el meu cas, és clar, la present tesi. Lluny queda la primera vegada que vaig creuar la porta del laboratori de malalties cardiovasculars. Durant el camí m'he creuat amb moltes persones que han fet que aquesta experiència hagi sigut meravellosa, i a les quals haig d'agrair moltes coses.

No puc començar agraint sinó al Dr. David Garcia-Dorado, co-director d'aquesta tesi i director del laboratori de Malalties Cardiovasculars. Malauradament, no podrà veure la publicació d'aquesta tesi, però penso que estaria orgullós del que hem aconseguit. Una de les persones més professionals i apassionades per la seva feina que mai he conegut i de les que més vaig aprendre (impossible oblidar les seves metàfores). Els seus ensenyaments, la seva feina i la seva dedicació estan plasmades en totes les pàgines d'aquesta tesi. També agraeixo, per suposat, al Dr. Ignacio Ferreira la seva amabilitat per haver acceptat agafar el relleu i ser tutor d'aquesta tesi.

Igual d'important ha sigut l'incansable ajuda del Dr. Javier Inserte, co-director també d'aquesta tesi. Tot el meu agraïment per haver dipositat la confiança en mi per aprendre tots els models experimentals que s'han desenvolupat en aquesta tesi, per haver sigut comprensiu amb els meus errors i per haver tingut paciència per resoldre tots els meus dubtes. Malgrat ser jo un mar de calma i ell un sac de nervis, puc afirmar sense cap dubte que hem fet un gran equip. Aquesta tesi no hagués sigut possible sense ell.

També m'agradaria donar les gràcies al Dr. Federico Mayor i a la Dra. Petronila Penela, pertanyents al Departamento de Biología Molecular y Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (UAM-CSIC), ja que gràcies a la cessió dels seus ratolins i a la seva col·laboració s'ha pogut desenvolupar una de les parts que conforma aquesta tesi.

Gràcies a tots als companys de laboratori, a tots i cadascun un d'ells, que han fet que anar a treballar fos una alegria. Començant per la Laura i la Marta, les quals van iniciar la cursa amb mi i van acabar molt més ràpid que jo, fent-me quedar com un lent. Compartir doctorat amb elles ha sigut una sort. Gràcies també al Marcos, per ensenyar-me tot el que sabia d'animals i de la vida, i a la Úrsula, la meua persona de referència des que vaig aterrar al laboratori. Gràcies al Jose, de qui he après ciència i música a parts iguals. Gràcies a tots els companys que han estat, estan o han arribat al laboratori, Amanda, Andrea, Ángeles, Antonio, Begoña, Diana, Eli, Ignasi, Juanjo, Kelly, Laia, Marisol, Marta i Tere.

Molts estudiants han passat durant aquests anys pel laboratori, tots iguals de joves mentre jo m'anava fent cada cop més gran. Agraeixo a la Laura Ramos, la Natalia Jordà, l'Ana Sánchez i, especialment, a la Sara Delgado, que recull el meu testimoni i a qui desitjo que tingui la mateixa sort que jo. Aquesta tesi també té una mica de totes elles. Le agradezco también a Camila, mi amistad más internacional, todas las bonitas charlas que compartimos.

Sortint del laboratori, però no gaire més lluny, haig d'agrair a l'**Anna**, la Isa i la Raquel tots els moments de riures, converses, desconexió, desfogament i cafès (molts cafès). El VHIR se'm fa més avorrit sense vosaltres. Gràcies per la vostra amistat.

Segurament he passat les mateixes hores a l'estabulari que al laboratori, així que haig d'agrair a tot el personal que hi treballa, que m'ha fet la vida més fàcil i que m'han ajudat en tot moment. Menció especial per la Marina, a qui he donat la tabarra constantment amb milers de CEEAs, consultes veterinàries, problemes de logística i mudances varies i sempre m'ha ajudat en tot amb un somriure a la cara.

Fora del VHIR també hi ha molta gent a qui haig d'agrair alguna cosa. Gràcies a l'Elena i la Isa per tots els viatges i aventures que hem viscut, gràcies pel suport en els moments dolents i l'alegria en els bons, gràcies per estar a prop encara que ara estiguem lluny. Gràcies al meu grup d'amics "de tota la vida" que sempre s'interessen per la meva tesi, encara que després només recordin que treballo amb ratolins. Gràcies a l'Amparo per haver aparegut a la meua vida, pels seus ànims constants durant l'escriptura d'aquestes pàgines i per ser el meu oposat ideal.

Dedico l'últim paràgraf a la meua família, la meua mare, el meu pare i el meu germà. Ells han estat els meus fans número 1 i gràcies al seu suport he pogut arribar fins aquí. Segurament tenen inclús més ganes que jo de poder llegir aquestes pàgines i veure que carai he fet durant tots aquests anys. Gràcies per la vostra comprensió i paciència infinita.







## Abreviatures

<b>ANP</b>	Pèptid natriurètic auricular
<b>AngII</b>	Angiotensina II
<b><math>\beta</math>-AR</b>	Receptor $\beta$ -adrenègic
<b>ARAI</b>	Antagonista del receptor d'angiotensina II
<b>AT<sub>1</sub>R</b>	Receptor d'angiotensina II
<b>BNP</b>	Pèptid natriurètic tipus B
<b>CAST</b>	Calpastatina
<b>CaM</b>	Calmodulina
<b>CAMKII</b>	Cinasa dependent de calci/calmodulina tipus II
<b>DAMP</b>	Patrons moleculars associats al perill
<b>ERK</b>	Cinasa regulada per senyals extracel·lulars
<b>ET<sub>A</sub>R</b>	Receptor d'endotelina
<b>FBS</b>	Sèrum fetal boví
<b>GPI</b>	Glicosilfosfatidilinositol
<b>GPRC</b>	Receptor acoblats a proteïnes G
<b>GRK2</b>	Cinasa 2 dels receptors acoblats a proteïnes G
<b>GSK-3</b>	Glicogen sintasa cinasa 3
<b>HDAC4</b>	Histona deacetilasa 4
<b>IAM</b>	Infart agut de miocardi
<b>IC</b>	Insuficiència cardíac
<b>IECA</b>	Inhibidor enzima convertidora d'angiotensina
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	Inhibidor del factor nuclear $\kappa$ B
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina-1 $\beta$
<b>iSGLT2</b>	Inhibidor del cotransportador de sodi-glucosa de tipus 2
<b>JPH2</b>	Junctofilina 2
<b>KO</b>	<i>Knockout</i>
<b>LAD</b>	Artèria descendent anterior
<b><math>\beta</math>-MHC</b>	Isoforma $\beta$ de la cadena pesada de la miosina
<b>MEF-2</b>	Factor potenciador de miòcits 2
<b>MMP</b>	Metaloproteïna de la matriu
<b>MRA</b>	Antagonista del receptor de mineralocorticoides
<b>mPTP</b>	Porus de transició mitocondrial
<b>mTOR</b>	Diana de la rapamicina en mamífers
<b>NFAT</b>	Factor nuclear de cèl·lules T activades
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres kappa de les cèl·lules B activades
<b>eNOS</b>	Sintasa d'òxid nítric endotelial
<b>PBS</b>	Tampó fosfat salí
<b>PEG-400</b>	Polietilenglicol-400
<b>PI</b>	Fosfatidilinositol
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat
<b>PKA</b>	Proteïna cinasa A
<b>PKC</b>	Proteïna cinasa C

<b>PKG</b>	Proteïna cinasa G
<b>PKM</b>	Proteïna cinasa M
<b>PLC</b>	Fosfolipassa C
<b>PLN</b>	Fosfolamban
<b>RAS</b>	Sistema renina-angiotensina
<b>ROS</b>	Espècies reactives d'oxigen
<b>RyR</b>	Canals de rianodina
<b>SEM</b>	Error estàndard de la mitjana
<b>SERCA</b>	ATPasa de Ca <sup>2+</sup> del reticle sarcoplàsmic
<b>α-SMA</b>	Alfa actina de múscul llis
<b>TAC</b>	Constricció aòrtica transversal
<b>TGF-β1</b>	Factor de creixement transformant β1
<b>TIMP</b>	Inhibidor de metaloproteinasa de la matriu
<b>TNF-α</b>	Factor de necrosi tumoral α
<b>TTC</b>	Clorur de 2,3,5-trifeniltetrazoli
<b>UPR</b>	Resposta a proteïnes sense plegar
<b>VEGF</b>	Factor de creixement endotelial vascular
<b>WT</b>	<i>Wild Type</i>

## ÍNDIX

<b>RESUM</b> .....	<b>13</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>15</b>
<b>1) INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>17</b>
<b>1.1) Remodelat ventricular advers i insuficiència cardíaca. Importància del problema</b> .....	<b>19</b>
1.1.1) Remodelat ventricular advers d'origen isquèmic .....	21
1.1.1.1) Infart agut de miocardi i dany per reperfusió.....	21
1.1.1.2) Mecanismes cel·lulars i moleculars del dany per reperfusió .....	22
1.1.1.3) Remodelat ventricular postinfart .....	23
1.1.2) Remodelat ventricular advers d'origen no isquèmic .....	25
<b>1.2) Canvis i vies de senyalització associats al remodelat cardíac</b> .....	<b>25</b>
1.2.1) Canvis moleculars.....	25
1.2.2) Canvis cel·lulars .....	27
1.2.3) Alteracions estructurals .....	28
1.2.4) Mecanismes implicats en el remodelat advers .....	29
1.2.4.1) Angiotensina II i endotelina 1 .....	29
1.2.4.2) Catecolamines .....	30
1.2.4.3) Mecanosensors .....	31
1.2.4.4) Via de senyalització NF- $\kappa$ B.....	31
<b>1.3) Estratègies i teràpies farmacològiques contra el remodelat patològic cardíac i insuficiència cardíaca</b> .....	<b>32</b>
<b>1.4) Calpaïnes</b> .....	<b>33</b>
1.4.1) Isoformes, estructura i expressió .....	34
1.4.2) Mecanismes d'activació i regulació .....	35
1.4.2.1) Calci.....	36
1.4.2.2) Calpastatina.....	37
1.4.2.3) Modificacions post-traduccionals.....	38
1.4.3) Funcions fisiològiques de les calpaïnes .....	38
1.4.4) Patologies amb alteracions en l'activitat de les calpaïnes.....	40
1.4.4.1) Evidències de la contribució de les calpaïnes al dany agut per reperfusió .....	40
1.4.4.2) Evidències de la participació de les calpaïnes en el remodelat ventricular .....	42
1.4.5) La inhibició farmacològica de les calpaïnes en el tractament del remodelat .....	44
1.4.5.1) Nous inhibidors de la calpaïna: SNJ-1945 i NPO-2270.....	45
<b>2) HIPÒTESI</b> .....	<b>47</b>
<b>3) OBJECTIUS</b> .....	<b>51</b>

<b>4) MATERIALS I MÈTODES .....</b>	<b>55</b>
<b>4.1) Models experimentals.....</b>	<b>57</b>
4.1.1) Inhibidors de les calpaïnes .....	57
4.1.2) Animals.....	57
4.1.3) Infart de miocardi <i>ex vivo</i> . Perfusió de cor aïllat de rata en Langendorff.....	57
4.1.3.1) Efecte del SNJ-1945 en l'activació de la calpaïna i el dany per reperfusió.....	58
4.1.4) Infart de miocardi <i>in vivo</i> . Isquèmia-reperfusió en rata i ratolí .....	59
4.1.4.1) Efecte de l'administració oral de SNJ-1945 en l'activació de la calpaïna .....	61
4.1.4.2) Efecte de l'administració intraperitoneal de SNJ-1945 en l'activació de la calpaïna i la mida de l'infart .....	61
4.1.5) Remodelat ventricular advers postinfart en rata i ratolí .....	62
4.1.5.1) Efecte de l'administració de SNJ-1945 en l'activació de la calpaïna durant la fase aguda i crònica de la reperfusió .....	63
4.1.5.2) Efecte de l'administració de SNJ-1945 en la inflamació durant la fase aguda de la reperfusió .....	63
4.1.5.3) Efecte de l'administració de NPO-2270 en l'activació de la calpaïna durant la fase aguda i crònica de la reperfusió .....	63
4.1.6) Model d'estimulació neurohormonal amb isoproterenol .....	64
4.1.6.1) Efecte de l'administració de SNJ-1945 en l'activació de la calpaïna en el remodelat induït per isoproterenol .....	64
4.1.7) Model d'estimulació neurohormonal amb angiotensina II .....	65
4.1.7.1) Efecte de l'administració de l'inhibidor de les calpaïnes NPO-2270 en el remodelat induït per angiotensina II .....	65
4.1.8) Model de sobrecàrrega de pressió induït per constricció aòrtica transversal (TAC) ....	66
4.1.8.1) Efecte de l'administració de NPO-2270 en el remodelat induït per constricció aòrtica transversal (TAC) .....	67
4.1.9) Cultiu de fibroblasts .....	67
4.1.9.1) Efecte del SNJ-1945 en l'activació de fibroblast cardíacs aïllats per TGF- $\beta$ 1 .....	68
<b>4.2) Tècniques d'anàlisi.....</b>	<b>68</b>
4.2.1) Ecocardiografia.....	68
4.2.2) Mesura de la lactat deshidrogenasa.....	68
4.2.3) Mesura de l'àrea en risc i mida de l'infart .....	69
4.2.4) Mesures histològiques i immunohistoquímica .....	70
4.2.5) Fraccionament cel·lular. Obtenció de la fracció nuclear .....	71
4.2.6) Western blot .....	71
4.2.7) Real Time qPCR .....	73
4.2.8) Quantificació de l'activitat calpaïna <i>in vitro</i> .....	74
4.2.9) Activitat calpaïna en fibroblasts .....	74
4.2.10) Mesura de col·lagen .....	75

4.2.11) Zimografia .....	75
4.2.12) Anàlisi dels nivells d'ubiquitinització de MDM2 .....	76
4.2.13) Anàlisi dels nivells de poliubiquitinització de GRK2 .....	76
4.2.14) Anàlisi estadístic.....	77
<b>5) RESULTATS .....</b>	<b>79</b>
<b>5.1) Caracterització del SNJ-1945: estudi de dosis i especificitat .....</b>	<b>81</b>
5.1.1) Estudi de dosis en cors aïllats sotmesos a isquèmia-reperfusió .....	81
5.1.2) Estudi de dosis en rates sotmeses a isquèmia-reperfusió.....	81
5.1.3) El SNJ-1945 no inhibeix l'activitat de la MMP-2 .....	82
<b>5.2) Caracterització del NPO-2270: estudi de dosis.....</b>	<b>83</b>
5.2.1) La potència inhibidora del NPO-2270 és superior a la del SNJ-1945 .....	83
<b>5.3) L'administració intraperitoneal de SNJ-1945 o NPO-2270 just abans de la reperfusió redueix la mida de l'infart .....</b>	<b>85</b>
<b>5.4) Paper de les calpaïnes en el remodelat ventricular postinfart.....</b>	<b>87</b>
5.4.1) L'administració oral i retardada del SNJ-1945 atenua l'activació de la calpaïna .....	87
5.4.2) L'administració oral i crònica de SNJ-1945 o NPO-2270 atenua el remodelat postinfart .....	88
5.4.2.1) L'administració crònica però no aguda de SNJ-1945 limita la hipertròfia dels cardiomiòcits al miocardi no infartat .....	91
5.4.2.2) L'administració crònica però no aguda de SNJ-1945 limita la deposició de col·lagen intersticial al miocardi no infartat .....	92
5.4.2.3) La inhibició de les calpaïnes redueix l'activació dels fibroblasts i la producció de col·lagen .....	94
5.4.2.4) La inhibició de les calpaïnes atenua la infiltració de cèl·lules inflamatòries en el miocardi isquèmic i remot.....	95
5.4.3) L'administració oral de SNJ-1945 atenua l'activació de NF-κB .....	97
<b>5.5) Paper de les calpaïnes en el remodelat induït per isoproterenol.....</b>	<b>98</b>
5.5.1) L'administració crònica d'isoproterenol indueix l'activació de les calpaïnes en rates ..	98
5.5.2) L'administració oral i crònica de SNJ-1945 atenua el remodelat induït per isoproterenol en rates.....	100
5.5.2.1) L'administració de SNJ-1945 limita la hipertròfia dels cardiomiòcits al miocardi	100
5.5.2.2) L'administració de SNJ-1945 limita la deposició de col·lagen intersticial al miocardi .....	102
5.5.3) La hipertròfia induïda per isoproterenol i dependent de calpaïna està mediada per GRK2.....	103
5.5.3.1) La inhibició de les calpaïnes preveu l'increment dels nivells de GRK2 induït per isoproterenol.....	103
5.5.3.2) La deleció de GRK2 atenua la hipertròfia induïda per isoproterenol en ratolins.	104
5.5.3.3) L'activació de la calpaïna regula els nivells de GRK2 .....	105

5.5.3.3.1) L'activació de la calpaïna disminueix la degradació de GRK2 .....	105
5.5.3.3.2) L'activació de la calpaïna incrementa l'expressió de GRK2 .....	109
<b>5.6) Contribució de les calpaïnes en el remodelat induït per angiotensina II .....</b>	<b>110</b>
5.6.1) L'administració oral i crònica de NPO-2270 atenua el remodelat induït per angiotensina II .....	110
5.6.1.1) L'administració crònica de NPO-2270 limita la deposició de col·lagen intersticial al miocardi .....	112
<b>5.7) Contribució de les calpaïnes en el remodelat induït per constricció aòrtica transversal</b>	<b>112</b>
5.7.1) L'administració oral, crònica i retardada de NPO-2270 atenua el remodelat induït per constricció aòrtica transversal.....	112
5.7.1.1) L'administració oral, crònica i retardada de NPO-2270 limita la deposició de col·lagen intersticial induïda per constricció aòrtica transversal .....	114
<b>6) DISCUSSIÓ .....</b>	<b>115</b>
<b>6.1) Models experimentals de remodelat ventricular i insuficiència cardíaca .....</b>	<b>117</b>
<b>6.2) L'activació de les calpaïnes és una característica general del remodelat ventricular ....</b>	<b>118</b>
<b>6.3) La inhibició de les calpaïnes immediatament abans de la reperfusió redueix la mida de l'infart.....</b>	<b>119</b>
<b>6.4) La inhibició farmacològica de les calpaïnes limita el remodelat i disfunció ventricular postinfart .....</b>	<b>119</b>
<b>6.5) Les calpaïnes participen en el procés de remodelat ventricular d'origen no isquèmic..</b>	<b>122</b>
<b>6.6) Paper de GRK2 en el remodelat ventricular induït per administració d'isoproterenol..</b>	<b>123</b>
<b>6.7) Evolució de la inhibició farmacològica de les calpaïnes.....</b>	<b>126</b>
<b>7) CONCLUSIONS .....</b>	<b>129</b>
<b>8) LÍNIES DE FUTUR.....</b>	<b>133</b>
<b>9) BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>137</b>

## Resum

La insuficiència cardíaca (IC) crònica representa una de les principals causes de morbiditat i mortalitat mundial. Els canvis estructurals i funcionals que caracteritzen el remodelat cardíac que es produeix en resposta a qualsevol estímul patològic crònic s'associen causalment amb el desenvolupament de la IC. Malauradament, tot i el gran impacte social i econòmic que té aquesta malaltia, els actuals tractaments de la IC tenen una eficàcia insuficient, fet que fa necessari trobar noves dianes i estratègies que limitin la progressió del remodelat ventricular i aparició de IC.

Les calpaïnes, proteases dependents de calci ( $Ca^{2+}$ ), es sobreactiven durant la isquèmia-reperfusió cardíaca, i contribueixen a la mort dels cardiomiòcits associada a la reperfusió del miocardi i per tant a la mida de l'infart. Estudis previs amb animals transgènics proposen que les calpaïnes també podrien estar involucrades en el remodelat postinfart i la seva progressió a IC. De la mateixa manera, dades recents suggereixen que l'activitat de les calpaïnes es troba augmentada en cardiomiopaties no isquèmiques. Tot i les evidències existents, un nombre molt limitat d'estudis pre-clínic ha examinat els efectes de la inhibició farmacològica de les calpaïnes en el remodelat ventricular degut principalment a la manca d'inhibidors apropiats.

L'objectiu principal d'aquesta tesi ha estat caracteritzar la contribució de les calpaïnes als processos de remodelat cardíac tant d'origen isquèmic com no isquèmic, definir els mecanismes responsables i avaluar l'eficàcia de la inhibició farmacològica de les calpaïnes com a nou tractament contra el remodelat ventricular i IC fent servir dues noves molècules, SNJ-1945 i NPO-2270.

La primera part de la tesi avalua els efectes de la inhibició farmacològica de les calpaïnes, portada a terme amb l'administració aguda i crònica per via oral dels dos inhibidors, sobre el remodelat postinfart desenvolupat en un model d'oclusió transitòria de l'artèria descendent anterior. Un primer estudi en rates mascle Sprague-Dawley ha testat el SNJ-1945, un inhibidor amb millores farmacodinàmiques respecte a inhibidors clàssics cedit pels laboratoris Senju Pharmaceutical, i un segon estudi dut a terme en ratolins C57BL/6 ha analitzat el nou inhibidor NPO-2270, cedit per Landsteiner Genmed, que presenta una potència i selectivitat superiors a les del SNJ-1945.

Els resultats obtinguts demostren que el remodelat postinfart correlaciona amb un increment en l'expressió i activitat tant de la calpaïna 1 com de la calpaïna 2 i una disminució dels nivells del seu inhibidor endogen, la calpastatina. L'administració aguda i crònica de SNJ-1945 va atenuar l'activació de les calpaïnes, va reduir l'expansió de la cicatriu i la dilatació i disfunció ventricular. El tractament agut va reduir la mida de l'infart i la resposta inflamatòria associada. El tractament crònic però no l'agut va atenuar la hipertròfia dels cardiomiòcits i la infiltració de col·lagen en el miocardi no infartat als 21 dies de reperfusió. Aquests resultats van correlacionar-se amb una reducció de la degradació del substrat de les calpaïnes I $\kappa$ B i una menor activació de NF- $\kappa$ B. A més, la inhibició de la calpaïna en fibroblasts en cultiu va disminuir la seva diferenciació a miofibroblasts induïda per TGF- $\beta$ , suggerint accions de les calpaïnes en diferents tipus cel·lulars. Per la seva banda, l'administració crònica oral de NPO-2270 també va reduir l'expansió de la cicatriu i la dilatació i disfunció ventricular causada per un episodi d'isquèmia transitòria en ratolí a una dosi efectiva inferior a la del SNJ-1945.



La segona part de la tesi estudia la contribució de les calpaïnes al remodelat induït per estímuls crònics no isquèmics, fent servir dos models que reproduïxen l'estimulació neurohumoral que s'observa en pacients amb IC com són l'estimulació adrenèrgica (administració crònica d'isoproterenol) i l'estimulació del sistema renina-angiotensina (administració crònica d'angiotensina II), així com un model de sobrecàrrega de pressió per constricció aòrtica transversal (TAC) en ratolins.

L'estrés cardíac induït amb isoproterenol va augmentar l'expressió i activitat de les calpaïnes 1 i 2, i aquest increment va associar-se amb hipertròfia ventricular i fibrosi intersticial. La coadministració crònica i per via oral de SNJ-1945 en el model d'isoproterenol o de NPO-2270 en els models d'angiotensina II i TAC va atenuar el desenvolupament de remodelat ventricular que caracteritza aquests models.

Estudis recents indiquen que la sobreexpressió en el miocardi de la isoforma 2 de la cinasa de receptors associats a proteïnes G (GRK2) promou hipertròfia. Els resultats obtinguts fent servir ratolins amb deleció gènica de GRK2 demostren que la contribució de les calpaïnes a la hipertròfia induïda per isoproterenol està associada a un increment dels nivells de GRK2. Aquesta regulació de GRK2 depenent de l'activació de les calpaïnes és conseqüència d'un increment en la seva estabilitat per degradació de la seva ubiquitina ligasa MDM2, i de l'increment en la seva expressió degut a la degradació de I $\kappa$ B i activació de NF- $\kappa$ B.

En conclusió, els resultats presentats en aquesta tesi demostren que la sobreexpressió i sobreactivació de les calpaïnes en el miocardi és una resposta comuna a diferents estímuls patològics crònics, i té un efecte causal en la resposta hipertròfica i fibròtica que caracteritza el remodelat ventricular. Es proposa que l'activació depenent de calpaïna del factor nuclear NF- $\kappa$ B jugaria un paper clau tant en el remodelat postinfart com el produït per estimulació neurohumoral. A més, es demostra que la hipertròfia induïda per isoproterenol és conseqüència d'un increment en els nivells de GRK2 per mecanismes dependents de les calpaïnes.

Els resultats obtinguts demostren que la inhibició farmacològica de les calpaïnes de forma crònica per via oral és possible i que aquesta inhibició atenua el procés de remodelat. Es proposen dos nous inhibidors com a candidats per avaluar la inhibició de les calpaïnes com a nova estratègia terapèutica en la prevenció del remodelat ventricular i la IC causats per diferents cardiomiopaties.

## Summary

Heart failure (HF) is a chronic heart disease and represents one of the main causes of morbidity and mortality worldwide. The structural and functional changes that characterize cardiac remodelling that occurs in response to any chronic pathological stimulus are causally associated with the development of HF. Despite the huge social and economic impact of HF, the current pharmacological treatments have limited efficacy and reveal an urgent need for novel targets and strategies aimed to prevent the progression of ventricular remodelling and the onset of HF.

Calpains, a family of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent cystein proteases, are overactivated during myocardial ischemia-reperfusion and contribute to cardiomyocyte death associated with myocardial reperfusion and hence, to infarct size. Previous studies in transgenic mice models suggest that calpains could be involved in post-infarction remodelling and its progression to HF. Recent studies also suggest that calpain activity is increased in non-ischemic cardiomyopathies. However, despite the existing evidence, only few pre-clinical studies have explored the effects of calpain inhibition in the ventricular remodelling mainly due to the lack of appropriate inhibitors.

The main objective of the present thesis has been to characterize the calpain contribution to cardiac remodelling of both ischemic and non-ischemic origin, define the mechanisms involved and to evaluate the efficacy of calpain pharmacological inhibition by using two new molecules, SNJ-1945 and NPO-2270 as a new treatment against ventricular remodelling and HF.

The first part of this thesis analyses the effect of acute and chronic calpain pharmacological inhibition carried out with oral administration of these two inhibitors against ventricular post-infarction remodelling in a model of anterior descending artery transient occlusion. A first study using male Sprague-Dawley rats tested SNJ-1945 (Senju Pharmaceutical Laboratories), an inhibitor with pharmacodynamics improvements in relation to classical inhibitors. A second study using C57BL/6 mice tested the new inhibitor NPO-2270, provided by Landsteiner Genmed, which has higher potency and selectivity than SNJ-1945.

The results show that post-infarct remodelling correlates with an increase in the protein expression and activity of both calpain 1 and calpain 2, and a decrease in the levels of the calpain endogenous inhibitor calpastatin. Acute and chronic administration of SNJ-1945 attenuated calpain activation, reduced scar expansion and ventricular dysfunction and dilation. Acute treatment reduced infarct size and associated inflammation measured after 3 days of reperfusion. Chronic but not acute treatment attenuated cardiomyocyte hypertrophy and collagen infiltration in the non-infarcted myocardium at 21 days of reperfusion. These results correlated with a reduction in the calpain substrate I $\kappa$ B degradation and a lower NF- $\kappa$ B activation. Moreover, calpain inhibition in cultured fibroblasts reduced TGF- $\beta$  induced fibroblasts activation, suggesting calpain-dependent actions in different cellular types. On the other hand, chronic and oral administration of NPO-2270 reproduced the effects of SNJ-1945 on scar expansion and ventricular dilation and dysfunction caused by transient ischemia at a lower concentrations compared to SNJ-1945.

The second part of this thesis studies the calpain contribution to myocardial remodelling induced by chronic non-ischemic stimuli, using two models that reproduce the neurohumoral stimulation observed in patients with HF such as adrenergic stimulation (chronic isoproterenol administration) and stimulation of the renin-angiotensin system (chronic angiotensin II administration), as well as a model of pressure overload induced by transverse aortic constriction (TAC).

Isoproterenol-induced cardiac stress produced an increased expression and activity of calpain 1 and calpain 2, and this increase was associated with ventricular hypertrophy and interstitial fibrosis. Chronic oral coadministration of SNJ-1945 in isoproterenol model or NPO-2270 in angiotensin II and TAC model attenuated the ventricular remodelling that characterizes these experimental models.

Recent studies have shown that myocardial overexpression of G-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) promote hypertrophy. Results obtained using mice with genetic downregulation of GRK2 expression prove that calpain contribution to isoproterenol induced hypertrophy is associated with an increased GRK2 levels. Calpain-dependent GRK2 regulation is consequence of increased stability through the proteolysis of its ubiquitin ligase MDM2 and enhanced expression through I $\kappa$ B degradation and subsequent NF- $\kappa$ B activation

In conclusion, the results presented in this thesis demonstrate that myocardial overexpression and overactivation of calpains is a common response to different chronic pathological stimuli, and has a causal role in the hypertrophic and fibrotic response that characterizes ventricular remodelling. It is proposed that the calpain dependent-activation of the nuclear factor NF- $\kappa$ B plays a key role in both post-infarction remodelling and remodelling produced by neurohumoral stimulation. Moreover, it's proved that isoproterenol induced hypertrophy results from increased GRK2 levels through calpain-dependent mechanisms.

The results obtained show that oral and chronic pharmacological inhibition of calpains is feasible and that that inhibition attenuates the remodelling process. Two new inhibitors are proposed as candidates to evaluate calpain inhibition as a new therapeutical strategy for the prevention of ventricular remodelling and heart failure in patients with different cardiomyopathies.





### **1.1) REMODELAT VENTRICULAR ADVERS I INSUFICIÈNCIA CARDÍACA. IMPORTÀNCIA DEL PROBLEMA**

La insuficiència cardíaca (IC) és una malaltia cardiovascular crònica amb una alta prevalença, mortalitat i taxa d'hospitalització<sup>1</sup> que es caracteritza pel desequilibri entre la capacitat del cor per bombejar sang i les necessitats de l'organisme. Les guies de la Societat Espanyola de Cardiologia defineixen la IC com "un síndrome clínic caracteritzat per símptomes típics (com dispnea, inflamació de turmells i fatiga), que pot anar acompanyada de signes (com pressió venosa jugular elevada, crepitants pulmonars i edema perifèric) causats per una anomalia cardíaca estructural o funcional que produeixen una reducció del cabal cardíac o una elevació de les pressions intracardíaques en repòs o en estrès"<sup>2</sup>.

La prevalença de la IC augmenta progressivament amb l'edat i no difereix entre sexes, sent del 1,3% entre els 45 i 54 anys, del 5,5% entre els 55 i els 64, del 8% entre els 65 i els 75 i del 16,1% entre els majors de 75 anys<sup>3</sup>. La prevalença absoluta de la IC a la població es troba en augment continuat degut a l'efecte combinat de l'increment en l'expectativa de vida dels pacients amb malalties cardiovasculars com a conseqüència de les millores en el seu tractament, l'envelliment de la població general i els canvis epidemiològics. A més de tenir una alta prevalença, la IC té un pronòstic desfavorable amb una mortalitat que, malgrat tots els avanços en el maneig de la malaltia, continua creixent (un increment del 12% en els últims 5 anys), i en els pacients hospitalitzats es situa per sobre del 15% durant el primer any, arribant al 50% als 5 anys<sup>4</sup>. La IC provoca entre el 3 i el 5% del total d'ingressos hospitalaris, sent la primera causa d'hospitalització en majors de 65 anys, i origina elevats costos econòmics (2% de la despesa sanitària nacional)<sup>5,6</sup>.

La IC invariablement va precedida de remodelat ventricular advers, que es caracteritza per l'alteració en l'estructura i funció cardíaca que resulta de la resposta del miocardi a un estímul patològic crònic<sup>7</sup>. Des d'una perspectiva histològica, el remodelat cardíac comporta la hipertròfia dels cardiomiòcits, una resposta inflamatòria amb activació de miofibroblasts i fibrosi intersticial. Aquest canvis van associats a una alteració en l'expressió gènica, la síntesi i degradació de proteïnes i el metabolisme cardíac. Amb l'evolució de l'estrès crònic, es produeix dilatació ventricular, disminució de la funció cardíaca i progressió cap a la IC. El remodelat ventricular i la IC representen un problema conjunt amb un tractament difícil i la seva incidència no fa més que augmentar. Tot i que els tractaments farmacològics actuals han demostrat millorar la funció cardíaca i prolongar l'esperança de vida, la taxa de mortalitat segueix sent elevada i revela una necessitat urgent de noves dianes i estratègies terapèutiques que estiguin dirigides a modular i tractar el remodelat advers.

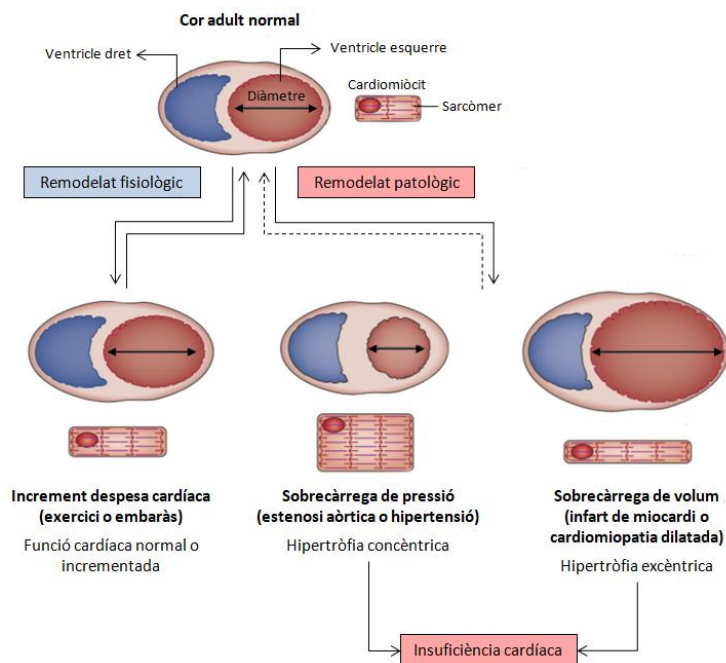
Si bé qualsevol alteració en l'estructura i funció del miocardi es defineix com una resposta de remodelat, existeix un remodelat fisiològic caracteritzat per la hipertròfia miocardiàca que es produeix com a compensació a l'increment de la despesa cardíaca durant l'exercici o l'embaràs i està associada amb una funció cardíaca normal o incrementada<sup>8</sup>. Aquesta hipertròfia generada és reversible, sense l'expressió de cap marcador d'hipertròfia patològica, no causa fibrosi intersticial i no progressa cap a la IC.

El remodelat advers o patològic, per la seva banda, és un fenomen inicialment compensatori que es produeix per reduir l'estrès en les parets del ventricle i preservar la despesa cardíaca, però acaba per generar una sèrie d'alteracions maladaptatives i progressa a IC<sup>9</sup>.

Aquest remodelat patològic es troba associat a una gran varietat de situacions clíniques (Figura 1). Segons el tipus d'estrès, el fenotip durant les fases inicials del remodelat ventricular pot ser diferent. En malalties amb sobrecàrrega de pressió com l'estenosi aòrtica o la hipertensió sistèmica, el cor desenvolupa una hipertròfia concèntrica, on els cardiomiòcits incrementen més el gruix que la llargada<sup>10</sup>. En canvi, en malalties amb sobrecàrrega de volum com l'infart de miocardi o la cardiomiopatia dilatada, el cor desenvolupa una hipertròfia excèntrica, on els cardiomiòcits incrementen més la longitud<sup>11</sup>.

Tant l'infart agut de miocardi (IAM) com la hipertensió arterial són les patologies subjacents més freqüents de remodelat ventricular associat a IC als països desenvolupats. S'estima que el 36% dels pacients que sobreviuen a un IAM desenvoluparan IC durant els següents 5 anys<sup>12</sup>. D'altra banda, tot i que el risc de desenvolupar IC lligada a la hipertensió és menor que l'associat amb el IM, la hipertensió és la condició patològica causant de IC més comuna en la població, degut a que té una prevalença major a la del IAM. S'ha estimat que els pacients hipertensius tenen entre 2 i 3 vegades més risc de desenvolupar IC en comparació amb individus normotensius<sup>13</sup>. És interessant remarcar que no es coneix exactament quin és el factor que indueix el pas de remodelat considerat inicialment compensatori a patològic i es continua debatent si aquest pas ve determinat per la naturalesa de l'estrès o la seva cronicitat.

La present tesi s'ha centrat en el remodelat patològic tant de causa isquèmica, utilitzant un model d'infart de miocardi i reperfusió, com d'origen no isquèmica, utilitzant un model de sobrecàrrega de pressió per constricció de l'aorta i dos models d'estrès crònic neurohumoral, un d'estimulació adrenèrgica i un altre d'estimulació del sistema renina-angiotensina-aldosterona.



**Figura 1.** Representació esquemàtica dels diferents tipus de remodelat cardíac. Figura modificada de <sup>14</sup>.

### 1.1.1) Remodelat ventricular advers d'origen isquèmic

Com s'ha comentat abans, patir un IAM representa el factor de risc més elevat de desenvolupar remodelat ventricular i IC<sup>15</sup>. En pacients amb IAM, s'activa una resposta inflamatòria aguda que inicia una sèrie de processos que donen lloc a la substitució del teixit necròtic per teixit cicatricial, causant la pèrdua de teixit contràctil i provocant canvis estructurals i funcionals a la resta del miocardi no infartat que finalment acaben desembocant en IC postinfart. Així, diferents estudis han demostrat que el principal determinant de la severitat del remodelat ventricular advers postinfart és la quantitat de cardiomiòcits que moren com a conseqüència del IAM, és a dir, l'extensió de l'infart<sup>16</sup>, i per tant cal primer entendre la fisiopatologia d'aquest.

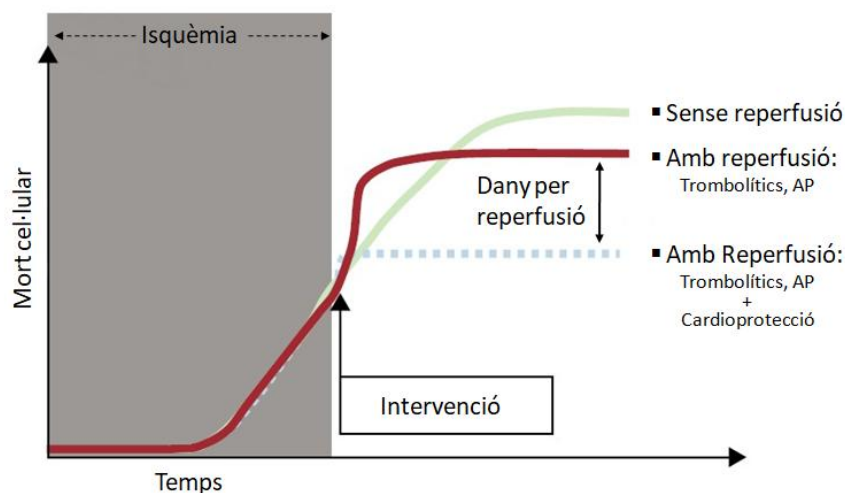
#### 1.1.1.1) Infart agut de miocardi i dany per reperfusió

Dins de les malalties cardiovasculars, la cardiopatia isquèmica és la primera causa de morbiditat i mortalitat al món<sup>17</sup>. El substrat etiopatogènic més comú de la cardiopatia isquèmica és l'aterosclerosi coronària. L'obstrucció de les artèries coronàries epicàrdiques com a conseqüència d'un trombe causat pel trencament d'una placa d'ateroma dona lloc a l'IAM, la forma més aguda de la cardiopatia isquèmica. El pronòstic dels pacients que ingressen a l'hospital amb IAM ve determinat principalment per la quantitat de cardiomiòcits que moren durant l'episodi isquèmic.

L'extensió de l'àrea de l'infart (és a dir, de la mort dels cardiomiòcits) està determinada per l'àrea de teixit distal al trombe causant de l'oclusió (àrea en risc), per la velocitat de progressió del dany isquèmic (depenent de la presència de circulació col·lateral i de la temperatura) i de la duració de l'episodi isquèmic<sup>18-20</sup>. El tractament més efectiu per limitar la grandària de l'infart és la ràpida reinstauració del flux coronari o reperfusió aplicant angioplàstia primària o trombolítics<sup>21-23</sup>. Aquesta reperfusió, però, ha de ser durant les primeres hores, ja que la quantitat de miocardi salvat disminueix dràsticament amb la duració de l'episodi isquèmic. La finestra durant la qual la reperfusió salva miocardi en pacients amb IAM és fins a les 3 hores d'isquèmia en absència de flux residual. Tot i això, s'ha suggerit que la reperfusió fins les 12 hores d'isquèmia tindria un efecte beneficiós sobre la cicatrització, limitant la seva expansió i, per tant, el remodelat advers secundari<sup>24,25</sup>.

A més de la necrosi produïda durant l'episodi isquèmic, quan la reperfusió es realitza en un interval de temps en el que permet salvar miocardi isquèmic, es produeix una mort addicional de cardiomiòcits que han sobreviscut a la isquèmia prèvia i és causada per mecanismes activats exclusivament per la reperfusió. Aquest fenomen que redueix l'eficàcia dels tractaments de reperfusió i que s'ha estimat que pot representar el 50% del AI<sup>26</sup>, es coneix com a dany letal per reperfusió, i per definició es pot prevenir mitjançant intervencions aplicades en el moment de la restauració del flux<sup>27</sup> (Figura 2). El dany per reperfusió es caracteritza per presentar un patró histològic característic conegut com necrosi en bandes de contracció, causat per un escurçament exagerat i irreversible dels cardiomiòcits, amb una desorganització completa de la seva estructura sarcomèrica. Aquest fenomen d'escurçament és conegut com hipercontractura, i té lloc durant els primers minuts de la reperfusió<sup>28</sup>.





**Figura 2.** Il·lustració del concepte de dany per reperfusió. La duració de l'episodi isquèmic augmenta la mort cel·lular de forma proporcional. La reinstauració del flux coronari limita aquest procés i a la vegada produeix un dany addicional durant els primers minuts de reperfusió. Aquest dany es pot prevenir aplicant tractaments cardioprotectors en el moment de restaurar el flux. AP: angioplàstia primària. Figura modificada de <sup>29</sup>.

### 1.1.1.2) Mecanismes cel·lulars i moleculars del dany per reperfusió

Durant la isquèmia, els cardiomiòcits aturen la fosforilació oxidativa i activen la glicòlisi anaeròbica per tal d'intentar suplir el dèficit energètic. Com a conseqüència d'aquest metabolisme anaeròbic es produeix una acumulació d'àcid làctic que, juntament amb l'acumulació de  $\text{CO}_2$  a l'espai extracel·lular, condueix a una ràpida caiguda del pH intracel·lular. En el seu intent de corregir l'acidosi, l'intercanviador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  i cotransportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  introdueixen ions sodi a la cèl·lula, que s'acumula al citosol degut a que la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa es troba inhibida. La pèrdua del gradient transarcolemal de  $\text{Na}^+$  fa que el transportador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , que en condicions normals actua regulant els nivells citosòlics de  $\text{Ca}^{2+}$ , passi a funcionar preferentment en sentit revers, introduint ions  $\text{Ca}^{2+}$  que no poden ser captats pel reticle sarcoplàsmic degut a la depleció d'ATP, i que acaben provocant un augment de la concentració citosòlica de  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>30</sup>.

En el moment de la reperfusió es reactiva la fosforilació oxidativa mitocondrial. El potencial de membrana cel·lular també es recupera i, com a conseqüència de la normalització del pH intracel·lular, durant els primers minuts la cèl·lula segueix introduint  $\text{Ca}^{2+}$  a través de l'intercanviador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , incrementant encara més el  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic. Aquesta entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  continua fins que la reactivació de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa normalitza el gradient transarcolemal de  $\text{Na}^+$ . La disponibilitat d'ATP permet també l'activació de la ATPasa del reticle sarcoplasmàtic (SERCA) afavorint la captació de  $\text{Ca}^{2+}$  pel reticle. Aquest però, degut a l'excés de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic es satura ràpidament, fent que els canals de rianodina (RyR) s'obrin, i el  $\text{Ca}^{2+}$  s'alliberi de nou al citosol. Aquesta cadena d'esdeveniments es repeteix de forma cíclica, i dóna lloc a oscil·lacions de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic. Com els canals de rianodina estan connectats físicament a les mitocondries, el  $\text{Ca}^{2+}$  s'allibera en microdominis des d'on entren a la mitocondria a través de l'unitransportador mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$ , afavorint l'increment del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial.

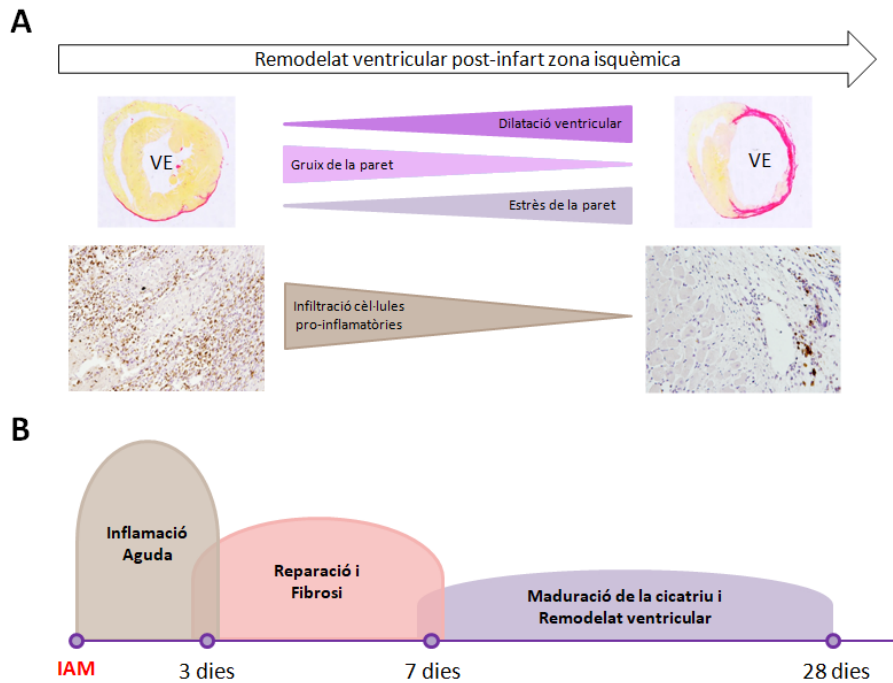
Les oscil·lacions de  $\text{Ca}^{2+}$  porten a una activació contràctil excessiva i irreversible dels cardiomiòcits definida com hipercontractura, que pot causar la ruptura del sarcolema i la mort cel·lular<sup>31</sup>. Les oscil·lacions de  $\text{Ca}^{2+}$  també porten a oscil·lacions del potencial de membrana que poden donar lloc a arrítmies ventriculars<sup>32</sup>. Finalment, l'increment del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial també pot provocar l'obertura del porus de transició mitocondrial (mPTP). El mPTP és un canal d'alta permeabilitat, que connecta la matriu mitocondrial amb l'espai intermembrana<sup>33</sup>. Quan s'obre, dissipa el potencial de membrana mitocondrial, atura la síntesi de ATP, causa edema, ruptura mitocondrial i la sortida de molècules al citosol com el  $\text{Ca}^{2+}$ , afavorint la formació de més oscil·lacions de  $\text{Ca}^{2+}$  i hipercontractura. Ambdós processos tenen conseqüències letals per la cèl·lula, encara que s'ha suggerit que la hipercontractura és més rellevant en isquèemies de curta durada, i el mPTP és el mecanisme principal en la mort de cardiomiòcits durant la reperfusió d'isquèemies llargues<sup>34</sup>.

A més, l'acumulació d'ions  $\text{H}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$ , juntament amb la pèrdua del potencial de membrana mitocondrial porta a la formació d'espècies reactives d'oxigen (ROS), que causen dany a l'ADN, proteïnes i lípids, i activen vies de resposta a estrès. Les ROS, a més, afavoreixen directament l'apertura del mPTP<sup>35</sup>, oxiden la cinasa dependent de  $\text{Ca}^{2+}$  i la calmodulina<sup>36</sup>, i dissocia la sintasa d'òxid nítric (eNOS) de la tetrahydrobiopterina, produint anió superòxid ( $\text{O}_2^-$ ) i disminuint la disponibilitat d'òxid nítric i la via cardioprotectora que inicia<sup>37</sup>.

### 1.1.1.3) Remodelat ventricular postinfart

La severitat del remodelat ventricular que deriva d'un infart depèn fonamentalment de la grandària de l'àrea de l'infart i de la seva localització al ventricle. Els infarts més grans causen una depressió funcional major i un risc de remodelat advers més elevat<sup>38</sup>, així com els infarts anteriors derivats de l'oclusió de l'artèria descendent anterior (LAD) comporten una disfunció i pitjor pronòstic que altres infarts de la mateixa grandària produïts en altres zones del miocardi<sup>39</sup>.

El remodelat de la zona isquèmica es pot dividir en diferents fases (Figura 3B). En aquesta zona el primer que esdevé és una fase inflamatòria que es caracteritza per la senyalització de "patrons moleculars associats al perill" (DAMP) alliberats per cèl·lules mortes que activen el sistema immune innat i desencadenen una resposta inflamatòria amb la infiltració de leucòcits que participen en l'eliminació dels cardiomiòcits necròtics. Els miòcits necròtics a més també secreten i activen metaloproteïnases de la matriu (MMPs) que degraden cèl·lules i material de la matriu ajudant als macròfags en la reabsorció de la matriu extracel·lular<sup>40</sup>. A continuació, la inflamació es reprimeix activament i dona lloc a una fase reparativa o fibròtica que dura d'una a varies setmanes i en la qual es produeix un increment en el número de fibroblasts i la seva diferenciació en miofibroblasts activats. Els miofibroblasts generen proteïnes de la matriu extracel·lular (principalment col·lagen I i III) necessàries per la formació de la cicatriu. En aquesta fase final, que dura varies setmanes en animals petits fins a mesos en humans, gran part dels fibroblast i els neovasos desapareixeran, i la cicatriu de col·lagen madurarà incrementant els enllaços entre les fibres de col·lagen<sup>41</sup>.



**Figura 3.** Remodelat cardíac de la zona isquèmica després d'un infart de miocardi. A) Canvis en la composició cel·lular i geometria cardíaca del teixit infartat. Les imatges mostren seccions transversals del ventricle de cors de ratolins als 3 i 28 dies postinfart tenyits amb picrosirius red o marcats per immunohistoquímica contra CD68 (macròfags/monòcits). B) Esquema temporal de les 3 fases de reparació cardíaca.

La formació de la cicatriu madura és un punt crític per tal de limitar l'expansió de l'infart. El concepte d'expansió de l'infart fa referència a l'aprimament en la direcció radial i dilatació en la direcció tangencial de la paret ventricular corresponent a la zona infartada que es produeix durant els primers dies o setmanes postinfart<sup>42</sup> (Figura 3a). Aquesta expansió és un estímul determinant per la resta de mecanismes de remodelat ventricular i s'ha vist que la seva incidència és molt més elevada en infarts transmursals (infarts on la necrosi abasta la totalitat del gruix del múscul cardíac)<sup>43</sup>. El grau d'expansió de l'infart està directament associat amb una progressió més agressiva cap a la IC i una major mortalitat.

La sobrecàrrega de volum associada a l'expansió de l'infart es tradueix en un augment en l'estrès de la paret ventricular i en la demanda de consum d'oxigen a les regions remotes de l'infart. Com a conseqüència, l'increment de la càrrega de treball provoca una resposta hipertròfica excèntrica, amb un allargament dels cardiomiòcits, que dependrà principalment de l'expansió de l'infart<sup>44</sup>. Aquest estrès mecànic també dona lloc a alteracions neurohumorals locals que afavoreixen l'activació de les MMP, que degraden part de la matriu extracel·lular, la deposició de col·lagen i altres proteïnes de la matriu per part dels fibroblasts. Els mecanismes exactes i la regulació d'aquesta fibrosi reactiva a la regió remota de l'infart però encara no es coneixen<sup>45</sup>. L'estrès oxidatiu i nitrosatiu a més, també porten a la reexpressió de gens fetals<sup>46</sup> a través de l'activació de factors de transcripció com el factor potenciador de miòcits 2 (MEF-2) i GATA4, que indueixen l'expressió de gens implicats en la resposta hipertròfica. Finalment, el miocardi remot també s'ha associat amb l'activació de vies pro-inflamatòries i la infiltració de leucòcits.

### 1.1.2) Remodelat ventricular advers d'origen no isquèmic

El remodelat ventricular d'origen no isquèmic té com a causa subjacent tots aquells estímuls crònics patològics que no involucren un esdeveniment isquèmic i causen estrès cardíac, tals com la hipertensió, l'estenosi o l'activació neurohumoral. La hipertròfia patològica s'indueix inicialment com una resposta compensatòria que normalitza transitòriament l'estrès biomecànic i optimitza la funció del miocardi. Es caracteritza pel creixement concèntric del ventricle i per l'addició de sarcòmers en paral·lel i el creixement del gruix dels cardiomiòcits. Quan la hipertròfia progressa, es produeix la dilatació del ventricle amb un aprimament de la paret a través de l'estirament dels cardiomiòcits.

Aquesta hipertròfia esdevé maladaptativa quan a més del creixement cel·lular i l'increment de la síntesi proteica, es produeixen el següents processos comuns amb el remodelat isquèmic: fibrosi, desregulació de les proteïnes implicades en la regulació del  $Ca^{2+}$ , disfunció mitocondrial, reprogramació metabòlica, reactivació de l'expressió de gens fetals, deteriorament dels controls de qualitat de proteïnes i mitocòndries, alteració de l'estructura del sarcòmer i angiogènesi insuficient.

A més de la càrrega mecànica, els cardiomiòcits responen a una gran varietat de senyals de creixement, com citocines, factors de creixement, catecolamines, pèptids vasoactius i hormones. És per això que molts dels canvis i vies de senyalització implicats en el remodelat ventricular estan relacionats d'alguna manera amb la hipertròfia dels cardiomiòcits.

## 1.2) CANVIS I VIES DE SENYALITZACIÓ ASSOCIATS AL REMODELAT CARDÍAC

Durant el procés de remodelat, els cardiomiòcits reben i integren senyals de la matriu extracel·lular, la membrana cel·lular, els canals iònics associats a la membrana, el citoesquelet, el sarcòmer, la mitocòndria i el reticle endoplasmàtic. En resposta a aquestes senyals es reactiva l'expressió de gens del programa fetal, que porta a l'alteració de la síntesi de proteïnes i, en última instància, a l'alteració de la forma i l'estructura dels cardiomiòcits (Figura 4). De la mateixa manera, els cardiomiòcits estan en contacte amb les cèl·lules endotelials, fibroblasts i cèl·lules inflamatòries, que també pateixen alteracions.

Els canvis i vies implicats descrits a continuació s'expliquen de forma separada per raons expositives, però cal destacar que aquesta separació no es produeix en la situació patofisiològica real, on tots aquests elements es troben interconnectats. Això complica el seu estudi, i provoca que en alguns canvis com l'alteració del metabolisme no hi hagi consens sobre si són la causa de la progressió de la hipertròfia o si tenen lloc com a resultat d'aquesta<sup>47,48</sup>.

### 1.2.1) Canvis moleculars

Dues de les senyals més importants que desencadenen el procés de remodelat cardíac són l'estrès oxidatiu i la desregulació de l'homeòstasi de  $Ca^{2+}$  intracel·lular.

Sota condicions fisiològiques, les espècies reactives d'oxigen (ROS) tenen un paper com a missatgers secundaris, induint vies de senyalització essencials per la funció cardíaca. Quan hi ha un desequilibri entre la producció de ROS i la capacitat detoxificativa dels sistemes antioxidants però, té lloc l'estrès oxidatiu. Al cor, les tres fonts cel·lulars principals de ROS són els cardiomiòcits, les cèl·lules endotelials i els neutròfils<sup>49</sup>. En el cas dels cardiomiòcits, els ROS provenen principalment de tres llocs: el complex enzimàtic de membrana NADPH oxidasa, la cadena respiratòria mitocondrial i la sintasa d'òxid nítric endotelial (eNOs)<sup>50</sup>.

L'estrès oxidatiu s'ha trobat elevat en la hipertensió, el remodelat patològic amb o sense IC i altres malalties cardiovasculars<sup>51,52</sup>. Els ROS contribueixen de diverses maneres al remodelat cardíac i a l'IC. L'estrès oxidatiu provoca dany en proteïnes, lípids i mtDNA, i la seva acumulació oxidada pot portar a la mort cel·lular. A més, els ROS activen diverses cinases i factors de transcripció hipertròfics com, la proteïna cinasa C, ERK1/2 o el factor NF- $\kappa$ B<sup>53</sup>. Per altra banda, també provoquen l'activació de les MMPs i incrementen la producció i deposició de col·lagen per part dels fibroblast<sup>54</sup>, i influeixen directament en la funció contràctil modificant proteïnes implicades en l'acoblament excitació-contracció<sup>55</sup>.

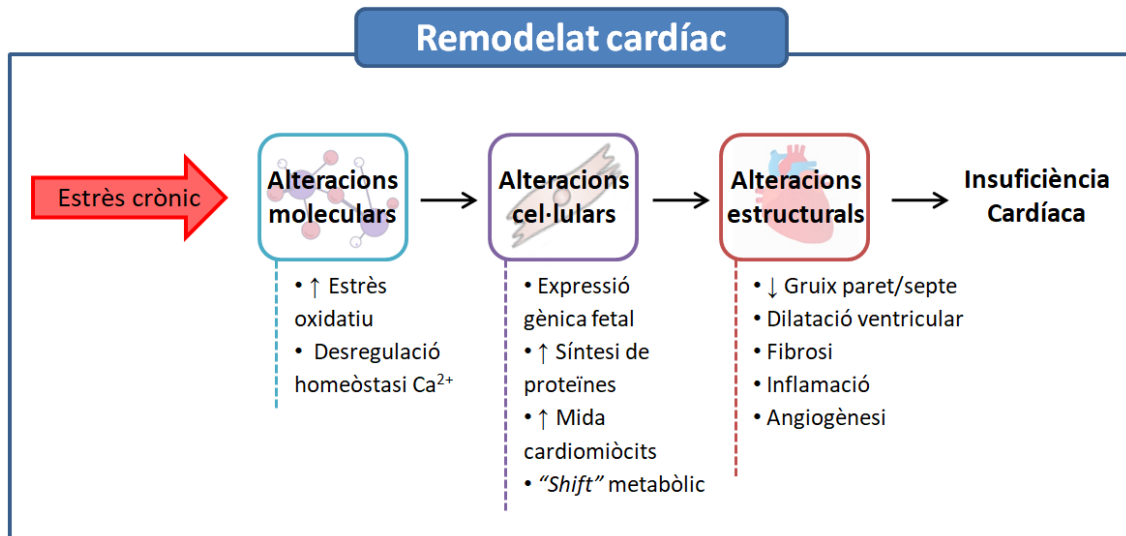
Malgrat que diferents estudis experimentals demostren que l'ús d'antioxidants atenua el remodelat ventricular en diversos models animals<sup>56,57</sup>, la seva efectivitat encara no s'ha demostrat en pacients amb IC<sup>58</sup>.

D'altra banda, l'homeòstasi dels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lulars i els nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  del reticle endoplasmàtic és bàsica per la correcta contracció dels sarcòmers. En el remodelat advers i IC, la regulació del  $\text{Ca}^{2+}$  es troba alterada i contribueix a una disfunció contràctil dels cardiomiòcits<sup>59,60</sup>. Aquesta alteració és deguda tant al mal funcionament dels receptors de rianodina tipus II (RyR2), els quals regulen la sortida de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol, com de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del reticle sarcoplàsmic (SERCA2a), que permet la recaptació i reentrada dels ions de  $\text{Ca}^{2+}$  cap al reticle.

S'ha descrit que tant l'expressió de SERCA2a com la fosforilació de fosfolamban (PLN) es troben reduïdes en models experimentals d'IC<sup>61</sup> així com en mostres de miocardi de pacients amb IC<sup>62,63</sup>, contribuint a la inhibició de SERCA. Aquestes alteracions provoquen l'acumulació de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol, prevenint la relaxació dels cardiomiòcits i reduint la reserva de  $\text{Ca}^{2+}$  disponible al reticle sarcoplasmàtic per la seva alliberació durant la sístole.

La pèrdua de  $\text{Ca}^{2+}$  del reticle que es dona en la IC també s'ha associat a la disfunció de RyR2. Un augment de la fosforilació o de l'oxidació de RyR2 desestabilitza l'estat tancat del canal, provocant una fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol que contribueix a la disfunció contràctil i incrementa la incidència d'arrítmies<sup>64</sup>.

La producció de ROS i l'increment en la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  poden provocar que s'acumulin proteïnes amb errors de plegament o sense plegar en el lumen del RE, procés que rep el nom d'estrès del RE<sup>65</sup>. En condicions fisiològiques, s'activa la resposta a proteïnes sense plegar (UPR), però s'ha trobat que aquesta és ineficient en diferents patologies, entre les que s'inclou l'hipertrofia cardíaca, la isquèmia-reperfusió o la insuficiència cardíaca<sup>66</sup>.



**Figura 4.** Representació esquemàtica de les diferents alteracions que tenen lloc durant el remodelat cardíac, les quals, eventualment, acaben esdevenint en IC.

### 1.2.2) Canvis cel·lulars

El desenvolupament d'hipertrofia que acompanya al remodelat ventricular està associat amb la reinducció de l'expressió de gens fetals que normalment no s'expressen en el cor adult<sup>67</sup>. Aquesta reexpressió de gens fetals és característica del remodelat patològic, i no té lloc en els processos de remodelat fisiològics com el produït per l'exercici<sup>68</sup>. Entre els gens fetals que mostren un increment en l'expressió hi ha el pèptid natriurètic auricular (ANP), el pèptid natriurètic tipus B (BNP), la  $\alpha$ -actina 1 o la isoforma  $\beta$  de la cadena pesada de la miosina ( $\beta$ -MHC, la isoforma contràctil lenta). En canvi, altres gens d'expressió majoritària en l'adult pateixen una disminució de l'expressió, com la isoforma  $\alpha$  de la cadena pesada de la miosina ( $\alpha$ -MHC, la isoforma contràctil ràpida) o SERCA2a.

L'impacte de l'expressió de gens fetals sobre el creixement i funció dels cardiomiòcits o la fibrosi no està clara, i s'ha suggerit que és una resposta compensatòria cardioprotectora. La senyalització de ANP i BNP té efectes antihipertròfics<sup>69</sup>, mentre que la forma  $\beta$ -MHC té una activitat ATPasa menor, i per tant, genera una funció contràctil de forma més lenta i energèticament més econòmica<sup>70</sup>.

Una característica del remodelat cardíac que és independent de l'estímul causant és l'increment en la síntesi de proteïnes. La síntesi de proteïnes en el cor adult és baixa, reflectint la baixa taxa de recanvi cel·lular que té el cor. En el remodelat s'activen la biogènesi de ribosomes i la maquinària de transcripció, incrementant la síntesi i estabilitat de proteïnes i provocant el creixement cel·lular que caracteritza la hipertrofia dels cardiomiòcits.

La principal via de senyalització que regula la síntesi proteica és la de la diana de la rapamicina en mamífers (mTOR), una serina/treonina cinasa que forma part dels complexos mTORC1 i mTORC2. L'activitat de mTORC1 es troba incrementada tant en el desenvolupament d'hipertrofia fisiològica com patològica i promou la producció de proteïna en els ribosomes. L'activació de mTOR és inicialment un mecanisme adaptatiu essencial<sup>71</sup>, però la seva activació

crònica acaba resultant perjudicial, en part per la supressió de l'autofàgia i el conseqüent deteriorament dels mecanismes de control de qualitat de les proteïnes<sup>72</sup>. La seva inhibició farmacològica s'ha vist que redueix la hipertròfia patològica i la IC induïda per angiotensina II i sobrecàrrega de pressió en models animals<sup>73,74</sup>.

La disposició de les proteïnes sintetitzades té un rol important en el creixement dels cardiomiòcits, especialment el procés de formació del complex de proteïnes que conforma el sarcòmer. L'addició linear de sarcòmers porta al creixement longitudinal (hipertròfia excèntrica) mentre que l'addició en paral·lel incrementa el diàmetre transversal (hipertròfia concèntrica).

La progressió del remodelat cardíac també comporta canvis en el metabolisme energètic. La font principal de generació de ATP, que sota condicions fisiològiques són els àcids grassos, passa a ser la glucosa<sup>75</sup>. Sota condicions patològiques la càrrega de treball augmenta, i el canvi de substrat permet al cor produir més ATP per molècula d'oxigen consumida. De nou, aquesta situació és semblant a la que té lloc durant el desenvolupament cardíac fetal, on el subministrament d'oxigen és limitat i el transport i metabolisme dels àcids grassos no és possible.

En associació amb aquest canvi de substrat, es produeixen canvis en l'expressió i activitat d'enzims metabòlics. A mesura que s'avança cap a la IC, es produeix una supressió dels components de la fosforilació oxidativa mitocondrial, una menor biogènesi mitocondrial i una disminució dels enzims involucrats en el metabolisme oxidatiu<sup>76</sup>. Com a resultat, el cor incrementa la glicòlisi i suprimeix l'oxidació de glucosa i àcids grassos. L'augment de la glicòlisi, però, també comporta augment de la despesa d'ATP per restablir el balanç iònic, disminuint l'eficiència cardíaca. Eventualment, la demanda energètica incrementada acaba portant a la depleció de les reserves energètiques, observable per la disminució de la ràtio fosfocreatina/ATP, la disminució de la creatina cinasa i un increment en el ADP<sup>77</sup>.

### **1.2.3) Alteracions estructurals**

Amb la cronicitat de l'estrès, els canvis moleculars i cel·lulars acaben provocant alteracions en l'estructura del miocardi. La hipertròfia dels cardiomiòcits incrementa el gruix de les parets, reduint l'estrès de les parets del ventricle i la demanda d'oxigen. Amb el pas del temps el cor progressa cap a una descompensació, on les parets del cor disminueixen de gruix i es produeix una dilatació del ventricle<sup>78</sup>. Els mecanismes responsables d'aquesta descompensació estan en debat, però inclouen la reducció de la densitat vascular (que provoca hipòxia), la mort de cardiomiòcits per necrosi, canvis en la matriu extracel·lular o l'alteració de proteïnes contràctils<sup>79</sup>.

Aquests canvis morfològics van acompanyats, a més, de fibrosi intersticial<sup>80</sup>. La fibrosi és l'acumulació de proteïnes de la matriu extracel·lular (col·lagen, fibronectina, MMPs i inhibidors de MMPs (TIMPs)). Els fibroblasts cardíacs són el tipus cel·lular més abundant al cor, i representen entre el 60-70% de totes les cèl·lules. En condicions no patològiques, es troben

entre la matriu al voltant dels cardiomiòcits, produint components de la matriu. Aquest procés és constant, havent un equilibri entre la síntesi i la degradació de col·lagen.

En resposta a diferents tipus d'estrès els fibroblasts s'activen i evolucionen a miofibroblasts, cèl·lules amb un fenotip migratori i contràctil que expressen marcadors característics de les cèl·lules musculars llises (proteïnes contràctils com l'alfa actina de múscul llis ( $\alpha$ -SMA)). Els miofibroblasts produeixen proteïnes de la matriu, especialment col·lagen I i III, així com factors de creixement, citocines i proteases<sup>81</sup>. Tenen una capacitat de proliferació augmentada, i degut a que la regeneració del cor és pràcticament nul·la, migren a les zones que han patit dany tissular, on la seva funció en els processos de reparació és bàsica i permet la preservació de la integritat estructural i funcional<sup>82</sup>. L'activació de forma persistent dels miofibroblast però, porta a una deposició i acumulació aberrant de col·lagen al cor, causant un augment de la rigidesa ventricular, que porta a una disfunció contràctil així com a un augment d'arrítmies<sup>82</sup>.

L'activació de les vies pro-fibròtiques activen també altres tipus cel·lulars (macròfags, limfòcits, cardiomiòcits, cèl·lules vasculares, etc.) que contribueixen de forma indirecta a la fibrosi, secretant mediadors fibrogènics (factor  $\alpha$  de necrosi tumoral (TNF- $\alpha$ ), factors de creixement tals com el factor de creixement de fibroblasts (FGF) o el factor de creixement transformant  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), o factors com l'angiotensina II o l'endotelina-1) que activen els fibroblasts<sup>80</sup>.

La sobreexpressió de TGF- $\beta$ 1 en resposta a un estímul patològic resulta en un augment de la hipertròfia i fibrosi cardíaca. L'activació de la via canònica de TGF- $\beta$ 1-Smad2/3 en resposta a la sobrecàrrega de pressió contribueix a la fibrosi cardíaca sense induir hipertròfia<sup>83</sup>. En canvi, la via no-canònica Smad-TAK1 (cinasa activada per TGF- $\beta$ 1) indueix hipertròfia patològica i fibrosi<sup>84</sup>.

Finalment, la resposta inflamatòria també juga un paper important en els canvis estructurals. La infiltració de cèl·lules inflamatòries de forma crònica és perjudicial, danya el teixit i incrementa la fibrosi reactiva<sup>85</sup>. Els nivells de citocines pro-inflamatòries com TNF- $\alpha$  o de les interleucines (IL) IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8 o IL-18 s'han trobat elevats en pacients amb IC<sup>86,87</sup>

#### **1.2.4) Mecanismes implicats en el remodelat advers**

Les patologies com la hipertensió o l'infart de miocardi promouen el remodelat patològic principalment a través d'hormones neuroendocrines (com l'angiotensina II, l'endotelina o les catecolamines) i forces mecàniques, i activen vies de senyalització diferents de les involucrades en el remodelat fisiològic (Figura 5).

##### **1.2.4.1) Angiotensina II i endotelina 1**

El sistema renina-angiotensina (RAS) és un dels principals sistemes implicats en el remodelat ventricular i per això constitueix una de les dianes més efectives en el seu tractament farmacològic, ja sigui amb l'ús d'inhibidors de l'enzima convertidora de l'angiotensina (IECA) o bé amb bloquejadors del receptor de l'angiotensina. El sistema endotelina també es troba implicat en el remodelat ventricular, però a diferència del sistema RAS, l'ús d'inhibidors de



l'enzima convertidora de l'endotelina o d'antagonistes del receptor de l'endotelina en assajos clínics no ha reportat efectes positius<sup>88</sup>.

Tant el sistema RAS com el de l'endotelina s'han trobat elevats en models animals d'IC<sup>89-91</sup> així com en pacients amb IC<sup>92,93</sup>. L'increment dels nivells d'endotelina I i angiotensina II provoca l'activació dels seus receptors GPCRs (ET<sub>A</sub>R i AT<sub>1</sub>R respectivament), causant l'activació de proteïnes G tals com G<sub>αq</sub>. La senyalització per G<sub>αq</sub> activa a la fosfolipasa C (PLC), que catalitza la síntesi d'inositol trifosfat (IP<sub>3</sub>). El IP<sub>3</sub> promou l'alliberament de Ca<sup>2+</sup> del reticle sarcoplasmàtic a través dels receptors IP<sub>3</sub>, i aquesta alliberació provoca l'activació de proteïnes dependents de Ca<sup>2+</sup> com són la calmodulina (CaM) i la calcineurina.

La calmodulina actua com a receptor de Ca<sup>2+</sup> gràcies als 4 llocs d'unió reversible que presenta i regula la senyalització intracel·lular lligada a canvis en la concentració de Ca<sup>2+</sup>. La calmodulina activa a la seva vegada dos dianes: la proteïna cinasa Cα (PKCα) i la proteïna cinasa dependent de calci/calmodulina tipus II (CaMKII). Entre altres efectes, la cascada d'activació lligada a PKCα provoca la defosforilació de PLN i desregula la contractilitat cardíaca<sup>94</sup>. La seva funció s'ha estudiat en animals transgènics, on s'ha vist que els ratolins PKCα KO presenten hipercontractilitat mentre que els ratolins amb una sobreexpressió de PKCα presenten disfunció contràctil<sup>95</sup>. Per la seva banda, l'activació crònica de la CaMKIIδ, la isoforma predominant al cor, s'ha demostrat que promou hipertròfia patològica i la transició a IC per un mecanisme lligat a la fuga de Ca<sup>2+</sup> del reticle sarcoplasmàtic a través del receptor de rianodina<sup>96</sup>. A més, la CaMKII provoca la fosforilació i translocació fora del nucli de la histona deacetilasa 4 (HDAC4), perdent la seva funció fisiològica com a repressor de la hipertròfia cardíaca<sup>97</sup>.

L'activació de la calcineurina provoca la defosforilació del factor nuclear de cèl·lules T activades (NFAT) i la seva translocació al nucli. Un cop al nucli, interactua amb cofactors transcripcionals com GATA3 o MEF2A, i estimula l'expressió de gens hipertròfics<sup>98</sup>. Aquesta via és una de les vies millors caracteritzada en la hipertròfia patològica, i no intervé en la hipertròfia fisiològica produïda per l'exercici o durant l'embaràs<sup>99</sup>.

### 1.2.4.2) Catecolamines

Juntament amb el sistema RAS, el sistema nerviós simpàtic o adrenèrgic és un dels principals sistemes involucrats en el remodelat ventricular. La seva activació incrementa els nivells de catecolamines en sang, fet que correlaciona inversament amb la supervivència en pacients amb IC<sup>100,101</sup>. És per això que també són una de les dianes clàssiques en el tractament del remodelat, principalment a través de l'ús de β-bloquejants.

Les catecolamines són hormones neuropeptídiques que activen l'adenilil ciclasa i incrementen els nivells de AMPc a través dels receptors adrenèrgics, una subclasse de GPCRs. Els receptors adrenèrgics es divideixen en tres subfamílies, α<sub>1</sub>-AR, α<sub>2</sub>-AR i β-AR, sent la forma β<sub>1</sub> la predominant al cor. En els receptors α la senyalització és a través de la proteïna G<sub>αq</sub>, mentre que en els β és a través de G<sub>αi</sub>/G<sub>αs</sub>.

L'increment dels nivells de AMPc activa la proteïna cinasa A (PKA), i aquesta augmenta els nivells de Ca<sup>2+</sup> citosòlics a través de la fosforilació de proteïnes involucrades en la regulació del Ca<sup>2+</sup> i proteïnes contràctils. L'activació dels receptors és inicialment adaptativa, ja que

incrementa la contractilitat<sup>102</sup>, però l'activació crònica sostinguda provoca hipertròfia i IC, associada amb una dessensibilització i regulació negativa dels receptors  $\beta$ -AR<sup>103</sup>. Aquesta dessensibilització és modulada per una GPCR cinasa (GRK), sent les formes GRK2 i GRK5 les que s'expressen de forma predominant al cor i que es troben sobreexpressades en la IC<sup>104</sup>.

GRK2 és un regulador de la senyalització per GPCRs, i es troba elevat en pacients amb IC així com en models d'animals sotmesos a estrès crònic<sup>105,106</sup>. L'ablació gènica de GRK2 està associada amb una reducció de la disfunció ventricular i remodelat postinfart<sup>107</sup>, i els nivells baixos de GRK2 correlacionen amb una millora de la funció cardíaca en pacients amb IC<sup>108</sup>.

En condicions fisiològiques, GRK2 ajuda a la finalització de la senyalització  $\beta$ -AR, fosforilant el receptor i dessensibilitzant-lo, reduint així el risc d'arítmies<sup>109</sup>. Amb l'activació adrenèrgica crònica, l'expressió i activitat de GRK2 es troben augmentades, conduint a la dessensibilització dels receptors  $\beta$ -AR amb efectes negatius associats com la resistència a l'insulina o la disfunció mitocondrial, que contribueixen a la progressió de la IC<sup>110,111</sup>. S'ha descrit a més que GRK2 participa en la inducció del remodelat patològic a través de l'activació de NFAT<sup>106</sup>.

#### 1.2.4.3) Mecanosensors

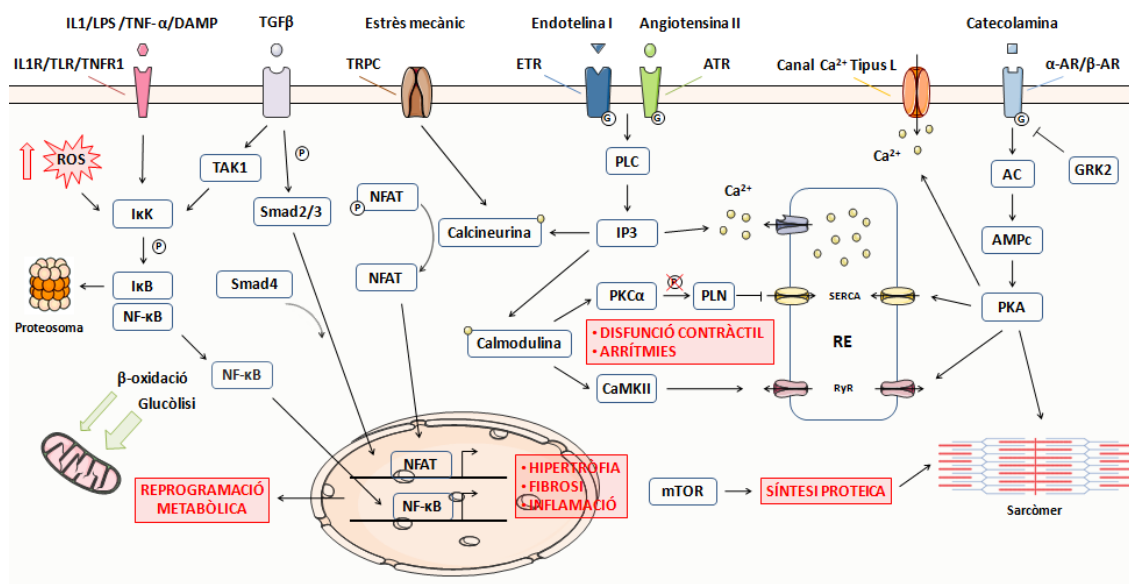
Els receptors de potencial transitori canònics (TRPC) són canals no selectius de cations que s'expressen al cor, i que diferents estudis han relacionat amb la hipertròfia patològica a través de la via de calcineurina-NFAT<sup>112</sup>. De les 7 isoformes, el TRPC3 i el TRPC6 són importants en el desenvolupament de hipertròfia patològica, i la seva deleció s'ha vist que redueix aquesta hipertròfia maladaptativa en models de sobrecàrrega de pressió<sup>113</sup>. El mateix efecte s'observa en un model de TAC amb animals que expressen una variant genètica negativa de TRPCs<sup>114</sup>. Els animals KO per TRPC4 també han mostrat una menor hipertròfia patològica i disfunció contràctil en resposta a un infart de miocardi<sup>115</sup>. En contraposició amb els models de remodelat en animals, en mostres de miocardi de pacients amb IC s'ha detectat un increment significatiu en els nivells d'expressió de TRPC1 i TRPC5<sup>116</sup>.

#### 1.2.4.4) Via de senyalització NF- $\kappa$ B

Les proteïnes factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) són una família de factors de transcripció que es troben relacionats amb diversos processos, entre els quals es troba la regulació de la resposta immunològica, la regulació de gens de citocines proinflamatories, el dany per isquèmia-reperfusió, la hipertròfia o la proliferació cel·lular<sup>117</sup>.

El NF- $\kappa$ B s'activa en resposta a una àmplia gamma d'estímuls externs que inclouen citocines inflamatories, substàncies derivades de patògens o diferents tipus d'estrès<sup>118</sup>. La via d'activació canònica de NF- $\kappa$ B és a través de la fosforilació (catalitzada per les cinases dels inhibidors- $\kappa$ B (IKK)) i degradació mediada pel proteosoma de l'inhibidor- $\kappa$ B (I $\kappa$ B)<sup>119</sup>, i la subseqüent entrada al nucli i unió al DNA de les subunitats transcripcionals. Amb la pèrdua de l'inhibidor, queda desemmascarada una seqüència de localització nuclear en el dímer NF- $\kappa$ B (habitualment p65/p50), que promou la seva translocació al nucli, on s'uneix a seqüències específiques de resposta a NF- $\kappa$ B. La unió a les regions  $\kappa$ B regula l'expressió de gens involucrats en processos d'adhesió i migració de cèl·lules inflamatories, hipertròfia i fibrosi<sup>120</sup>.

S'ha descrit que l'activitat NF-κB es troba augmentada en el miocardi de pacients amb IC avançada<sup>121</sup>. D'altra banda, estudis en models animals amb depleció de NF-κB cardioespecífica demostren que l'activació de NF-κB és suficient per induir remodelat ventricular i IC<sup>122,123</sup>.



**Figura 5.** Representació esquemàtica de les diferents vies de senyalització que participen en el remodelat ventricular patològic.

### 1.3) ESTRATÈGIES I TERÀPIES FARMACOLÒGIQUES CONTRA EL REMODELAT PATOLÒGIC CARDÍAC I INSUFICIÈNCIA CARDÍACA

Les estratègies pel tractament del remodelat advers i IC tenen per objectiu prevenir la progressió del remodelat ventricular i retardar l'aparició dels símptomes de la IC, o un cop la IC es troba establerta, alentir la seva evolució i millorar els seus símptomes. Aquestes estratègies inclouen des de modificacions en l'estil de vida que redueixin l'exposició a factors de risc, l'ús de dispositius implantables o cirurgia, fins a la teràpia farmacològica.

En pacients amb IAM, la grandària de l'infart és el principal determinant de la severitat del remodelat ventricular advers. Per tant, el primer objectiu per reduir el risc de desenvolupar remodelat ventricular en aquest tipus de pacients és limitar la mida de l'infart aplicant estratègies de reperfusió el més aviat possible. A més, degut a que el dany per reperfusió redueix l'eficàcia de la reperfusió coronària, són molts els esforços que s'estan fent per trobar estratègies cardioprotectores que, aplicades de manera coadjuvant a les tècniques de reperfusió atenuïn la mida de l'infart. Les estratègies basades en l'aplicació de cicles intermitents d'isquèmia just abans o durant els primers minuts de la reperfusió aplicats en el propi miocardi (postcondicionament isquèmic) o a distància (condicionament isquèmic remot) han provat la seva eficàcia en diferents estudis clínics<sup>124,125</sup>. Per una altra banda, les estratègies farmacològiques orientades a disminuir el dany per reperfusió que han demostrat la seva efectivitat a nivell experimental són molt variades. Les principals s'han centrat en la

preservació de la via de senyalització lligades a la proteïna cinasa G (PKG), ja sigui estimulant l'activitat de la guanilat ciclasa<sup>126</sup> o bé per l'estimulació de la producció d'òxid nítric. Una altra estratègia molt estudiada és la inhibició de l'obertura del mPTP actuant sobre la ciclofilina D<sup>127</sup>. No obstant, tot i els resultats positius obtinguts en estudis preclínic i en diferents estudis clínics realitzats com a prova de concepte, cap estratègia cardioprotectora s'ha pogut traslladar fins ara a la pràctica clínica.

Un cop diagnosticada la IC, conseqüència de la progressió de remodelat ventricular ja sigui causat per un estímul d'origen isquèmic com no isquèmic, les estratègies terapèutiques habituals es basen principalment en l'ús de diürètics per alleujar la simptomatologia i en la modulació de la resposta neurohormonal lligada al sistema RAS i catecolamines.

Emmarcat dins del primer grup, molt recentment s'ha aprovat l'ús d'inhibidors del cotransportador de sodi-glucosa de tipus 2 (iSGLT2), que han mostrat beneficis significatius renals i cardiovasculars en pacients diabètics, incloent l'hospitalització per IC. Aquests beneficis, però, també s'han observat en pacients no diabètics amb IC amb fracció d'ejecció preservada<sup>128</sup>.

Dins del segon grup, l'ús d'inhibidors de IECAs o antagonistes dels receptors d'angiotensina II (ARAI) i betabloquejants com a primera línia de tractament, seguits d'antagonistes del receptor de mineralocorticoides (MRA), ha demostrat que millora la funció cardíaca, redueix les admissions als hospitals i allarga la vida dels pacients, independentment del grau de severitat de la IC i de l'existència de malaltia coronària o no<sup>129-131</sup>. Més recentment, Entresto, un compost que combina els efectes d'un inhibidor de neprilisina (Sacubitril) i un ARAII (Valsartan), ha resultat ser superior a l'administració d'IECAs en reduir el risc de mort i hospitalització per IC<sup>132</sup>.

Tot i així, les teràpies farmacològiques actuals només aconseguen disminuir la progressió del remodelat ventricular. La mortalitat i la morbiditat associada a la IC continuen sent elevades i la seva càrrega socioeconòmica continua augmentant. Per tant, cal identificar noves dianes que permetin desenvolupar millors opcions farmacològiques per tractar el remodelat miocardiàc i evitar la seva progressió a IC.

#### **1.4) CALPAÏNES**

La patofisiologia del remodelat ventricular és complexa, afecta als diferents tipus cel·lulars del miocardi, i inclou l'acció de diferents proteïnes i vies de senyalització. Tal com s'ha explicat, una de les conseqüències lligades als estímuls patològics crònics causants del remodelat cardíac és l'alteració de l'homeòstasi del  $Ca^{2+}$ . Aquests canvis que comporten l'augment de la concentració de  $Ca^{2+}$  intracel·lular modulen de forma directa l'activitat de les calpaïnes, una família de cisteïna proteases no lisosomals activades per  $Ca^{2+}$ <sup>133</sup>.

Les calpaïnes són essencials en processos fisiològics regulats per  $Ca^{2+}$  (proliferació, migració cel·lular, cicle cel·lular, apoptosi, remodelat del citoesquelet o transducció de senyals<sup>134,135</sup>), però les condicions patològiques associades amb un increment de la concentració de  $Ca^{2+}$  porten a la sobreactivació de les calpaïnes i la proteòlisi limitada d'una gran varietat de

proteïnes. Durant els últims anys, diferents estudis experimentals han proposat que les calpaïnes juguen un paper clau en el remodelat miocardiàc i IC, tant de manera indirecta, contribuint a la mida de l'infart en pacients amb IAM<sup>136,137</sup>, com directa, participant en les vies de transducció de senyal lligades a la resposta inflamatòria, hipertròfia dels cardiomiòcits i fibrosi intersticial<sup>138-141</sup>.

D'acord amb aquestes evidències, les calpaïnes podrien ser una nova diana terapèutica pel tractament del remodelat ventricular advers i la IC.

#### 1.4.1) Isoformes, estructura i expressió

Dins la superfamília de les calpaïnes, s'han trobat homòlegs de les calpaïnes en la majoria d'eucariotes i alguns bacteris<sup>142</sup>. En els humans s'han identificat fins a 15 gens de calpaïnes que codifiquen per la subunitat catalítica i 2 gens que codifiquen per la subunitat reguladora. Les primeres isoformes identificades, les més abundants i expressades de forma ubiqua són la calpaïna-1 (o  $\mu$ -calpaïna) i la calpaïna-2 (o m-calpaïna), i es diferencien entre sí per la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  que requereixen *in vitro* per ser activades, sent de l'ordre de micromolar en el cas de la calpaïna 1 i milimolar en el cas de la 2<sup>143</sup>. Aquestes dues isoformes són conegudes com a calpaïnes clàssiques i, en general, quan es parla de l'activitat de les calpaïnes, es fa referència bàsicament a la seva activitat conjunta. Les calpaïnes han estat classificades d'acord a la presència o no de dominis "EF hands" d'unió a  $\text{Ca}^{2+}$  en convencionals o típiques (isoformes 1, 2, 3, 8, 9, 11, 12 i 13) i no convencionals o atípiques (isoformes 5, 6, 7, 10, 14 y 15.), o bé d'acord a si la seva expressió és ubiqua (isoformes 1, 2, 5, 7, 10, 12, 14 y 15) o es produeix en teixits específics (isoformes 3, 6, 8, 9, 11 y 13).

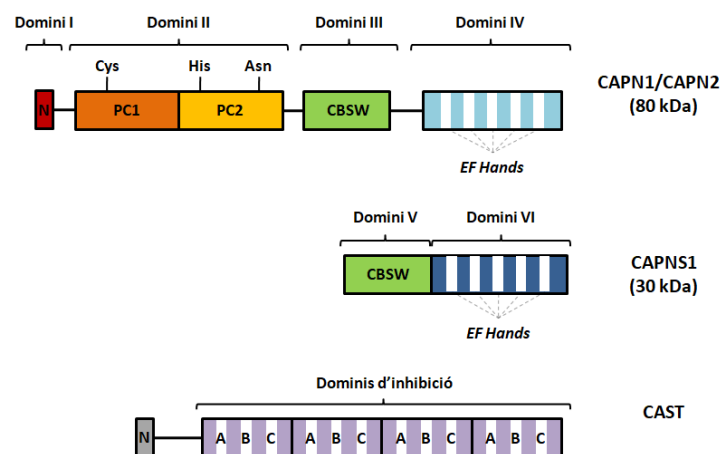
L'estructura de les calpaïnes 1 i 2 consisteix en un heterodímer que consta d'una subunitat catalítica gran (CAPN1 i CAPN2) de 80kDa i una subunitat reguladora petita (calpaïna 4 o CAPNS1) de 28 kDa comuna a les dues. La subunitat catalítica és específica per a cada calpaïna però amb una homologia en les seqüències més o menys conservada, i conté diferents regions ben diferenciades (Figura 6):

- Domini I o domini N terminal, relativament petit en les dues (només 87 i 76 residus per la calpaïna 1 i 2 respectivament), en forma hèlix alfa, és autolisat quan la calpaïna s'exposa a  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Domini II o domini cisteïna proteasa (CysPc) que es divideix en dos subdominis, el nucli proteasa 1 i nucli proteasa 2 (PC1 i PC2), on cada un d'ells presenta un lloc d'unió a  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>144</sup>. És aquí on es troben els tres aminoàcids (cisteïna, histidina i aspargina) que constitueixen la triada catalítica característica de les proteases. En absència de  $\text{Ca}^{2+}$ , però, els dominis PC1 i PC2 tenen una estructura oberta i no formen la triada catalítica, ja que romanen separats per més de 10 Å<sup>145</sup>. L'activació per  $\text{Ca}^{2+}$  no canvia l'estructura global de la calpaïna, sinó que un ió  $\text{Ca}^{2+}$  s'uneix a cada un dels dominis PC, fent que quedin connectats i formin l'estructura tancada i activa<sup>146</sup>.
- Domini III o domini de calpaïna tipus  $\beta$ -sandwich (CBSW). Presenta una estructura de 8 cadenes  $\beta$ , una estructura semblant a la del TNF- $\alpha$  o els dominis C2 de diverses

proteïnes regulades per  $\text{Ca}^{2+}$  (com la PKC). Té la funció d'unió i transmissió de canvis conformacionals entre els dominis CysPC i el domini C terminal, així com intervenir en la translocació de les calpaïnes a la membrana i en la interacció amb fosfolípids.

- Domini IV o domini C terminal, té certa homologia amb la calmodulina, i presenta 5 seqüències “EF hands” d'unió a  $\text{Ca}^{2+}$  (PEFs). La dimerització de les dues subunitats es produeix per la cinquena mà EF del domini C terminal d'ambdues subunitats.

La subunitat reguladora petita CAPNS1 es compon únicament de dos dominis. El domini V o domini N terminal és un domini ric en glicina (GR) i aminoàcids hidrofòbics, i és responsable de la interacció de les calpaïnes amb les membranes a través d'interaccions hidrofòbiques<sup>147</sup>. El domini VI o domini C terminal és un domini amb 5 “EF Hands”, que igual que el domini C terminal de la subunitat gran, presenta certa homologia a la calmodulina. El paper de la subunitat reguladora resulta essencial per l'estabilitat de la subunitat catalítica<sup>148</sup>.



**Figura 6.** Estructura esquemàtica de la subunitat catalítica de les calpaïnes 1 i 2 (CAPN1 i CAPN2), de la subunitat reguladora (CAPNS1) i de la calpastatina (CAST).

#### 1.4.2) Mecanismes d'activació i regulació

L'activitat de les calpaïnes està estretament regulada pel seu inhibidor endogen calpastatina i el control de la homeòstasi  $\text{Ca}^{2+}$ . *In vitro*, el  $\text{Ca}^{2+}$  és l'únic factor que pot activar les calpaïnes en absència d'altres factors, però ho fa a unes concentracions, sobretot en el cas de la calpaïna 2, molt superiors a les concentracions de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic que els cardiomiòcits poden arribar a aconseguir en condicions fisiològiques (entre 50 i 300 nM<sup>149,150</sup>). Per poder explicar l'activació de la calpaïna *in vivo* s'han suggerit diversos mecanismes que contribueixen a reduir el llindar de  $\text{Ca}^{2+}$  requerit per l'activació de les calpaïnes o bé contribueixen a la seva translocació a localitzacions amb altes concentracions locals de  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 1.4.2.1) Calci

En absència de  $\text{Ca}^{2+}$ , els dominis PC1 i PC2 es troben separats per restriccions estructurals fruit de les interaccions entre els dominis. La presència de  $\text{Ca}^{2+}$  activa les calpaïnes mitjançant la inducció de canvis conformacionals en la subunitat catalítica que permeten la formació de la triada catalítica<sup>145,151</sup>. La unió del  $\text{Ca}^{2+}$  a les calpaïnes es produeix en dues fases: en la primera fase 4 ions de  $\text{Ca}^{2+}$  s'uneixen als dominis de "EF hands" de les subunitats catalítica i reguladora i en una segona fase es produeix la unió de  $\text{Ca}^{2+}$  als llocs d'unió dels dominis PC1 i PC2. La primera unió provoca un canvi en la disposició dels dominis que afavoreix l'estabilització del nucli de l'enzim i la dissociació de les dues subunitats, mentre que la segona unió provoca la formació del centre catalític<sup>144,152</sup>.

Amb la unió de  $\text{Ca}^{2+}$ , el domini N terminal, tant de la subunitat catalítica com de la reguladora és autolisat. S'ha proposat que aquesta autòlisi redueix els nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  necessaris per l'activació de les calpaïnes<sup>153,154</sup>, pot canviar l'especificitat dels substrats i redueix l'estabilitat de la proteïna facilitant la dissociació de les dues subunitats<sup>155,156</sup>. L'autòlisi no és un pas imprescindible en l'activació de les calpaïnes donat que s'ha observat activitat proteolítica en calpaïnes sense l'extrem N terminal autolisat, i el modelatge 3D de l'estructura de les calpaïnes no mostra que els dominis N terminals estiguin bloquejant el centre catalític<sup>133,156</sup>. Les concentracions de  $\text{Ca}^{2+}$  necessàries per induir la proteòlisi són semblants a les necessàries per la seva activació. Amb tot, l'autòlisi representa un mecanisme important de regulació de l'activitat i especificitat de les calpaïnes.

Un dels models més acceptats per explicar el menor requeriment de  $\text{Ca}^{2+}$  *in vivo* és el de la translocació de les calpaïnes a la membrana plasmàtica en resposta a un increment en les concentracions de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic<sup>157</sup>. Un cop a la membrana, les calpaïnes interactuen amb fosfolípids (com el fosfatidilinositol (PI) o el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat (PIP<sub>2</sub>))<sup>158</sup> a través dels dos llocs d'unió identificats en els dominis III i V respectivament<sup>159,160</sup>.

Diferents estudis han proposat que la translocació redueix la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  necessària per la seva activació<sup>160,161</sup>, degut a que el  $\text{Ca}^{2+}$  s'uneix principalment als grups fosfats dels fosfolípids presents a la membrana plasmàtica<sup>162</sup> o bé degut a que situa l'enzim a prop de canals de  $\text{Ca}^{2+}$ . Diferents fosfolípids, sent el PIP<sub>2</sub> el més efectiu, han demostrat disminuir entre 3-6 vegades la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  requerida per l'autòlisi de la calpaïna 1 i 2<sup>163,164</sup> en assajos *in vitro*. Aquesta disminució, però, requereix d'una ràtio molar de fosfolípids per cada molècula de calpaïna massa elevat, i tot i així les concentracions de  $\text{Ca}^{2+}$  necessàries segueixen sent massa elevades per ser un mecanisme rellevant d'activació *in vivo*.

Altres estudis en eritròcits, però, proposen que les calpaïnes interactuen amb proteïnes a la membrana i no amb fosfolípids<sup>165,166</sup>, mentre que d'altres han mostrat que la unió de les calpaïnes amb PI a la membrana dels eritròcits no varia la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  necessària per l'autòlisi<sup>167</sup>. Aquestes discrepàncies podrien ser explicades per diversos estudis en els que s'associen les calpaïnes amb "lipids rafts" o microdominis lipídics, i que en la seva composició trobem la presència de colesterol, glucoesfingolípids i proteïnes unides a glicosilfosfatidilinositol (GPI)<sup>168</sup>.

D'altra banda el mecanisme de translocació i augment de  $\text{Ca}^{2+}$  també s'ha posat en dubte, ja que també s'ha observat la translocació mediada per fosforilació en fibroblasts<sup>169</sup>, la presència de calpaïna 1 a la membrana de forma majoritària sense translocació i activació per senyalització intracel·lular associada al receptor NMDA<sup>170,171</sup>, l'activació de diferents calpaïnes sense translocació ni autòlisi<sup>172,173</sup> i, inclús, la translocació nuclear de la calpaïna 2 en diferents patologies com condicions neurodegeneratives o models de TAC<sup>174,175</sup>.

Globalment l'evidència experimental indica que la translocació i l'autòlisi són mecanismes lligats a l'activació de les calpaïnes, encara que resta saber si són processos imprescindibles perquè aquesta activació es produeixi en situacions patològiques associades amb la desregulació de la homeòstasi del  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### 1.4.2.2) Calpastatina

La calpastatina (CAST) és l'únic inhibidor endogen de les calpaïnes que es coneix fins a la data d'avui. La seva activitat inhibidòria és específica de les calpaïnes, amb una eficiència semblant per la calpaïna 1 i 2, i no inhibeix altres proteases<sup>176,177</sup>.

La calpastatina és una proteïna monomèrica codificada per un sol gen, però existeixen diferents promotors i diverses variants resultant de *splicing*<sup>178,179</sup>. Fins a 8 isoformes diferents de la calpastatina s'han identificat en teixits, amb un rang de pes molecular que va dels 17,5 kDa als 84 kDa. L'expressió de la calpastatina, igual que la de les calpaïnes 1 i 2, és ubiqüa a tots els tipus cel·lulars, encara que la isoforma que s'expressa en cada teixit varia, podent existir diferents isoformes en el mateix teixit. A diferència de les calpaïnes, la calpastatina i l'activitat d'aquesta només ha sigut identificada en vertebrats.

La isoforma de la calpastatina amb l'estructura més llarga de totes consisteix en una regió N terminal no inhibidòria que juga un paper en la regulació de canals de  $\text{Ca}^{2+180}$ , seguida de quatre dominis d'inhibició, cada un dels quals inhibeix una molècula de calpaïna<sup>181,182</sup>. Cada un d'aquests dominis a la seva vegada es troba dividit en tres subdominis anomenats A, B i C.

La unió de la calpastatina a les calpaïnes és reversible i depèn de  $\text{Ca}^{2+183}$ , ja que únicament s'uneix a les calpaïnes quan aquestes estan en la seva forma activa (i per tant tenen  $\text{Ca}^{2+}$  unit). Els subdominis A i C, d'estructura hèlix alfa, s'uneixen als dominis PEF tant de la subunitat catalítica com de la reguladora, estabilitzant el complex calpastatina-calpaïna. Amb aquesta unió, el subdomini B interacciona amb el domini CysPc de les calpaïnes, forma un bucle sobre el lloc actiu i impedeix la unió del substrat i l'activitat hidrolítica de la calpaïna<sup>184,185</sup>.

La calpastatina a la seva vegada també és un dels substrats de l'activitat catalítica de les calpaïnes i la seva degradació és promoguda per l'activació prolongada de les calpaïnes<sup>186</sup>. A més, la calpastatina pot ser fosforilada per la PKA. La fosforilació *in vivo* de la calpastatina modifica la seva localització subcel·lular, incrementant el percentatge de calpastatina associada a la membrana<sup>187</sup>, i la seva especificitat, disminuint *in vitro* la seva eficiència en la inhibició de les calpaïnes<sup>188</sup>.



### 1.4.2.3) Modificacions post-traduccionals

Més enllà dels mecanismes principals de regulació de l'activitat de les calpaïnes, s'han proposat altres menys caracteritzats basats en modificacions post-traduccionals de les calpaïnes.

Diferents estudis suggereixen que l'activitat de les calpaïnes es pot modular per fosforilació. S'han identificat fins a 9 i 8 residus susceptibles de ser fosforilats a la calpaïna 1 i 2 respectivament<sup>133</sup>. La majoria d'aquests residus s'han localitzat a la subunitat 80 kDa i alguns al domini V de la subunitat 30 kDa, mentre que no s'ha identificat cap residu fosforilable als dominis IV o VI. Els residus s'agrupen en dos regions concretes de la calpaïna: a la unió dels dominis I i II (PC1), i a l'extrem NH<sub>2</sub> del domini II (PC2). No tots els residus es troben fosforilats en la mateixa freqüència, però de mitjana les calpaïnes contenen entre 2 i 4 fosfats. La fosforilació dels residus modifica l'activitat proteolítica de les calpaïnes de diferent manera, i s'ha descrit que l'eliminació de tots els fosfats dels residus Ser i Thr dóna lloc a una calpaïna amb una activitat proteolítica pràcticament nul·la<sup>133</sup>, suggerint també una funció estructural constitutiva.

La PKA fosforila les calpaïnes a les posicions Ser369 i la Thr370. La fosforilació d'aquests aminoàcids té un efecte inhibitor de l'activitat de la calpaïna en fibroblasts<sup>189</sup>. L'efecte inhibitori d'aquestes fosforilacions es va confirmar *in vitro* utilitzant diferents mutants de la calpaïna 2<sup>190</sup>. En canvi, les cinases ERK fosforilen la calpaïna 2 a la posició Ser50, amb un efecte oposat. Aquesta fosforilació s'ha suggerit que pot activar les calpaïnes en fibroblasts estimulats amb EGF inclús sense la presència de Ca<sup>2+</sup><sup>191</sup>. A més, s'ha proposat que les fosforilacions mediades per ERK i PKA regulen la distribució de la calpaïna 2 entre el citoplasma i la membrana plasmàtica<sup>169,192,193</sup>.

Altres modificacions post-traduccionals que diversos estudis han suggerit que podrien modificar l'activitat de les calpaïnes són l'estrès oxidatiu/nitrossatiu, encara que els mecanismes involucrats en la regulació redox de l'activitat de la calpaïna i la seva importància encara no es coneixen del tot<sup>194</sup>. Els nivells de ROS poden activar a les calpaïnes de forma indirecte mitjançant canvis en els nivells de Ca<sup>2+</sup>. Els ROS incrementen el Ca<sup>2+</sup> citosòlic gràcies a afavorir l'alliberament de Ca<sup>2+</sup> del reticle sarcoplasmàtic i a disminuir l'extracció de Ca<sup>2+</sup> de la cèl·lula a través del dany en els transportadors de Ca<sup>2+</sup><sup>195</sup>. A més, l'activitat de la calpaïna també es veuria inhibida per l'oxidació i nitrosilació directa de la proteasa<sup>196,197</sup>.

### 1.4.3) Funcions fisiològiques de les calpaïnes

Les funcions fisiològiques de les calpaïnes encara no estan ben definides. S'han identificat més de 100 proteïnes substrat de les calpaïnes en experiments *in vitro*, encara que moltes no s'han confirmat que ho siguin també *in vivo*. Entre la gran varietat de substrats, s'inclouen receptors i transportadors de membrana (NCX, receptors NMDA, etc.), proteïnes del citoesquelet (fodrina, talina, troponina, etc.), factors de transcripció (p53, c-jun, c-fos, etc.) o enzims reguladors de diferents vies intracel·lulars (calcineurina, PKC, fosfolipasa C, etc.)<sup>133</sup>.

Molts estudis *in vivo*, per altra banda, han intentat esclarir les funcions fisiològiques de les calpaïnes utilitzant inhibidors. Malauradament, l'únic inhibidor específic i selectiu per les calpaïnes és el seu inhibidor endogen, la calpastatina. La majoria d'inhibidors emprats en aquests estudis són poc selectius, de manera que els resultats s'han d'interpretar amb cautela. Finalment, diferents estudis també han utilitzat diversos models amb animals transgènics bé deficientes pel gens CAPN1, CAPN2 o CAST o bé amb sobreexpressió de calpastatina. Els animals transgènics, però, són un sistema experimental simplificat i poden desenvolupar mecanismes compensatoris que dificulten la interpretació dels resultats.

Una de les funcions més estudiades i considerada com la més característica de les calpaïnes és el remodelat del citoesquelet. La proteòlisi de proteïnes del citoesquelet participa en diferents funcions cel·lulars, com la motilitat cel·lular, el desmuntatge de les adhesions focals, el desacoblament de les miofibril·les o la fusió de mioblasts<sup>198-201</sup>. La renovació de les cèl·lules musculars durant el creixement o el dany tissular implica l'eliminació de miofibril·les. Les calpaïnes degraden proteïnes del citoesquelet que estableixen les fibres fines i grosses de les miofibril·les<sup>202</sup>, provocant el seu desacoblament. Les calpaïnes, però, no actuen sobre els components principals del sarcòmer, la miosina i l'actina<sup>133</sup>. Per tant, la seva funció és alliberar filaments i produir fragments de proteïnes que posteriorment seran degradats pel proteosoma<sup>203</sup>.

Les calpaïnes també s'han implicat en la regulació de diferents vies de senyalització cel·lular i entre els seus substrats es troben molts enzims (cinases i fosfatases) i proteïnes del citoesquelet involucrats en la transducció de senyals. Per citar alguns dels molts exemples, les calpaïnes proteolitzen la PKC produint la seva forma constitutivament activa (la proteïna cinasa M (PKM))<sup>204</sup>, a diverses proteïnes implicades en les vies de senyalització dependents d'integrines (filamina, paxilina, RhoA, vinculina, etc.), al domini autoinhibitori de la calcineurina, produint la seva forma activa<sup>205</sup>, o a GSK-3<sup>206</sup>.

Les calpaïnes s'han relacionat amb la regulació del cicle cel·lular a través de la ciclina D1<sup>207</sup>, amb processos de diferenciació cel·lular com l'angiogènesi fisiològica<sup>208</sup> en resposta al factor de creixement endotelial vascular (VEGF) o amb la supervivència cel·lular, desencadenant la mort per apoptosi a través de l'activació de les procaspases 7 i 12 i la proteòlisi de proteïnes pro-apoptòtiques (Bax, Bid, AIF, p53) o de Atg5<sup>209-212</sup>. Estudis recents suggereixen també que les calpaïnes són efectors importants de la resposta immunitària sent essencial la seva activitat per la secreció de proteïnes en macròfags, per la regulació del inflammasoma NLRP3, en la mort cel·lular per piroptosi o en l'activació de cèl·lules T<sup>213-216</sup>.

Les diferents isoformes de les calpaïnes tenen funcions fisiològiques diferents. En el sistema neuronal, s'ha proposat que algunes funcions de la calpaïna 1 i la 2 tenen efectes oposats<sup>217</sup>. Així, s'ha descrit que la calpaïna 2 desencadena la diferenciació de *stem cells* neuronals, mentre que la 1 la reprimeix. Aquest impacte diferencial de les calpaïnes també s'ha observat en processos lligats a la memòria o la neurodegeneració.

Per últim, el paper fisiològic de les calpaïnes no clàssiques es coneix molt menys i aquest s'ha deduït del estudi de la patofisiologia lligada a diferents calpaïnopaties.

La calpaïna 3 s'expressa de forma abundant al múscul esquelètic, i calpaïnopaties causades per mutacions en el gen CAPN3 són responsables de distròfies musculars (com per exemple la distròfia muscular de cintura autosòmica recessiva tipus 2A (LGMD2A))<sup>218</sup>. La calpaïna 5 s'expressa principalment a la retina i a les sinapsis dels fotoreceptors i les mutacions que modifiquen la seva activitat provoquen patologies com la vitreoretinopatia<sup>219</sup>. També s'ha descrit que les calpaïnes 8 i 9, expressades en l'estòmac, tenen una funció protectora a la mucosa gàstrica i ratolins KO per aquestes calpaïnes són més susceptibles a les úlceres gàstriques induïdes per etanol<sup>220</sup>. Per la seva banda, diferents estudis proposen que la calpaïna 10 podria participar en la secreció d'insulina així com en la captació de glucosa estimulada per insulina<sup>221</sup>.

### **1.4.4) Patologies amb alteracions en l'activitat de les calpaïnes**

La desregulació de l'activitat de les calpaïnes s'ha associat amb diferents patologies<sup>222</sup>, moltes d'elles lligades a una sobreactivació degut a alteracions en la regulació del  $Ca^{2+}$  intracel·lular com en el cas de malalties neurodegeneratives, malalties cardiovasculars, isquèemies o càncers, i d'altres per deficiències en algun dels gens de les calpaïnes (calpaïnopaties) tal i com s'ha descrit en el paràgraf anterior.

Dintre de les patologies cardiovasculars, diferents evidències experimentals suggereixen que les calpaïnes podrien participar en el desenvolupament de remodelat cardíac advers i progressió a IC que es produeix en resposta a estímuls patològics crònics tant de causa isquèmica com no isquèmica. D'una banda, les calpaïnes participen en el dany agut per reperfusió i, per tant, poden contribuir al remodelat postinfart a partir del seu efecte sobre la mida de l'infart. D'una altra, estudis recents en els que s'ha modificat l'activitat calpaïna fent servir models transgènics indiquen que les calpaïnes també poden actuar directament sobre els processos d'inflamació, hipertròfia i fibrosi que caracteritzen el remodelat ventricular.

#### **1.4.4.1) Evidències de la contribució de les calpaïnes al dany agut per reperfusió**

Les calpaïnes participen de manera important en la mort dels cardiomiòcits que caracteritza el dany agut per reperfusió (Figura 7). Tal com s'ha explicat prèviament, durant la isquèmia i la fase inicial de la reperfusió, els cardiomiòcits perden el control de la homeòstasi de  $Ca^{2+}$ . Malgrat la sobrecàrrega de  $Ca^{2+}$  citosòlic que es produeix, diferents evidències experimentals demostren que l'acidosis intracel·lular manté inhibides a les calpaïnes durant l'episodi isquèmic<sup>223</sup>. La ràpida normalització del pH que es produeix amb la restauració del flux durant la reperfusió porta a la sobreactivació i desregulació de les calpaïnes.

Donant suport a la regulació de les calpaïnes per pH, aquelles estratègies experimentals destinades a prolongar l'acidosis intracel·lular (com l'administració d'una solució àcida durant els primers minuts de la reperfusió) o a retardar la normalització del pH (com el post-condicionament isquèmic), han demostrat reduir l'activació de les calpaïnes així com el dany per reperfusió<sup>224</sup>.

Un cop sobreactivades, les calpaïnes contribueixen a la disfunció contràctil i la mort dels cardiomiòcits durant la reperfusió del miocardi isquèmic mitjançant la proteòlisi d'una àmplia varietat de proteïnes que produeix diferents efectes deleteris a la cèl·lula:

1) Augment de la fragilitat del sarcolema: l'activació de les calpaïnes provoca la degradació de diferents proteïnes sarcolemals i del citoesquelet. Entre aquestes es troba la  $\alpha$ -fodrina, una proteïna del citoesquelet amb un paper crític en el manteniment de la integritat de la membrana plasmàtica i de l'estructura del citoesquelet. Diferents estudis han demostrat una relació directa entre la seva proteòlisi depenent de calpaïna i un increment en la fragilitat del sarcolema<sup>225</sup>. Durant la reperfusió, la tolerància del sarcolema a l'estrès mecànic induït per la contracció cel·lular i l'edema disminueix amb la degradació de la fodrina, incrementant la probabilitat de la ruptura del sarcolema i la mort per necrosi del cardiomiòcit<sup>226</sup>. Encara que menys caracteritzades, les calpaïnes també degraden altres proteïnes que poden contribuir a incrementar la fragilitat del sarcolema tals com la distrofina, talina, paxilina, vinculina, filamina, tau,  $\alpha$ -tubulina o vimentina<sup>227-230</sup>.

2) Contribució a la desregulació de l'homeòstasi del  $\text{Ca}^{2+}$ : juntament amb la  $\alpha$ -fodrina, la sobreactivació de les calpaïnes resulta en la proteòlisi de l'anquirina, proteïna que permet la connexió entre proteïnes integrals de membrana amb el citoesquelet mitjançant la seva unió a la  $\alpha$ -fodrina. La degradació del complex anquirina/fodrina causa el desancoratge de diversos receptors i canals de la membrana que afecten la seva correcta localització i funcionament. Entre els canals afectats es troben la subunitat alfa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa i l'intercanviador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ <sup>231,232</sup>. La inhibició de la seva funció provoca que l'elevació de la concentració de  $\text{Na}^+$  creada durant la isquèmia no es pugui normalitzar ràpidament durant la reperfusió, empitjorant encara més la sobrecàrrega de  $\text{Ca}^{2+}$  degut a la reducció de l'extrusió de  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>233,234</sup>. Per una altra banda, les calpaïnes també contribueixen a la desregulació de la homeòstasi del  $\text{Ca}^{2+}$  proteolitzant el receptor de rianodina i SERCA2, i, per tant, modificant la funció del reticle sarcoplasmàtic com a regulador de la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic<sup>235,236</sup>.

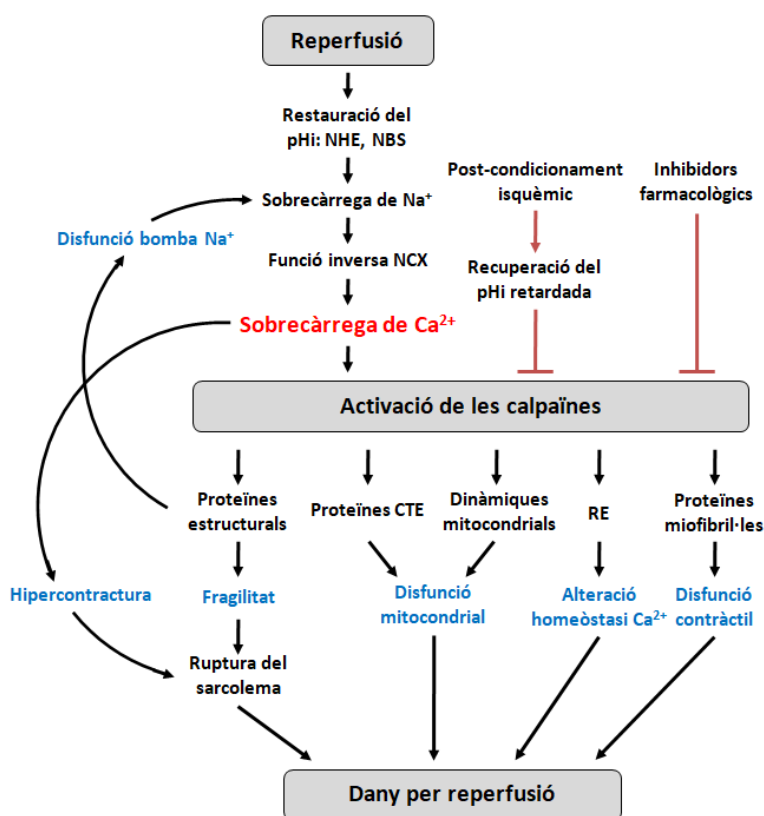
3) Desorganització de les miofibril·les: les calpaïnes contribueixen a la disfunció postisquèmica a través de la proteòlisi de diferents proteïnes involucrades en la contracció cel·lular. La degradació de proteïnes depenent de calpaïnes com la titina, desmina, troponina T cardíaca (cTnT), troponina I (cTnI) i  $\alpha$ -actinina s'ha observat en models experimentals de IR<sup>237-239</sup>, i en mostres humanes de miocardi<sup>202</sup>. La proteïna C d'unió a la miosina cardíaca (cMyBP-C) també s'ha vist que és hidrolitzada per la calpaïna durant la IR, generant un fragment N-terminal, que recentment també s'ha observat en mostres humanes d'infart de miocardi<sup>240,241</sup>. Més recentment, la junctophilina-2 (JPH2), una proteïna essencial per la maduració dels túbuls transversos i per l'acoblament excitació-contracció en cardiomiòcits adults, s'ha vist que es troba reduïda després d'una isquèmia transitòria, portant a una disfunció contràctil i a la IC, a causa del clivatge dependent de calpaïna del seu domini N-terminal<sup>242,243</sup>.

4) Alteració de la funció mitocondrial: s'ha proposat que la desregulació de l'activitat de calpaïnes amb localització mitocondrial pot alterar la funció de la cadena de transport d'electrons a l'actuar sobre les subunitats del complex I com la proteïna NADH dehidrogenasaubiquinona ferro-sulfur 7 (NDUFS7) i la proteïna NADHubiquinona oxidoreductase cadena 6 (ND6)<sup>244,245</sup>. S'ha descrit en ratolins transgènics amb sobreactivació

de la calpaïna 1 de forma restringida a les mitocondries dels cardiomiòcits que les calpaïnes mitocondrials també degraden la subunitat ATP5A1 de la ATP sintasa mitocondrial FoF1, causant l'augment en la generació de ROS, l'obertura del mPTP i la mort cel·lular<sup>245</sup>.

Altres estudis suggereixen que les calpaïnes mitocondrials també poden modular les dinàmiques mitocondrials a través de la degradació de OPA1, la disminució de la qual està associada amb la fissió mitocondrial, la inhibició de la mitofàgia i l'increment en el dany per reperfusió<sup>246</sup>. Les calpaïnes regulen de forma negativa la mitofàgia a diferents nivells, donat que també s'ha vist que degrada la proteïna beclina-1, un component necessari per la formació d'autofagosomes<sup>247</sup>.

5) Modulació de vies de senyalització: altres substrats de les calpaïnes com cinases o fosfatases poden alterar la funció de diverses vies de senyalització a diferents nivells. La proteòlisi de la PKC per la calpaïna 1 genera un fragment C-terminal que contribueix al dany per reperfusió<sup>248</sup>. Les calpaïnes també indueixen l'activació de la GSK-3 $\beta$  (regulador de l'obertura del mPTPT) a través del clivatge del seu domini inhibidor<sup>249</sup>.



**Figura 7.** Diagrama esquemàtic dels principals mecanismes a través dels quals les calpaïnes participen en el dany per reperfusió. Figura adaptada de <sup>250</sup>

#### 1.4.4.2) Evidències de la participació de les calpaïnes en el remodelat ventricular

A més de la seva contribució en el dany per reperfusió, estudis més recents demostren que la desregulació de l'activitat de les calpaïnes també s'observa en altres condicions patològiques que porten al desenvolupament de remodelat ventricular i IC.

L'increment en els nivells de les calpaïnes s'ha observat en diferents models experimentals de IC, ja siguin d'origen isquèmic (IC causada per la progressió de remodelat advers postinfart), o bé per sobrecàrrega de pressió induïda per TAC o estimulació neurohumoral (tractament crònic amb angiotensina II)<sup>138,139,141</sup>, així com en pacients amb IC congestiva<sup>251</sup>. Per altra banda, la majoria d'estudis utilitzant animals transgènics amb alteracions en el sistema calpaïna/calpastatina coincideixen en que la calpaïna juga un paper causal en el desenvolupament del remodelat cardíac i IC en models d'estrès crònic. La sobreexpressió transgènica de la calpaïna 1 a la mitocòndria causa remodelat ventricular advers i una mortalitat prematura<sup>245</sup>. Estudis amb animals transgènics amb sobreexpressió de la calpastatina descriuen una disminució en la hipertròfia, fibrosi i inflamació en resposta a models de remodelat per angiotensina II o infart<sup>138,252</sup>. En la mateixa direcció, la deficiència de la subunitat reguladora de les calpaïnes redueix el remodelat postinfart en ratolins sotmesos a isquèmia-reperfusió<sup>140</sup>.

L'evidència però no és del tot consistent, donat que també s'ha descrit que les calpaïnes podrien ser necessàries per a un correcte remodelat. En aquest sentit, la sobreexpressió de la calpastatina en un model d'oclusió coronària permanent s'ha descrit que provoca un menor reclutament i activació de cèl·lules inflamatòries, particularment de cèl·lules T i macròfags M2, a la zona infartada<sup>253</sup>. Això provoca una mala reparació i formació de la cicatriu postinfart, així com major probabilitat de ruptura del ventricle i una mortalitat més elevada<sup>253</sup>. També s'han suggerit rols protectors de la calpaïna en situacions d'estrès hemodinàmic com la sobrecàrrega de pressió<sup>254</sup>, on la disminució en els nivells de calpaïna 1 i 2 afavoreix la dilatació ventricular, disfunció contràctil i IC.

Tot i que encara no es coneixen amb exactitud, s'han proposat diferents mecanismes intracel·lulars per explicar la contribució de les calpaïnes en el remodelat ventricular. Aquests inclouen la regulació de l'activitat de diferents factors nuclears i el clivatge de la JPH2.

Les calpaïnes degraden l'inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$ <sup>255</sup>, permetent la translocació al nucli de NF- $\kappa$ B i la subseqüent activació de la transcripció de gens implicats en el remodelat ventricular. En models animals d'infusió crònica d'angiotensina II, la deleció de la subunitat p50 o l'expressió d'un super-repressor de NF- $\kappa$ B limita la hipertròfia induïda<sup>256</sup>.

Les calpaïnes també poden activar la via de la calcineurina a través de la proteòlisi del seu domini autoinhibitori o via la degradació de l'inhibidor cain/cabin<sup>257</sup>, permetent la desfosforilació de NFAT i la seva translocació al nucli, on activa l'expressió de gens hipertròfics. Si bé la deleció de NFAT provoca la disminució de l'hipertròfia cardíaca en resposta a la infusió d'angiotensina II i la sobrecàrrega de pressió<sup>258</sup>, fins ara no s'ha demostrat que la calpaïna contribueixi a la hipertròfia ventricular en resposta a angiotensina per mecanismes dependents a l'activació de NFAT<sup>138</sup>.

D'altra banda, la JPH2 és una proteïna intermembrana que manté el plasmalemma i el reticle sarcoplasmàtic a una distància fixada per assegurar un correcte acoblament de l'excitació i la contracció. La JPH2 és essencial per la maduració dels túbuls transversos (TT)<sup>259</sup>. Diferents estudis han demostrat que la IC provoca una pèrdua de la xarxa de TT, provocant una mala contracció cardíaca<sup>260</sup>, i s'ha observat una disminució dels nivells de JPH2 tant en pacients com en animals amb IC<sup>261</sup>.

La proteòlisi dependent de  $\text{Ca}^{2+}$  de la JPH2 per les calpaïnes s'ha proposat com un dels principals mecanismes responsables de la disminució de la JPH2 en el context de IC i aquesta proteòlisi ha sigut descrita en diferents condicions patològiques<sup>243,262</sup>. A més, en cors de ratolins sotmesos a isquèmia-reperfusió s'ha observat una reducció en els nivells de JPH2, mentre que la calpastatina pot evitar aquesta pèrdua<sup>243</sup>. Per altra banda, s'ha descrit que la sobreexpressió (transgènica o a través de la transfecció d'adenovirus) de JPH2 atenua la progressió de la IC en un model de TAC<sup>263,264</sup>.

### 1.4.5) La inhibició farmacològica de les calpaïnes en el tractament del remodelat

Malgrat que les estratègies actuals per tractar la IC han millorat la qualitat de vida i la supervivència dels pacients, la mortalitat continua sent alta, i per tant, és necessari i urgent trobar noves dianes farmacològiques.

Diferents estudis en els que s'han fet servir models transgènics suggereixen que les calpaïnes poden ser una prometedora diana terapèutica. Malauradament, no s'ha explorat en estudis preclínic l'ús d'inhibidors farmacològics de calpaïnes com a estratègia terapèutica per el tractament de la IC. Això és degut principalment a les limitacions de la majoria dels actuals inhibidors de calpaïna disponibles, que no posseeixen unes propietats farmacològiques apropiades pel seu ús en pacients. Afortunadament, l'associació d'altres afeccions patològiques no cardíques, incloses miopaties, trastorns neurodegeneratius, malalties oftalmològiques o càncer amb alteracions del sistema calpaïna/calpastatina han fet que aquestes hagin esdevingut font de gran interès per part de la indústria, i s'hagi promogut el desenvolupament de nous inhibidors durant els últims anys.

Històricament, la majoria dels inhibidors desenvolupats s'han basat en l'especificitat al substrat, dissenyant pèptids amb un grup reactiu electrofílic (un aldehyd,  $\alpha$ -cetoàcid,  $\alpha$ -cetoamides i  $\alpha$ -cetoèsters) que interacciona amb el lloc actiu com a substrat, i reacciona amb el residu de cisteïna del lloc actiu de forma reversible o irreversible.

La leupeptina i el E-64, inhibidors aïllats de microorganismes, constitueixen la primera generació d'inhibidors de les calpaïnes. Aquests pèptids tenen un grup aldehyd que interacciona de forma covalent amb el centre catalític de les calpaïnes. La leupeptina va ser el primer inhibidor utilitzat en el context del dany agut per IR, millorant la recuperació funcional en cors aïllats de conills porquins sotmesos a isquèmia-reperfusió<sup>265</sup>. Aquests inhibidors, tot i haver sigut àmpliament usats durant molt de temps tant en estudis *in vitro* com *in vivo*<sup>266-269</sup>, tenen diversos desavantatges com són una baixa especificitat per les calpaïnes i una baixa permeabilitat a la membrana<sup>270</sup>. Les propietats fisicoquímiques de la leupeptina es van millorar substituint els aminoàcids terminals per un grup reactiu hidrofòbic, donant lloc a nous inhibidors anomenats calpeptina, ALLN (o inhibidor de les calpaïnes I) i MDL-28170 (o inhibidor de les calpaïnes III)<sup>271</sup>. Aquests derivats sintètics de la leupeptina han demostrat una eficàcia major en la protecció del dany per reperfusió en cors aïllats i models *in vivo* d'oclusió coronària transitòria<sup>223,272,273</sup>. Malauradament, l'alta reactivitat química dels aldehyds i la baixa solubilitat aquosa limiten l'estabilitat i biodisponibilitat d'aquests inhibidors, fent que no es pugin emprar en pacients. Amb l'objectiu de trobar inhibidors més selectius i amb una millor solubilitat,

permeabilitat cel·lular i estabilitat metabòlica, es va utilitzar l'estructura del MDL-28170 per desenvolupar inhibidors peptidomimètics<sup>274</sup>. Destaquen les cetoamides derivades de benzamida A-705239 i A-790253 desenvolupades per la companyia biofarmacèutica AbbVie, que han demostrat reduir la mida de l'infart i la disfunció mitocondrial en cors aïllats de conill<sup>275,276</sup> i en un model *in vivo* d'isquèmia-reperfusió en porc<sup>277</sup>. Amb la informació obtinguda de relació estructura-activitat, es va desenvolupar el Alicapistat (o ABT-957), un derivat millorat de A-705239, amb una alta selectivitat a les calpaïnes envers les catepsines<sup>278</sup>, s'ha testat recentment en un estudi clínic en fase 1 analitzant la seva seguretat i propietats farmacològiques per al tractament del Alzheimer<sup>279</sup>.

Una de les limitacions dels inhibidors de les calpaïnes és l'especificitat envers altres cisteïn proteases. Per tal de desenvolupar nous inhibidors amb una especificitat més elevada, s'han buscat altres aproximacions com inhibidors basats en la calpastatina o inhibidors al·lostèrics. La calpastatina constitueix l'inhibidor més específic i potent per les calpaïnes, però degut a la seva naturalesa proteica i a la seva grandària, presenta una permeabilitat cel·lular molt baixa i una alta inestabilitat *in vivo*. Per això, una prometedora estratègia es basa en dissenyar inhibidors a partir de la seqüència i estructura 3D de la calpastatina i conjugats amb diferents pèptids de penetració cel·lular.

Per altra banda, s'han desenvolupat compostos que es poden unir a altres llocs de l'enzim que no sigui el lloc catalític, causant una inhibició al·lostèrica i augmentant l'especificitat. Un d'aquests inhibidors, el PD150606, derivat del primer inhibidor al·lostèric identificat, s'uneix als llocs d'unió del Ca<sup>2+</sup> de les calpaïnes, i ha demostrat reduir la mida de l'infart en ratolins sotmesos a isquèmia-reperfusió *in vivo*<sup>280</sup>. Un derivat d'aquest, el PD151746, s'ha vist que és aproximadament 20 vegades més selectiu per la calpaïna 1 que per la 2. Donat que entre les dues isoformes poden haver diferències en l'especificitat pels seus substrats<sup>281</sup> i les funcions biològiques<sup>282</sup>, aquests compostos representen l'oportunitat de desenvolupar inhibidors de calpaïnes específics d'una isoforma.

A més de les diferents isoformes de les calpaïnes, també existeixen característiques diferencials entre les calpaïnes segons siguin citosòliques o mitocondrials. S'ha proposat que les calpaïnes mitocondrials, però no les citosòliques, s'uneixen a proteïnes xaperones<sup>283</sup>. Amb aquesta premissa, es va desenvolupar un pèptid que bloqueja el lloc d'unió entre la calpaïna 1 i la chaperona ERp57, inhibint així únicament de forma selectiva l'activitat de la calpaïna 1 mitocondrial<sup>284</sup>. Donat el paper central de la mitocòndria en la mort cel·lular durant el dany per isquèmia-reperfusió i que l'activitat de la calpaïna 1 mitocondrial es troba elevada en ratolins sotmesos a isquèmia-reperfusió<sup>285</sup>, els potencials efectes cardioprotectors d'aquests tipus d'inhibidors resulten molt prometedors.

#### 1.4.5.1) Nous inhibidors de la calpaïna: SNJ-1945 i NPO-2270

A la present tesi, per demostrar el potencial terapèutic de la inhibició de les calpaïnes en el context del remodelat ventricular i IC, s'han fet servir dos nous inhibidors, el SNJ-1945 i el NPO-2270, que presenten un perfil farmacològic superior als inhibidors actuals.

El  $\{(1S)-1[(((1S)-1\text{-benzil-3-ciclopropil-amino}2,3\text{-dioxopropil)amino)carbonil]-3\text{-methilbutil}\}$  carbàmic àcid 5- mehoxy-3-oxapentil èster o SNJ-1945 (491,59 kDa) és un inhibidor reversible



de les calpaïnes derivat de la cetoamida dissenyat pels laboratoris Senju (Senju Pharmaceutical Co., Ltd) que actua sobre el grup SH d'un residu de cisteïna del centre actiu de les calpaïnes. Aquest inhibidor es va dissenyar específicament per incrementar la seva solubilitat aquosa i la seva biodisponibilitat<sup>286</sup> i les seves propietats farmacocinètiques van ser evaluades en la retina després de la seva administració oral<sup>287</sup>.

Administrat de forma oral, el SNJ-1945 ha demostrat millorar malalties de retina<sup>288,289</sup> i induir neuroprotecció en models experimentals d'encefalomielitis autoimmune<sup>290,291</sup> i isquèmia cerebral en ratolí<sup>292</sup>. Administrat de forma intraperitoneal abans d'una oclusió coronària, ha millorat la disfunció ventricular induïda per IR<sup>293</sup>. Actualment, a més, un assaig clínic en fase II avalua l'eficàcia i seguretat de l'administració oral del SNJ-1945 en pacients amb oclusió de l'artèria central de la retina (jRTC2021190013).

Per altre banda, en el context d'aquesta tesi, es caracteritzen per primera vegada les propietats inhibidores d'una nova molècula propietat de Landsteiner Genmed SL, NPO-2270, un derivat de la benzamida (477,5 kDa, estructura sota patent) i es determina el seu potencial cardioprotector en models preclínic d'isquèmia-reperfusió i remodelat ventricular.





**2) HIPOTESI**

Les calpaïnes juguen un paper clau en el desenvolupament del remodelat ventricular i la progressió cap a insuficiència cardíaca i ho fan de manera independent a l'estímul patològic que el provoca.

La inhibició farmacològica de les calpaïnes de forma crònica i per via oral és possible i representa una potencial estratègia pel tractament del remodelat ventricular i prevenció de la insuficiència cardíaca.







### 3) OBJECTIUS

#### **Objectiu principal**

Avaluar l'eficàcia de la inhibició farmacològica de les calpaïnes com a nou tractament contra el remodelat ventricular i IC, i caracteritzar i definir els mecanismes de la contribució de les calpaïnes als processos de remodelat cardíac tant d'origen isquèmic com no isquèmic.

#### **Objectius secundaris**

1. Caracteritzar el remodelat ventricular induït per diferents estímuls patològics crònics: isquèmia transitòria, estimulació crònica amb isoproterenol o amb angiotensina II i constricció aòrtica.
2. Determinar la capacitat de dues noves molècules, SNJ-1945 i NPO-2270, d'inhibir les calpaïnes miocardiàques mitjançant la seva administració crònica per via oral i analitzar els seus efectes sobre el remodelat cardíac caracteritzat en els models anteriors.
3. Determinar els mecanismes pels quals les calpaïnes podrien contribuir als processos de remodelat ventricular, incloent:
  - La via de senyalització de NF- $\kappa$ B
  - La via de senyalització de TGF- $\beta$ 1 i smad2/3
  - La via de senyalització de GPCR i GRK2









#### **4.1) MODELS EXPERIMENTALS**

##### **4.1.1) Inhibidors de les calpaïnes**

Una de les característiques dels inhibidors de les calpaïnes és la seva baixa solubilitat. Per minimitzar aquest problema, els inhibidors de les calpaïnes SNJ-1945 i NPO-2270 es van preparar segons les recomanacions dels propietaris (Senju Pharmaceutical Co., Ltd i Landsteiner Genmed SL respectivament).

El SNJ-1945 es va dissoldre en carboximetilcel·lulosa 0,5% en sèrum fisiològic protegint-lo de la llum, ja que és una molècula fotosensible. Es va fer un vòrtex a la dissolució durant 1 minut i a continuació es va sonicar en un bany d'ultrasons durant 15 minuts. Finalment es va fer un vòrtex durant 3 minuts.

El NPO-2270 es va dissoldre en Tween80 5% + PEG400 15% en sèrum fisiològic. El sòlid es va dissoldre en primer lloc en Tween80 i es va sonicar durant 15 minuts. A continuació es va afegir el PEG400 i es va repetir la sonicació de la solució durant 15 minuts addicionals. Finalment es va afegir el volum de sèrum fisiològic poc a poc per tal d'evitar la precipitació del fàrmac.

##### **4.1.2) Animals**

Tots els protocols experimentals utilitzats van ser aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal del VHIR i tots els procediments s'han dut a terme a l'Estabulari del VHIR.

En els experiments d'aquesta tesi s'han utilitzat tant rates com ratolins. Les rates mascle Sprague-Dawley van ser obtingudes de Janvier amb una edat compresa entre 10-12 setmanes i 250-300 grams de pes. Per altre banda, els ratolins mascle *wild type* (WT) i GRK2 hemizigots (GRK2<sup>+/-</sup>), mantinguts en un fons genètic C57BL/6, van ser generats i cedits pel doctor Federico Mayor, (*Departamento de Biología Molecular y Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa"*; UAM-CSIC). Els ratolins GRK2 hemizigots han estat caracteritzats prèviament i expressen un 50% menys de proteïna que els seus respectius controls<sup>294</sup>. Finalment, els ratolins mascle C57BL/6 van ser obtinguts de Janvier. En tots els casos els ratolins tenien una edat compresa entre 10-16 setmanes i 25-30 grams de pes. Els animals es van mantenir a l'estabulari del VHIR controlant la temperatura (22±2 °C) i la humitat (55±10%), alimentant-se amb pinso estàndard i aigua de forma *ad libitum* i amb cicles de llum i fosc de 12 hores (inici del cicle de llum a les 8 AM).

##### **4.1.3) Infart de miocardi *ex vivo*. Perfusió de cor aïllat de rata en Langendorff**

La preparació de Langendorff és una tècnica experimental que permet reproduir les condicions d'isquèmia-reperfusió en un cor aïllat eliminant factors extrínsecs. És un model amb una alta reproductibilitat i baix cost idoni per una primera caracterització de les propietats cardioprotectors de noves molècules.

Els animals van ser anestesiats mitjançant sobredosi de pentobarbital sòdic (100 mg/kg, intraperitoneal) prèvia administració d'analgèsia (buprenorfina subcutània, 0,05 mg/Kg). El cor es va extreure després de realitzar una toracotomia i ràpidament es va connectar per canulació de la seva aorta a un sistema de Langendorff on es va perfondre de forma retrògrada a una pressió constant de 60 mmHg amb un tampó bicarbonat Krebs-Henseleit modificat (KHB, en mM: NaCl 140, NaHCO<sub>3</sub> 24, KCl 2.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4, MgSO<sub>4</sub> 1, CaCl<sub>2</sub> 1.8, glucosa 11). El tampó es va filtrar sota pressió a través d'un filtre de cel·lulosa de 0,45 µm per tal de retirar qualsevol partícula que pogués obstruir el flux, es va temperar a 37 °C i gasejar de forma continuada amb carbogen.

Durant la perfusió es va monitorar contínuament la pressió del ventricle esquerre (LVP) mitjançant l'ús d'un globus de làtex ple d'aigua col·locat en el ventricle esquerre. Ajustant l'ompliment del globus, la pressió diastòlica (LVEDP) es va fixar entre 6 i 8 mmHg. A través d'un transductor de pressió 43600F (Baxter) es van transferir els valors de freqüència cardíaca, pressió del globus i la pressió de perfusió a un registre informàtic (Chart 5.2 de ADInstruments) a través d'un amplificador i digitalitzador de senyal Powerlab (ADInstruments).

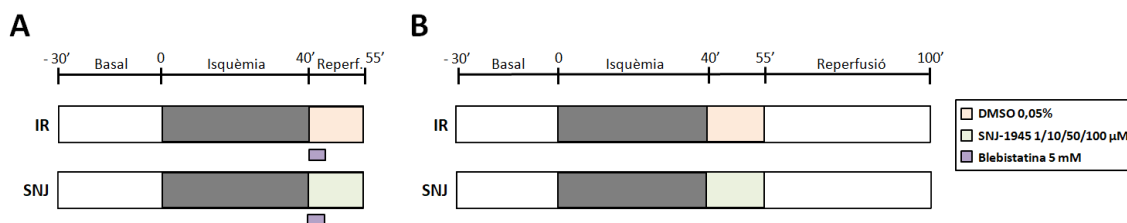
El protocol d'isquèmia-reperfusió va consistir en un episodi d'isquèmia global transitori provocat per la interrupció completa de la perfusió amb el tampó de Krebs. Durant aquest període d'isquèmia, els cors es van submergir en sèrum fisiològic per tal de mantenir la temperatura a 37 °C. La reperfusió es va portar a terme amb la reinstauració del flux de tampó Krebs.

#### **4.1.3.1) Efecte del SNJ-1945 en l'activació de la calpaïna i el dany per reperfusió**

Els cors es van perfondre en el sistema Langendorff, en condicions normòxiques durant 30 minuts i posteriorment van ser sotmesos a 40 minuts d'isquèmia. Passat aquest temps es va iniciar la reperfusió on es va afegir a la solució de Krebs l'inhibidor de les calpaïnes SNJ-1945 (Senju Pharmaceuticals) a diferents concentracions (1, 10, 50 o 100 µM) o el seu vehicle DMSO al 0,05% durant els 15 primers minuts de reperfusió.

Per tal d'avaluar l'activitat de la calpaïna, els cors (n=4 per grup) es van retirar als 15 minuts de la reperfusió i es va analitzar els productes de proteòlisi de la α-fodrina per western blot (Figura 8A). Amb l'objectiu de descartar la possibilitat que qualsevol variació en la degradació de la α-fodrina fos conseqüència de diferències en la mort cel·lular associades amb la disrupció del sarcolemma, es va afegir l'inhibidor contràctil selectiu blebistatina (5 mM) durant els primers minuts de la reperfusió. En estudis previs el nostre grup ha demostrat que la inhibició de la contractilitat evita el desenvolupament de la hipercontractura i mort dels cardiomiòcits durant la reperfusió<sup>295</sup>.

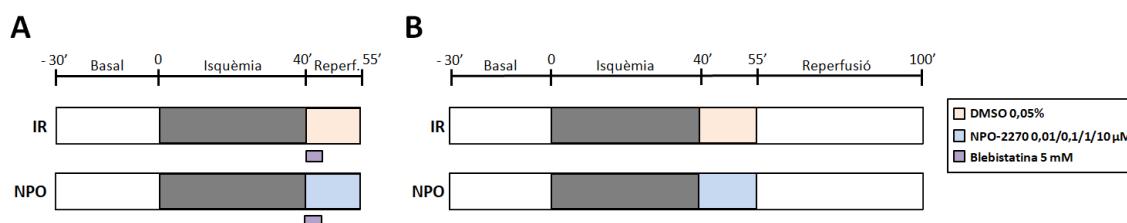
Per avaluar l'efecte cardioprotector del SNJ-1945 es va repetir l'experiment anterior, però els cors (n=6 per grup) es van deixar reperfondre durant 60 minuts (Figura 8B). Durant aquest temps es van recollir mostres de l'efluent coronari i es va analitzar l'activitat de l'enzim lactat deshidrogenasa (LDH) amb un mètode espectrofotomètric.



**Figura 8.** Protocol de perfusió en l'estudi de l'efecte del SNJ-1945 en l'activació de la calpaïna i el dany per reperfusió en cors aïllats sotmesos a isquèmia transitòria. A) Grups experimentals destinats a la determinació de l'activitat de la calpaïna per western blot. B) Grups experimentals destinats a l'avaluació l'efecte cardioprotector per espectrofotometria. Els quadres grisos corresponen al període d'isquèmia.

#### 4.1.3.2) Efecte del NPO-2270 en l'activació de la calpaïna i el dany per reperfusió

Per avaluar l'efecte del NPO-2270 es va realitzar el mateix protocol que en els cors perfosos amb el SNJ-1945. El NPO-2270 es va perfondre durant els primers 15 minuts de la reperfusió a diferents concentracions (0,01, 0,1, 1 o 10  $\mu\text{M}$ ). Els cors es van retirar després de 15 minuts de reperfusió i es va analitzar l'activitat de la calpaïna per western blot ( $n=4$  per grup; Figura 9A) o bé després de 60 minuts de reperfusió i es va analitzar l'efecte cardioprotector del NPO-2270 a través de l'activitat LDH i la mida de l'infart ( $n=6$  per grup; Figura 9B).



**Figura 9.** Protocol de perfusió en l'estudi de l'efecte del NPO-2270 en l'activació de la calpaïna i el dany per reperfusió en cors aïllats sotmesos a isquèmia transitòria. A) Grups experimentals destinats a la determinació de l'activitat de la calpaïna per western blot. B) Grups experimentals destinats a l'avaluació l'efecte cardioprotector per espectrofotometria i a l'avaluació de la mida de l'infart. Els quadres grisos corresponen al període d'isquèmia. Els quadres blaus corresponen al període d'isquèmia.

#### 4.1.4) Infart de miocardi *in vivo*. Isquèmia-reperfusió en rata i ratolí

Una vegada s'han obtingut resultats positius en el model de Langendorff, el potencial cardioprotector de les molècules en estudi és analitzat en un model fisiològicament més rellevant com és el model d'isquèmia transitori per oclusió de la coronària descendent anterior esquerra *in vivo*, i on la mida de l'infart és la variable d'estudi principal. Per aquest model es van utilitzar tant rates com ratolins.

Les rates Sprague-Dawley mascles d'entre 250 i 300 grams, es van premedicar amb una injecció intraperitoneal d'atropina (0,05 mg/kg) i es van anestesiar amb una injecció intraperitoneal de ketamina (75 mg/kg) i xilacina (10 mg/kg). El pla anestèsic es va mantenir durant tot el procediment amb l'administració d'isofluorà al 1%. Un cop l'animal mostrava signes d'inconsciència (pèrdua del reflex podal o de retirada i pèrdua del reflex corneal) es va

procedir a la intubació orotraqueal amb transiluminació de la tràquea utilitzant un catèter intravenós 16G. La ventilació espontània es va mantenir fins iniciar la monitorització de paràmetres vitals (electrocardiograma (ECG) i freqüència cardíaca) de l'animal mitjançant elèctrodes subcutanis connectats a un bioamplificador PowerLab 8SP (ADInstruments). A continuació l'animal es va connectar a un ventilador mecànic Inspira ASV (Harvard Apparatus) a 75 respiracions per minut. Es va utilitzar un volum de corrent de 8-10 ml/kg, O<sub>2</sub> inspirat del 100% i pressió positiva en el final de l'expiració de 3 mbar.

Trenta minuts abans de procedir a la cirurgia es va administrar de forma subcutània l'analgèsic buprenorfina (Schering-Plough) a una concentració de 0,01 mg/kg. Durant tota la cirurgia, també es va controlar i mantenir a 37 °C la temperatura amb un llum infraroig i una sonda rectal connectada a un termòmetre digital i una manta tèrmica. Els paràmetres vitals i la verificació del pla anestèsic van ser periòdicament avaluats durant la cirurgia. A més es va administrar fluidoteràpia de forma subcutània amb sèrum fisiològic al 0,9% per tal d'evitar la deshidratació i hipovolèmia de l'animal.

L'obertura del tòrax es va fer a través del hemitòrax esquerra a l'atura del quart espai intercostal (minitoracotomia esquerra per dissecció roma del teixit). Prèviament es va administrar heparina IP (200 UI/kg, intraperitoneal) per minimitzar la trombogènesis durant la reperfusió. La isquèmia transitòria es va fer per oclusió de l'artèria coronària descendent anterior esquerra (DA) a 1 mm de l'apèndix de l'aurícula esquerra amb un fil de sutura 6/0 Silkam (Braun) amb agulla atraumàtica. Per realitzar l'oclusió, el fil es passa per sota de la coronària, es realitza un nus i es col·loca un tub entre aquest i el miocardi, que l'estrènyer el nus pressionarà la coronària fins ocloure-la. Els indicadors d'una correcta oclusió de la DA són que es produeixi una elevació del fragment ST del ECG així com que la zona en isquèmia del cor adquireixi un color pàl·lid.

En els estudis on es van fer servir ratolins, aquests van ser sotmesos al mateix procediment descrit per les rates però amb algunes diferències detallades a continuació. Ratolins C57BL/6 mascle d'entre 25-30 grams es van anestesiar amb una dosi de pentobarbital (40mg/kg) + ketamina (50 mg/kg). Per mantenir el pla anestèsic, en cas de ser necessari, es va administrar una terç de la dosi inicial com a dosi de reforç. La intubació orotraqueal es va realitzar amb un catèter intravenós 20G. Un cop monitoritzat, l'animal es va connectar a un ventilador mecànic per animals petits SAR-830 (CWE) a 133 respiracions per minut. Es va utilitzar un volum de corrent de 6 ml/kg, O<sub>2</sub> inspirat del 100% i pressió positiva en el final de l'expiració de 3 mbar. El procediment d'obertura i oclusió de la DA va ser el mateix que el seguit en les rates.

Després de 30 (en rates) o 45 (en ratolins) minuts d'oclusió es va iniciar la reperfusió, traient el tub per alliberar la pressió sobre la coronària i restaurar el flux, però mantenint el fil per poder reocloure posteriorment i determinar l'àrea en risc. Durant la reperfusió es va tancar el tòrax, aplicant una compressió a la caixa toràcica per eliminar l'aire i reduir les possibilitats d'un pneumotòrax, i es va procedir al tancament per capes mitjançant la sutura intercostal dels músculs i pla superficial (pell).

Es va administrar un tractament antibiòtic profilàctic amb una única dosi de ceftriaxona (80mg/kg, subcutània) després d'extubar als animals. La recuperació d'aquests va ser acompanyada durant les tres primeres hores, fins que recuperaven els reflexes normals, es va

controlar la temperatura amb una manta elèctrica i es va subministrar O<sub>2</sub> amb una mascareta. Es va aplicar analgèsia amb una dosi de buprenorfina (0,01 mg/kg, subcutània) cada 12 hores fins les 24 hores.

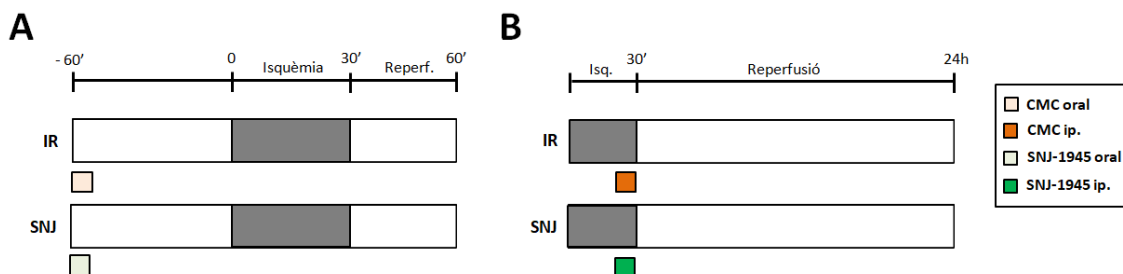
Passat el període de reperfusió, els animals van ser eutanasiats mitjançant pentobarbital sòdic (100 mg/Kg, intraperitoneal) prèvia administració d'analgèsia amb buprenorfina (0,01 mg/kg, subcutània).

#### 4.1.4.1) Efecte de l'administració oral de SNJ-1945 en l'activació de la calpaïna

Els animals van ser dividits en dos grups segons el tractament rebut de forma oral per sonda (gavatge) 60 minuts abans de sotmetre'ls al protocol d'isquèmia-reperfusió: inhibidor de les calpaïnes SNJ-1945 (grup SNJ, n=9) o el seu vehicle, carboximetilcel·lulosa (CMC) 0,5% en sèrum fisiològic (grup IR, n=6). A la vegada el grup tractat amb SNJ-1945 va ser subdividit en 3 grups (n=3 per grup) segons la dosi rebuda (30, 60 o 120 mg/kg). Tots els grups es van sotmetre a 30 minuts d'isquèmia i 30 minuts de reperfusió (Figura 10A). Passat aquest temps, els animals es van eutanasiar i es va analitzar els productes de proteòlisi de la  $\alpha$ -fodrina per western blot.

#### 4.1.4.2) Efecte de l'administració intraperitoneal de SNJ-1945 en l'activació de la calpaïna i la mida de l'infart

Els animals van ser dividits en dos grups segons el tractament rebut de forma intraperitoneal 5 minuts abans d'iniciar la reperfusió: una dosi de carboximetilcel·lulosa 0,5% en sèrum fisiològic (grup IR, n=14) o una dosi amb l'inhibidor de les calpaïnes SNJ-1945 a 120 mg/kg (grup SNJ, n=14). Passades les 24 hores de reperfusió, els animals es van eutanasiar (Figura 10B). Una vegada es va extreure el cor, es va analitzar l'activitat de la calpaïna o bé la mida de l'infart. En el segon cas, els cors es van muntar en l'aparell de Langendorff, on va ser perfundits amb tampó de Krebs per tal d'extreure la sang dels ventricles. La DA va ser reocludida i es va procedir a fer les tincions per determinar l'àrea en risc i l'àrea de necrosi tal i com es detalla més endavant.

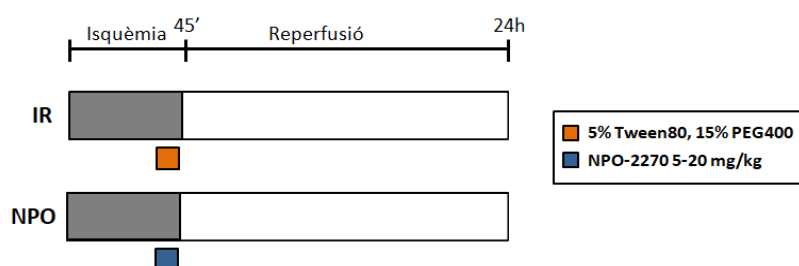


**Figura 10.** Protocols experimentals en l'estudi de l'efecte del SNJ-1945 en un model *in vivo* d'isquèmia-reperfusió. A) Grups experimentals on es va administrar l'inhibidor de forma oral 1 hora abans de la isquèmia destinats a la determinació de l'activitat de la calpaïna per western blot. B) Grups experimentals on es va administrar l'inhibidor de forma intraperitoneal 5 minuts abans de la reperfusió destinats a la determinació de l'activitat de la calpaïna per western blot o a la mida de l'infart. Els quadres grisos corresponen al període d'isquèmia.



#### 4.1.4.3) Efecte de l'administració intraperitoneal de NPO-2270 en l'activació de la calpaïna i la mida de l'infart

Els animals van ser dividits en dos grups segons el tractament rebut de forma intraperitoneal 5 minuts abans d'iniciar la reperfusió: una dosi del vehicle (5% Tween80, 15% PEG400 en sèrum fisiològic; grup IR, n=12) o una dosi amb l'inhibidor de les calpaïnes NPO-2270 (grup NPO, n=24). A la vegada el grup tractat amb NPO-2270 va ser subdividit en 2 grups (n=12 per grup) segons la dosi rebuda (5 o 20 mg/kg) (Figura 11). Passades les 24 hores de reperfusió, els animals es van eutanasiar. Una vegada es va extreure el cor, es va analitzar l'activitat de la calpaïna (n=6) o bé la mida de l'infart (n=6). En el segon cas, els cors es van muntar en l'aparell de Langendorff, on va ser perfundits amb tampó de Krebs, es va reocluir la DA i es va procedir a fer les tincions per determinar l'àrea en risc i l'àrea de necrosi tal i com es detalla més endavant.



**Figura 11.** Protocols experimental en l'estudi de l'efecte del NPO-2270 en un model *in vivo* d'isquèmia-reperfusió. Els animals es van sotmetre a 45 minuts d'isquèmia i l'inhibidor es va administrar de forma intraperitoneal 10 minuts abans de la reperfusió. Els quadres grisos corresponen al període d'isquèmia.

#### 4.1.5) Remodelat ventricular advers postinfart en rata i ratolí

Per analitzar la contribució de les calpaïnes al remodelat ventricular postinfart, rates mascles Sprague-Dawley de 250-300 grams o ratolins mascle C57BL/6 de 25-30 grams van ser sotmesos a l'oclusió de l'artèria coronària descendent anterior tal i com s'ha descrit anteriorment en l'apartat 4.1.4, però en aquest cas, el període de reperfusió es va estendre durant 21 o 28 dies respectivament.

El tractament d'analgèsia aplicat amb buprenorfina (0.01 mg/kg, subcutània) cada 12 hores es va allargar fins a les primeres 48 hores de reperfusió i l'estat de l'animal es va supervisar diàriament per comprovar l'evolució del seu estat després de la cirurgia. Els animals es van estabular de forma individual per facilitar la seva recuperació en gàbies amb material de nidificació i d'amagatall.

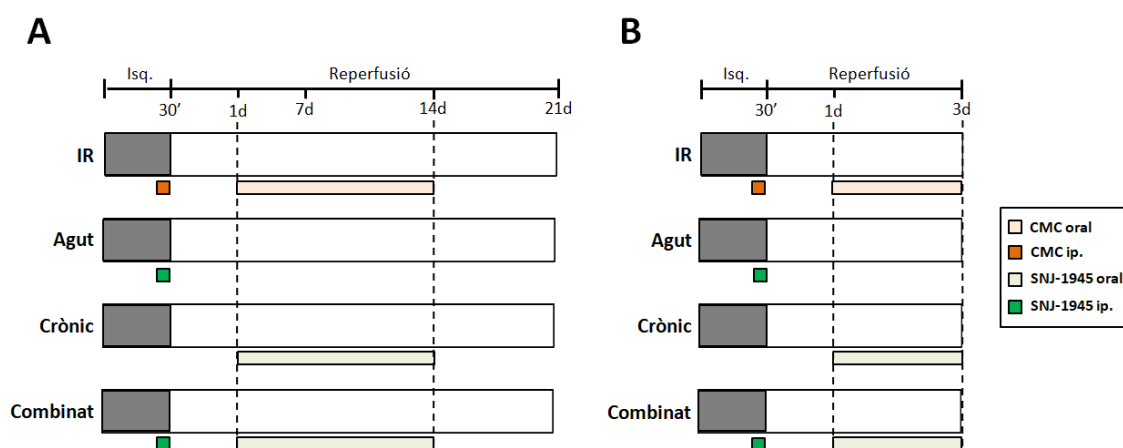
Passat el període de reperfusió, els animals van ser eutanasiats mitjançant pentobarbital sòdic (100 mg/Kg, intraperitoneal) prèvia administració d'analgèsia amb buprenorfina (0.01 mg/kg, subcutània).

#### 4.1.5.1) Efecte de l'administració de SNJ-1945 en l'activació de la calpaïna durant la fase aguda i crònica de la reperfusió

Quaranta-vuit rates Sprague-Dawley reperfoses durant 21 dies van ser dividides en 4 grups (n=12 per grup) segons el tractament rebut. Un grup d'animals va rebre el vehicle del fàrmac, carboximetilcel·lulosa al 0,5% (grup IR). Per determinar si l'efecte de la inhibició de les calpaines sobre el remodelat postinfart és conseqüència de la reducció en l'extensió de l'infart o sobre mecanismes responsables del propi procés de remodelat, un grup d'animals va rebre SNJ-1945 (120mg/kg) administrat de forma intraperitoneal 5 minuts abans de començar la reperfusió (grup agut) i un altre grup va ser tractat amb SNJ-1945 de forma oral durant 14 dies, amb inici a les 24 hores de reperfusió (grup crònic). Finalment, en l'últim grup, es va combinar l'administració aguda i crònica del fàrmac (grup combinat) (Figura 12A).

#### 4.1.5.2) Efecte de l'administració de SNJ-1945 en la inflamació durant la fase aguda de la reperfusió

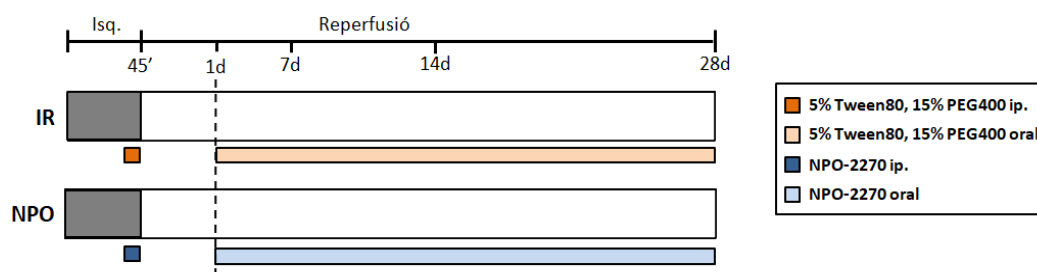
Per tal de poder avaluar l'efecte del SNJ-1945 sobre la inflamació associada al procés de remodelat ventricular postinfart, es va realitzar el mateix protocol experimental que al punt 4.1.5.1 (n=6 per grup), però el període de reperfusió es va escurçar a només 3 dies (Figura 12B), donat que en estudis anteriors es va determinar que aquest és un punt temporal idoni per analitzar infiltració de cèl·lules inflamatòries.



**Figura 12.** Protocols experimentals en l'estudi de l'efecte del SNJ-1945 en un model *in vivo* de remodelat ventricular advers postinfart. Les rates es van sotmetre a 30 minuts d'isquèmia i 3 o 21 dies de reperfusió. A) Grups experimentals destinats a la determinació de la mida de la cicatriu, i avaluació de l'activitat de la calpaïna, la hipertròfia i la fibrosi. B) Grups experimentals destinats a la determinació de la inflamació.

#### 4.1.5.3) Efecte de l'administració de NPO-2270 en l'activació de la calpaïna durant la fase aguda i crònica de la reperfusió

Vint ratolins C57BL/6 reperfoses durant 28 dies van ser dividits en 2 grups (n=10 per grup) segons el tractament rebut. El grup IR va rebre el vehicle del fàrmac (5% Tween80, 15% PEG400 en sèrum fisiològic) i el grup NPO va rebre NPO-2270 (20mg/kg) administrat de forma intraperitoneal 5 minuts abans de començar la reperfusió i de forma oral durant 28 dies a partir de les 24 hores de reperfusió (Figura 13).



**Figura 13.** Protocol experimental en l'estudi de l'efecte del NPO-2270 en un model *in vivo* de remodelat ventricular advers postinfart. Els ratolins es van sotmetre a 45 minuts d'isquèmia i 28 dies de reperfusió.

#### 4.1.6) Model d'estimulació neurohormonal amb isoproterenol

L'estimulació adrenèrgica s'ha associat causalment amb el desenvolupament de la IC. El remodelat ventricular induït per isoproterenol és un model tècnicament senzill, àmpliament utilitzat i altament reproducible i amb una baixa mortalitat a dosis baixes. Resulta doncs un model adequat per estudiar si les calpaïnes també participen en el remodelat ventricular induït per un estrès crònic de causa no isquèmica.

L'activació crònica  $\beta$ -adrenèrgica en rates mascle Sprague-Dawley d'entre 250 i 300 grams es va aconseguir amb l'administració d'isoproterenol de forma intraperitoneal a una dosi de 5 mg/kg durant 7 dies consecutius. Aquest temps és suficient per induir remodelat ventricular caracteritzat per una marcada hipertròfia i fibrosi intersticial<sup>296</sup>. Després de 7 dies de tractament, les rates es van eutanasiar mitjançant pentobarbital sòdic (100 mg/Kg, intraperitoneal) prèvia administració d'analgèsia amb buprenorfina (0.01 mg/kg, subcutània). Es van obtenir els cors i es van muntar en l'aparell de Langendorff, on va ser perfundits amb tampó de Krebs temperat a 37 °C i es van guardar a -80 °C o es van fixar en paraformaldehid.

El mateix procediment també es va realitzar amb ratolins mascle (10-12 setmanes d'edat) *wild type* (WT) i GRK2 hemizigots (GRK2<sup>+/-</sup>).

##### 4.1.6.1) Efecte de l'administració de SNJ-1945 en l'activació de la calpaïna en el remodelat induït per isoproterenol

Vint-i-sis rates Sprague-Dawley van ser dividides en 3 grups segons el tractament rebut (Figura 14A). El grup control (n=6) va rebre una injecció intraperitoneal de salí i una dosi oral del vehicle del fàrmac, carboximetilcel·lulosa 0.5% en sèrum fisiològic. El grup amb remodelat ventricular induït per administració crònica d'isoproterenol (grup ISO, n=10) va rebre isoproterenol (5mg/kg en sèrum fisiològic, Sigma-Aldrich) de forma intraperitoneal diàriament durant 7 dies. En el grup tractat amb SNJ-1945 (grup ISO+SNJ, n=10), el SNJ-1945 (120mg/kg) va ser coadministrat amb l'isoproterenol de forma oral. Els mateixos grups es van replicar en ratolins *wild type* (n=15) o GRK2<sup>+/-</sup> (n=17).

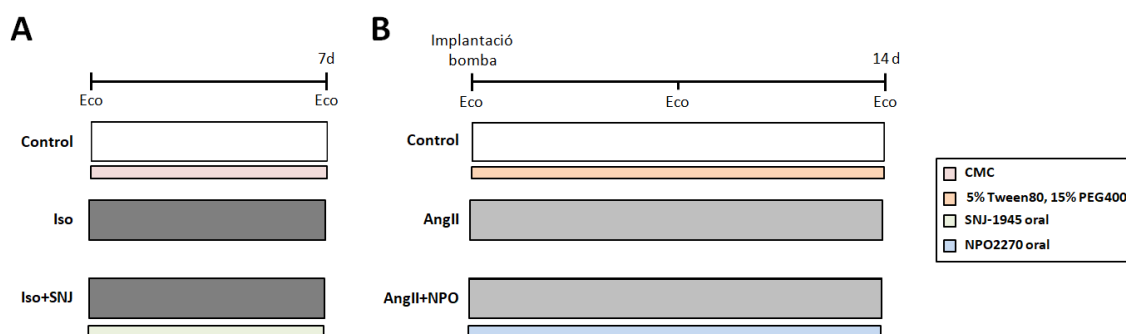
#### 4.1.7) Model d'estimulació neurohormonal amb angiotensina II

Un cop obtinguts els resultats en el model amb isoproterenol, el potencial inhibitori de les calpaïnes és va analitzar en un model d'estimulació neurohormonal per administració crònica d'angiotensina II. Aquest model tracta de reproduir la hipertensió crònica deguda a l'activació del sistema RAS que s'observa en pacients amb IC.

Ratolins mascle C57BL/6 d'entre 25-30 grams es van anestesià amb isofluorà al 5% a una càmera d'inducció, i posteriorment es va mantenir l'anestèsia durant tot el procediment al 1,5%. Un cop anestesiats, es va rasurar la pell de la zona del llom i es va desinfectar amb 70% alcohol. Es va realitzar un petit tall a l'altura del bescoll i es va separar la pell del múscul. Un cop fet l'espai suficient, es va introduir de forma subcutània una bomba osmòtica Alzet (Durect Corporation) pre carregada per obtenir un alliberament continu i controlat d'angiotensina II a una dosi de 1µg/kg/min durant 14 dies consecutius. Finalment, es va procedir al tancament de la pell amb un fil de sutura 6/0 i es va administrar una dosi de l'antibiòtic ceftriaxona (80mg/kg, subcutània).

##### 4.1.7.1) Efecte de l'administració de l'inhibidor de les calpaïnes NPO-2270 en el remodelat induït per angiotensina II

Trenta-sis ratolins C57BL/6 es van dividir en tres grups segons el tractament rebut durant 14 dies consecutius (Figura 14B). El grup control (n=6) va rebre una dosi diària oral del vehicle del inhibidor de les calpaïnes (5% Tween80, 15% PEG400 en sèrum fisiològic), i la infusió de les bombes osmòtiques va ser de salí. El grup AngII (n=6) va rebre la infusió d'angiotensina II i el grup AngII+NPO, a més, la coadministració durant el mateix període de temps de forma oral l'inhibidor de les calpaïnes NPO-2270 a diferents concentracions (1, 3, 10 o 30 mg/kg, n=6 per grup).



**Figura 14.** Protocols experimentals en l'estudi de l'efecte dels inhibidors de les calpaïnes en un model *in vivo* de remodelat ventricular per estimulació neurohormonal. A) Grups experimentals del model de remodelat induït per isoproterenol. Els quadres gris fosc corresponen a l'administració intraperitoneal diària del isoproterenol. B) Grups experimentals del model de remodelat induït per angiotensina II. Els quadres gris clar corresponen a la infusió d'angiotensina II de les bombes osmòtiques subcutànies.

#### **4.1.8) Model de sobrecàrrega de pressió induït per constricció aòrtica transversal (TAC)**

El model de constricció aòrtica transversal és un model que incrementa la postcàrrega del ventricle esquerre (la pressió envers la qual s'ha d'enfrontar el ventricle per expulsar la sang cap als vasos), característica que en la clínica es produeix principalment a causa de l'estenosi aòrtica o de la hipertensió sistèmica.

Els ratolins C57BL/6 de 12 setmanes es van anestesiari amb una injecció intraperitoneal de ketamina (65mg/kg) i xilacina (10 mg/kg). Un cop l'animal mostrava signes d'inconsciència (pèrdua del reflex podal o de retirada i pèrdua del reflex corneal) es va procedir a la intubació orotraqueal amb transiluminació de la tràquea utilitzant un catèter intravenós 20G. La ventilació espontània es va mantenir fins a la monitorització de l'animal mitjançant la connexió d'elèctrodes subcutanis connectats a un bioamplificador PowerLab 8SP (ADInstruments) per la monitorització de paràmetres vitals (electrocardiograma (ECG) i freqüència cardíaca). A continuació l'animal es va connectar a un ventilador mecànic per a animals petits (SAR-830, CWE). Es va utilitzar un volum de corrent de 6 ml/kg, O<sub>2</sub> inspirat a el 100%, pressió positiva al final de l'expiració (PEEP) de 3 mbar i freqüència respiratòria de 133 BPM.

Trenta minuts abans de procedir a la cirurgia es va administrar de forma subcutània l'analgèsic buprenorfina a una concentració de 0,035 mg/kg (Schering-Plough). Durant tota la cirurgia, també es va controlar i mantenir a 37 °C la temperatura amb un llum infraroig i una sonda rectal connectada a un termòmetre digital i una manta tèrmica. Els paràmetres vitals com el ECG, la freqüència cardíaca i la verificació del pla anestèsic van ser periòdicament avaluats durant la cirurgia. A més es va administrar fluïdoteràpia de forma subcutània amb sèrum fisiològic al 0,9% per tal d'evitar la deshidratació i hipovolèmia de l'animal.

Es va realitzar un petit tall a la zona del coll, i es va separar la pell, múscul i teixit connectiu. A continuació es va realitzar una esternotomia mitja fins a l'alçada de la segona costella amb unes tisores amb una punta en bola per no danyar els pulmons i un retractor de costelles, separant el timus i deixant exposat l'arc aòrtic. Un cop aïllat l'arc aòrtic, es va passar un fil 6/0 envoltant l'aorta entre tronc braquiocefàlic i la base de la caròtida comuna esquerra. A continuació es va lligar un nus, deixant entre el fil i l'artèria un ganxo fet a partir d'una agulla 27G, que posteriorment va ser retirat, creant una constricció parcial de l'aorta.

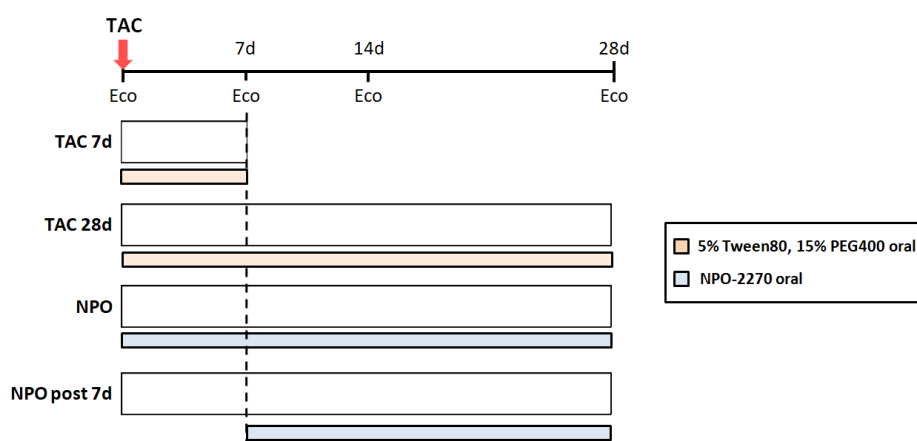
Un cop creada la constricció es va procedir a tancar el tòrax per capes. Amb fil 6/0, es va suturar primer les costelles, aplicant una lleugera compressió per assegurar l'expulsió de tot l'aire i líquid de la caixa toràcica i disminuir la possibilitat de pneumotòrax i a continuació les capes de múscul i pell.

Es va administrar un tractament antibiòtic profilàctic amb una única dosi de ceftriaxona (80mg/kg, subcutània) després d'extubar a l'animal. La recuperació d'aquest va ser acompanyada durant les tres primeres hores, fins que recuperaven els reflexes normals, es va controlar la temperatura amb una manta elèctrica i es va subministrar O<sub>2</sub> amb una mascareta. Es va aplicar analgèsia amb una dosi de buprenorfina (0.01 mg/kg, subcutània) cada 12 hores fins les 48 hores.

Passat el període determinat des de la constricció de l'aorta, els animals van ser eutanasiats mitjançant pentobarbital sòdic (100 mg/kg, intraperitoneal) prèvia administració d'analgèsia amb buprenorfina (0.01 mg/kg, subcutània).

#### 4.1.8.1) Efecte de l'administració de NPO-2270 en el remodelat induït per constricció aòrtica transversal (TAC)

Trenta-vuit C57BL/6 es van dividir en quatre grups segons el tractament rebut i la duració del procediment (Figura 15). El grup TAC 7d (n=8) va rebre una dosi diària oral del vehicle (5% Tween80, 15% PEG400 en sèrum fisiològic) durant 7 dies consecutius. En el grup TAC 28d (n=10) la duració del procediment es va allargar fins als 28 dies. La capacitat del NPO-2270 per prevenir o revertir el remodelat induït per TAC es va analitzar en un grup de ratolins que va rebre l'administració d'una dosi diària oral del NPO-2270 (10 mg/kg) des del primer dia de cirurgia (grup NPO; n=10) o 7 dies després d'haver realitzat la constricció de l'aorta (grup NPO 28d; n=10).



**Figura 15.** Protocols experimentals en l'estudi de l'efecte del NPO-2270 en un model *in vivo* de remodelat ventricular induït per sobrecàrrega de pressió. Els ratolins es van sotmetre a constricció aòrtica transversal (diàmetre 27G) i es va deixar induir el remodelat durant 4 setmanes.

#### 4.1.9) Cultiu de fibroblasts

Rates mascle Sprague-Dawley d'entre 250 i 300 grams es van eutanasiar mitjançant pentobarbital sòdic (100 mg/kg, intraperitoneal) prèvia administració d'analgèsia amb buprenorfina (0,01 mg/kg, subcutània). Es van obtenir els cors, netejar de sang en tampó fosfat salí (PBS) fred, i els ventricles es va separar i tallar en trossos petits (1-2 mm<sup>2</sup>) que es van incubar amb una solució enzimàtica (medi de cultiu *Dulbecco's modified Eagle's* (DMEM) + penicil·lina/estreptomicina 1X + 0,1% tripsina + 100 u/ml col·lagenasa I). Passats 15 minuts d'incubació a 37 °C, es va descartar el primer sobrenadant, ja que aquest consta principalment de cèl·lules endotelials. Es va incubar de nou amb la solució enzimàtica 15 minuts i es va obtenir el sobrenadant, que es va barrejar en proporció 1:1 amb medi complet. El procés es va repetir 4-5 vegades fins aconseguir la digestió completa dels trossos de ventricle. El sobrenadant total es va centrifugar a 1500 rpm durant 10 minuts, i el *pellet* es va resuspendre en medi complet i es va passar a una placa, on es va deixar incubar 1 hora a 37 °C per

permetre l'adhesió dels fibroblasts. Passat el temps d'incubació es van eliminar les cèl·lules no adherides amb un rentat de PBS 1%. Les cèl·lules es van mantenir en medi DMEM, complementat amb 10% sèrum fetal boví (FBS), 100u/ml de penicil·lina i 0,1 mg/ml d'estreptomicina. Pels experiments es van fer servir cèl·lules de passes inicials (2-4 màxim), amb una confluència del 90% i cultivades amb medi sense FBS 24h prèvies a l'inici dels tractaments.

#### **4.1.9.1) Efecte del SNJ-1945 en l'activació de fibroblast cardíacs aïllats per TGF-β1**

Els fibroblasts es van diferenciar a miofibroblasts incubant-los amb TGF-β1 (Abcam) 5 µg/ml durant 24 hores amb o sense la presència de l'inhibidor de les calpaïnes SNJ-1945 a 10 mM. L'efecte de l'inhibidor de les calpaïnes sobre la diferenciació dels fibroblasts es va avaluar amb la quantificació de α-SMA per western blot i la producció de col·lagen.

## **4.2) TÈCNiques D'ANÀLISI**

### **4.2.1) Ecocardiografia**

Les variacions en la funció i morfologia cardíques en els models experimentals de remodelat ventricular es van analitzar per ecocardiografia transtoràcica utilitzant un sistema d'ultrasons Vivid Q portàtil equipat amb una sonda i12L-RS de 13MHz (GE Healthcare).

Els temps d'adquisició de les imatges ecocardiogràfiques van ser diferents depenent del model experimental. En el model de remodelat postinfart, es va realitzar una ecocardiografia a temps basal (abans de la cirurgia) i als 7 i 21 dies després de la cirurgia. En el model de remodelat per administració d'isoproterenol, es va realitzar una ecocardiografia a temps basal (abans de la primera administració d'isoproterenol) i al final del tractament. En el model de remodelat per infusió d'angiotensina II, es va realitzar una ecocardiografia a temps basal (abans de la implantació de la bomba), i als 7 i 14 dies després de la implantació. En el model d'estenosi aòrtica, es va realitzar una ecocardiografia a temps basal (abans de la cirurgia), i als 7, 14 i 28 dies després de la cirurgia.

Utilitzant les imatges preses en mode M, es van realitzar les següents mesures: els diàmetres interns del ventricle esquerre al final de la sístole (LVESd) i de la diàstole (LVEDd), el gruix del septe intraventricular (IVS), el gruix de la paret posterior del ventricle esquerre (LVPW) i la freqüència cardíaca. La fracció d'ejecció (FE) es va calcular seguint la fórmula següent:  $((\text{Volum final diastòlic} - \text{Volum final sistòlic}) / \text{Volum final diastòlic}) * 100$ . Les mesures es van realitzar de forma cega, sense saber a quin grup experimental corresponia cada imatge. Les dades finals presentades per a cada paràmetre corresponen a la mitjana de 3 o 4 mesures de cicles cardíacs diferents.

### **4.2.2) Mesura de la lactat deshidrogenasa**

La lactat deshidrogenasa és un enzim de tipus oxidoreductasa que catalitza la reducció de piruvat a lactat a partir de l'oxidació del NADH a NAD<sup>+</sup>. Al tractar-se d'un enzim citoplasmàtic,

el seu increment en el torrent sanguini és un signe del seu alliberament cel·lular per ruptura de la membrana plasmàtica, correlacionant la quantificació de la seva activitat amb la severitat d'una lesió.

L'activitat de la LDH es va mesurar mitjançant espectrofotometria en mostres recollides de l'efluent dels cors perfosos en el sistema Langendorff durant el període de reperfusió (minuts 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50 i 60). Les mostres es van diluir 1/10 amb un tampó fosfat a 37 °C (en mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3H<sub>2</sub>O 6.14, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 38.6, pH=7,4) complementat amb els substrats NADH (310 µM) i piruvat (1 mM). El tampó es va afegir als pous carregats amb les mostres immediatament abans de realitzar la lectura, i es va llegir amb el lector de plaques Multiskan™ (Thermo Fisher) l'absorbància de la placa a 340 nm per tal de mesurar la desaparició del NADH. Els resultats es van expressar com unitats de LDH alliberat durant el període de reperfusió per gram de teixit sec.

#### 4.2.3) Mesura de l'àrea en risc i mida de l'infart

Per determinar l'extensió de l'infart en els animals sotmesos al procediment d'isquèmia-reperfusió, transcorregudes 24 hores de reperfusió es va anestesià l'animal, es va realitzar una toracotomia i es va refer el nus amb la seda per tal de tornar a reocluir la DA. A continuació, el cor es va extreure i es va canular per l'aorta en l'aparell de Langendorff i es va perfondre amb tampó de Krebs prèviament temperat a 37 °C per tal d'eliminar la sang de les cavitats. Tot seguit, el cor va ser perfós amb 0,5 mL d'una solució de Blau d'Evans al 5% en sèrum fisiològic que va teyir tot el miocardi, a excepció de l'àrea irrigada per la DA. L'àrea amb absència de tinció blava és considerada l'àrea en risc.

El cor es va treure de l'aparell del Langendorff i es va rentar amb sèrum fisiològic fred per tal de remoure l'excés de colorant. A continuació es van eliminar les aurícules i els vasos, i amb un motlle d'acer graduat (Zivic Labs) es van fer 6 talls transversals d'1mm de gruix. Els talls van ser incubats amb una solució de clorur de trifeniltetrazoli (TTC) a l'1% en PBS (Sigma-Aldrich) durant 10 minuts a 37°C en un bany amb agitació. El TTC es redueix en una reacció dependent de NADH donant lloc a trifenilformazán, compost de color vermell, permetent diferenciar teixits metabòlicament actius (amb presència de NADH) i inactius. El teixit viable (positiu per TTC) queda definit amb color vermell mentre que el teixit mort (negatiu per TTC) queda definit amb color blanc.

Un cop tenyits, els talls es van deixar durant 30 minuts en una solució de formalina al 10% per tal d'augmentar el contrast entre la zona necròtica i no necròtica<sup>297</sup>. Finalment, els talls es van col·locar entre dos portaobjectes i es van fotografiar, i posteriorment, es va obtenir el pes de cada tall. Les imatges digitalitzades es van mesurar de forma semi-automàtica amb el software Image Pro-Plus (Media Cybernetics). Es va obtenir l'àrea infartada (AI) i l'àrea en risc (AR) de cada tall i es va ponderar pel seu pes. La mida de l'infart es va expressar com el percentatge de l'àrea infartada respecte a l'àrea en risc, i es va calcular de la següent manera:  $AI/AR (\%) = \frac{\sum AI}{\sum AR} \times 100$ .



#### 4.2.4) Mesures histològiques i immunohistoquímica

Per la quantificació de les diferents variables histològiques i immunohistoquímiques associades al remodelat ventricular en els animals sotmesos al procediment d'isquèmia-reperfusió així com en el tractats amb isoproterenol o angiotensina II, el cor va ser extret al final del protocol experimental, i es va fixar en paraformaldehid al 4% durant 24 hores.

Un cop fixat, el cor es va tallar en seccions transversals des de la base a l'àpex i es van introduir en cassets histològics, es van rentar amb PBS i es van incloure en parafina. El procés d'inclusió consta de tres passos amb l'objectiu de substituir l'aigua del teixit per la parafina. Els talls primer es deshidraten submergint-los en concentracions d'alcohol creixent (H<sub>2</sub>O desionitzada - 15', alcohol 70% - 30', alcohol 96% - 45' i dues tandes d'alcohol 100% - 45'). A continuació els talls s'aclareixen utilitzant una solució que sigui miscible amb l'alcohol i la parafina, omplint l'espai que ocupava l'aigua del teixit (dues tandes de xilol - 30'). Finalment, al pas d'infiltració, les seccions s'inclouen en parafina (dues tandes de parafina - 1 i 3 hores respectivament). Posteriorment es formen uns blocs de parafina que contenen els talls del teixit processat, i que permetran obtenir talls histològics de 4 µm de gruix amb un micròtom de ma (4 talls per cada secció).

Un cop s'han obtingut els talls aquests es poden tenyir amb diferents tincions histològiques. Per fer-ho, cal desparafinar i hidratar els talls de nou (dues tandes de xilol - 5', dues tandes d'alcohol 100% - 5', dues tandes d'alcohol 96% - 5' i H<sub>2</sub>O d - 5'). A continuació es realitza la tinció desitjada, i posteriorment els talls es tornen a deshidratar (alcohol 70% - 1', alcohol 96% - 1', alcohol 100% - 1' i Xilol - 10') i es munten amb medi de muntatge DPX.

Per l'avaluació de l'àrea de la cicatriu, els talls de seccions transversals de miocardis infartats i reperfosos durant 21 dies van ser tenyits amb Picosirius Red (Sigma-Aldrich) durant 1 hora. Els talls van ser escanejats i analitzats utilitzant el software Image-Pro Plus (Media Cybernetics). L'àrea de la cicatriu es va expressar com el percentatge de l'àrea fibròtica respecte l'àrea del ventricle esquerre i mesurada en talls a l'alçada dels músculs papil·lars.

Per l'avaluació del col·lagen intersticial dipositat els talls també van ser tenyits amb Picosirius Red, però en seccions del miocardi remot (no infartat) o en seccions de cors remodelats per estimulació neurohormonal o sobrecàrrega de pressió. Es van prendre 6 micrografies de cada tall de forma aleatòria amb un microscopi invertit Leica DM-IRB a x200 augments i es van analitzar utilitzant el software Image-Pro Plus.

Per l'avaluació de l'àrea de la secció transversal dels cardiomiòcits els talls van ser tenyits amb una tinció d'hematoxilina i eosina (hematoxilina - 10', alcohol àcid 1% - 10'', H<sub>2</sub>O d - 5', viratge a color blau amb aigua amoniacal, H<sub>2</sub>O d - 10', i tres tandes d'eosina - 10''). Es van prendre micrografies aleatòries de cada cor amb un microscopi invertit Leica DM-IRB a x400 augments, i es van mesurar almenys 50 cèl·lules tallades de forma transversal per cada cor utilitzant el software Image-Pro Plus.

Finalment, es va analitzar la infiltració de cèl·lules inflamatòries en el miocardi infartat i no infartat per immunohistoquímica en cors reperfosos durant 3 dies. Es va bloquejar la peroxidasa endògena amb una solució d'aigua oxidada 3%-metanol 10% durant 10 minuts i

a continuació els talls es van incubar amb un tampó citrat 0,01M pH=6 a 85 °C durant 35' i a temperatura ambient durant 30' per tal de recuperar els antígens. Els talls es van incubar amb anticossos contra CD68 (Bio-rad, MCA341R) per monòcits/macròfags i CD3 (Abcam, ab16669) per cèl·lules T i amb un anticòs secundari biotinitat (ABC Peroxidasa Kit tinció estàndard, Thermo Scientific), i es van visualitzar utilitzant 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich). Es van prendre 6 micrografies de la zona infartada i 6 de la no infartada per cada cor de forma aleatòria amb un microscopi invertit Leica DM-IRB a x200 augments. Les imatges es van analitzar amb el software Image J.

#### 4.2.5) Fraccionament cel·lular. Obtenció de la fracció nuclear

Per tal de poder analitzar la translocació de proteïnes al nucli, es va procedir a aïllar la fracció nuclear amb un kit d'extracció nuclear (Active Motif). Mostres de cors de rata congelades i polvoritzades es van homogeneïtzar amb un politrón Heidolph DIAX 600 en tampó hipotònic complementat amb inhibidors de proteases. Per assegurar que totes les cèl·lules es trobessin disgregades es va deixar incubant durant 15 minuts. A continuació les mostres es van centrifugar a 850 g durant 4 minuts a 4°C i es va descartar el sobrenadant.

El *pellet* es va resuspendre en tampó hipotònic 2x, i es va deixar incubar en gel durant 20 minuts. Passat el temps d'incubació es va afegir a la mostra detergent i es va comprovar sota microscopi que les cèl·lules estiguessin completament lisades. Les mostres van ser centrifugades a 14.000 g i 4°C durant 30 segons i el sobrenadant obtingut, que correspon al citoplasma, es va guardar a -80 °C fins al seu ús. Finalment el *pellet* va ser resuspès de nou en un tampó de lisis, es va passar pel vòrtex i es va incubar 30 minuts en gel per després ser centrifugat a 14.000 i 4°C durant 10 minuts. El sobrenadant final obtingut correspon a la fracció nuclear.

#### 4.2.6) Western blot

Les mostres de miocardi es van homogeneïtzar amb tampó de homogeneïtzació (en mM: Tris-HCl 50, NaCl 150, EDTA 10, DTT 1, NaF 10, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2, Tritó X-100 1%, inhibidor de proteases 1%, pH 7,3). Les mostres es van centrifugar a 15.000g i 4 °C durant 15 minuts, i el sobrenadant obtingut (homogenat total) es va guardar a -80°C. Per determinar la concentració proteica les mostres es van analitzar pel mètode de Bradford. Un cop quantificades les mostres es van diluir en tampó Laemli 2x.

Les proteïnes es van separar per Western Blot en condicions desnaturalitzants amb gels de SDS poliacrilamida. El gen concentrador es va preparar al 4% (acrilamida 4%, Tris base 0,125 mM, SDS 0,1%, APS 0,05%, TEMED 0,1%, pH 6,8) i el gel separador es va preparar entre el 6 i 12% segons el pes molecular de la proteïna d'interès (acrilamida 6-12%, Tris base 0,375 mM, SDS 0,1%, APS 0,05%, TEMED 0,1%, pH 8,8). Es van carregar entre 20-40 µg de proteïna de cada mostra als gels juntament amb un marcador de pes molecular (Mini-protean III, Bio-Rad) i es van deixar córrer a un amperatge constant de 20 mA durant 2 hores en tampó d'electroforesis (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%, pH 8,3).

A continuació les proteïnes es van transferir a una membrana de nitrocel·lulosa *Hybond ECL* (Amersham Biosciences) a una potència constant de 100V i 4 °C durant 1 hora en tampó de transferència (metanol 20%, Tris Base 25 mM, glicina 20 mM). Finalitzada la transferència les membranes es van tenyir amb una solució de roig de Ponceau per confirmar que la càrrega de tots els carrils era la mateixa i es van rentar amb TBS-Tween 0.1% (Tris base 20 mM, NaCl 138 mM, Tween20 0,1%, pH 7,4).

Les membranes es van bloquejar amb tampó de bloqueig (TBS-T amb llet en pols al 5%) durant 1 hora i es van incubar en agitació amb l'anticòs primari durant la nit a 4°C. Els anticossos primaris que es van fer servir es troben detallats a la taula 1. Per detectar GRK2 es van fer servir diferents anticossos policlonals propietat del grup del doctor Federico Mayor que detecten diferents regions de la proteïna: l'anticòs AbFP2 és específic contra els residus 436-689, el Ab792 contra els residus 533-544 i l'anticòs comercial AbC-15 contra els residus 675-689.

Al dia següent les membranes es van rentar amb TBS-T (3 rentats de 10 minuts) i es van incubar 1 hora a temperatura ambient amb l'anticòs secundari en tampó de bloqueig. Les bandes de proteïna es van detectar per quimioluminiscència (*SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate*, Pierce) i es van capturar utilitzant un dispositiu de càrrega acoblada (Image Reader LAS-4000, Fujifilm). Per quantificar el nivell de les proteïnes, les imatges es van quantificar amb el software *Image Gauge* (Fijifilm) i es van corregir pel seu control de càrrega.

**Taula 1.** Llistat d'anticossos primaris utilitzats en western blot.

<b>Anticòs</b>	<b>Espècie</b>	<b>Casa Comercial</b>	<b>Referència</b>
Calpaïna-1	Ratolí	Calbiochem	208728
Calpaïna-2	Conill	Abcam	ab39167
Calpastatina	Ratolí	Abcam	ab3515
CUL4A	Ratolí	Santa Cruz	sc-377188
DDB1	Ratolí	Santa Cruz	sc-376860
ERK1/2	Conill	Cell Signaling	4695
$\alpha$ -fodrina	Ratolí	Enzo	BML-F66090-0100
G $\beta$	Ratolí	Santa Cruz	sc-166123
GAPDH	Ratolí	Genetex	GT239
Histona H3	Conill	Abcam	ab1191
GRK2 (AbFP2)	Conill	-	Federico Mayor <sup>298</sup>
GRK2 (Ab792)	Conill	-	Federico Mayor <sup>299</sup>
GRK2 (C-15)	Conill	Santa Cruz	sc-562
I $\kappa$ B	Conill	Cell Signaling	9242S
MDM2	Ratolí	Santa Cruz	sc-965
$\beta$ -MHC	Ratolí	Abcam	ab50967
NF- $\kappa$ B p65	Conill	Cell Signaling	8242A
$\alpha$ -SMA	Ratolí	Sigma-Aldrich	A5228
Smad 2/3	Ratolí	Santa Cruz	Sc-398844
fosfo-Smad 2/3 (Thr8)	Conill	Origene	TA325852
Ubiquitina	Conill	Abcam	ab19247
Ubiquitina (K48)	Conill	Cell Signaling	8081S
Vimentina	Cabra	Santa Cruz	sc-7557

#### 4.2.7) Real Time qPCR

El RNA total dels cors es va obtenir utilitzant el reactiu TRIsure™ (BIOLINE, UK) tal com descriu el protocol. Resumidament, 25-50 mg de teixit es van homogeneïtzar amb el reactiu TRIsure, es va afegir cloroform, i es van centrifugar a 12.000g durant 15 minuts a 4 °C per separar 3 fases. La fase aquosa es va barrejar amb alcohol isopropil fred, que precipita el RNA després d'una centrifugació (12.000g, 10', 4 °C). El RNA obtingut es va rentar amb etanol 75% i després de centrifugar a 7.500g durant 5 minuts a 4°C es va dissoldre en un volum final de 25 µL d'aigua lliure de nucleases. Per determinar la concentració de la mostra es van mesurar les mostres amb un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher). El cDNA es va sintetitzar a partir de 2 µg de RNA total (per reacció de 20 µL) utilitzant el kit *High Capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems) en un aparell iCycler (Bio-Rad). El programa va consistir en un sol cicle tal com es descriu a continuació: 37°C durant 60 min, 95°C durant 5 min, i mantingut a 4°C. Les mostres es van emmagatzemar a -20°C fins al seu ús.

Les reaccions d'amplificació de la PCR es van fer utilitzant una màquina 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Les reaccions es van fer en una placa de 384 pous i es van portar fins a un volum de 20 µL amb la següent composició: 10 µL de *Taqman universal PCR master mix* (Applied Biosystems), 2,5 µL de cDNA, 1 µL de la sonda d'expressió gènica Taqman (Applied Biosystems) i 6,5 µL d'aigua lliure de nucleases. El programa d'amplificació va consistir en el següent: 50°C durant 2 min, 95°C durant 10 min, i 40 cicles de 95°C durant 15 segons i 60°C durant 1 min. El llistat dels primers utilitzats van ser els següents:  $\beta$ -actina (Rn00667869\_m1), ANP (Rn00561661\_m1), BNP (Rn04219558\_g1), Calpaïna-1 (Rn00569689\_m1), Calpaïna-2 (Rn00567422\_m1), Calpastatina (Rn00583952\_m1), Col·lagen I (Rn01463848\_m1), GAPDH (Rn01775763\_g1), IL-1 $\beta$  (Rn00580432\_m1),  $\alpha$ -MHC (Rn00691721\_g1),  $\beta$ -MHC (Rn01488777\_g1), TGF- $\beta$ 1 (Rn00572010\_m1) i TNF $\alpha$  (Rn99999017\_m1).

Per determinar els nivells de GRK2 es van dissenyar sondes (taula 2) conjugades amb *Syber Green* (Sigma-Aldrich) i es va fer servir la *PowerSyber Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). El programa d'amplificació va consistir en el següent: un cicle de 94°C durant 3 min, 40 cicles de 94°C durant 45 segons, 55 °C durant 30 segons i 55 °C durant 30 segons, i finalment un cicle de 72 °C durant 10 minuts.

L'expressió gènica es va calcular com la diferència entre els valors CT ( $\Delta C_T$ ) de cada gen d'interès respecte als gens *housekeeping* (GAPDH i  $\beta$ -actina). Els valors relatius de cada gen es van expressar normalitzats pels valors del grup control.

**Taula 2.** Primers utilitzats per l'anàlisi de GRK2 per RT-PCR

BLDIS1	Forward	5'-GGATCGAGGAGAAGTGACCTT-3'
GRK2	Reverse	5'-TGGCCTCTTCCAGATGGTT-3'
BIS2 GRK2	Forward	5'-CATGCACAATCGCTTTGTAGTC-3'
	Reverse	5'-AGGCCAGGTCTGAGATTC-3'
DIS1	Forward	5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'
GAPDH	Reverse	5'-TGGTCATGAGCCCTTCCAC-3'

#### 4.2.8) Quantificació de l'activitat calpaïna *in vitro*

Per tal d'analitzar la potència d'inhibició del SNJ-1945 i NPO-2270 es va mesurar l'activitat total de la calpaïna *in vitro*. Mostres de miocardi de rata es van homogeneïtzar en tampó Tris (50 mM) amb 1% de Tritó X-100 i es va centrifugar a 15.000g durant 15 minuts. El sobrenadant es va incubar amb diferents concentracions dels inhibidors de les calpaïnes (10 nM, 100 nM, 1 µM i 10 µM). Com a control es va utilitzar un homogenat sense inhibidor de les calpaïnes.

L'activitat de la calpaïna es va mesurar per fluorimetria utilitzant el pèptid fluorescent Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-metilcoumarin (Suc-LLVY-AMC, Sigma-Aldrich) com a substrat. Degut a l'acció proteolítica de la calpaïna sobre el pèptid s'allibera el producte fluorescent derivat (AMC). L'alliberació del AMC es va monitoritzar durant 30 minuts a 25 °C amb un lector SpectraMax iD3 (Molecular Devices) a una longitud d'excitació de 360 nm i d'emissió de 460 nm. La mesura de la fluorescència obtinguda és per tant directament proporcional a l'activitat de la calpaïna. A partir dels resultats obtinguts es va calcular la IC50 (la concentració a la que es produeix una inhibició del 50%) de cada inhibidor.

Per altre banda, es va repetir l'assaig per comprovar l'eficàcia de la ruta d'administració en el model de remodelat induït per isoproterenol. Teixit de miocardi de mostres del grup control, isoproterenol i isoproterenol+SNJ es va homogeneïtzar i incubar amb el pèptid Suc-LLVY-AMC. A l'assaig també es va agregar una condició en la qual es va afegir l'inhibidor SNJ-1945 (10 µmol/L) de forma exògena al sobrenadant de mostres de miocardi control per tal de determinar l'especificitat del assaig.

#### 4.2.9) Activitat calpaïna en fibroblasts

L'activitat de la calpaïna intracel·lular en els cultius de fibroblasts es va determinar mitjançant el pèptid fluorescent t-BOC-Leu-Met-CMAC (Sigma-Aldrich). El pèptid és liposoluble i permeable a la membrana cel·lular i està conjugat amb el fluoròfor 7-amino-4-clorometilcumarina (CMAC). Un cop internalitzat, es conjuga amb un grup glutatió (GSH) a través de l'enzim glutatió transferasa (GST), quedant retingut dins la cèl·lula. L'acció proteolítica de la calpaïna allibera el producte CMAC-GSH, que emet fluorescència que és proporcional a l'activitat de la calpaïna.

Les cèl·lules sembrades en una placa per fluorescència de 96 pous (150.000 cèl·lules/pou) es van incubar amb  $\text{Ca}^{2+}$  (2 mM) i TGF-β1 (5 ng/mL) amb o sense SNJ-1945 (10 mM), juntament amb el pèptid t-BOC (10 µM). La incubació amb el  $\text{Ca}^{2+}$  i el SNJ es va realitzar 20 minuts abans de la lectura, i el TGF-β1 es va afegir 10 minuts abans. La fluorescència es va medir durant una hora en el lector SpectraMax iD3 amb una longitud d'excitació de 360 nm i una d'emissió de 460 nm.

#### 4.2.10) Mesura de col·lagen

La producció de col·lagen en fibroblasts es va avaluar en el medi de cultiu mitjançant el kit de Chondrex Sirius Red (Fisher Scientific). La proteïna total es va quantificar pel mètode de Bradford per descartar que les diferències en la producció de col·lagen no es corresponguessin a canvis globals de proteïna.

Donat que la concentració de col·lagen en el medi de cultiu es troba per sota dels límits de detecció del kit, es van incubar durant tota la nit amb una solució concentradora. Un cop diluïdes les mostres en àcid acètic al 0,05M (les fibres de col·lagen madures amb enllaços intramoleculars no són solubles en sals però sí en àcids), es van tenyir amb la solució de Sirius Red durant 20 minuts a temperatura ambient. Les mostres es van centrifugar a 10.000 rpm durant 3 minuts i el *pellet* es va resuspendre amb una solució rentadora. El procés es va repetir de nou, i a continuació el *pellet* es va resuspendre en el tampó d'extracció. Les mostres es van transferir a una placa de 96 pous i es va llegir la densitat òptica amb el lector Multiskan FC a 500nm.

#### 4.2.11) Zimografia

L'activitat de la metaloproteïnasa 2 (MMP-2) va ser avaluada per zimografia de gelatina. Les mostres de rates reperfundides durant 21 dies del grup control es van homogeneïtzar en tampó cacodílic (en mM: àcid cacodílic 10, NaCl 150, ZnCl<sub>2</sub> 0.2, CaCl<sub>2</sub> 20, NaN<sub>3</sub> 1.5, Tritó X-100 0.01%). Les mostres es van deixar incubant en el tampó durant 20 hores en rotació a 4 °C i al dia següent es van centrifugar a 8000g durant 30 minuts a 4 °C. Els sobrenadants es van córrer en un gel al 10% de poliacrilamida copolimeritzat amb 1,5 mg/mL de gelatina a 125V fins que el front de blau de bromofenol va arribar al final del gel.

Un cop corregut el gel, es va rentar amb 2,5% de tritó X-100 durant 30 minuts en agitació a temperatura ambient, i es va tallar en tires que van ser incubades amb SNJ-1945 a diferents concentracions (5, 10 i 50 µM), amb DMSO (vehicle) o amb l'inhibidor selectiu de les MMP ONO-4817 (50 µM, R&D systems) durant tota la nit. L'activitat de la MMP-2 també es va mesurar en mostres preparades d'animals que havien rebut el SNJ-1945 (120 µg/kg) de forma oral durant 14 dies (grup crònic).

L'endemà, les tires de gel es van equilibrar amb tampó de desenvolupament (en mM: Tris Base 10, Tris-HCl 40, ZnCl<sub>2</sub> 0,1, CaCl<sub>2</sub> 5, Brij 35 0,15) durant 30 minuts en agitació, per després substituir per tampó de desenvolupament fresc i incubar el gel a 37°C durant tota la nit. Finalment, els gels es van tenyir amb Blau de Comassie R-250 al 0,25% durant 30 minuts. Per visualitzar les bandes d'activitat gelatinolítica el gel es va destenyir amb una solució de 50% metanol, 10% àcid acètic i 40% aigua. Les àrees de l'activitat proteasa on s'ha digerit el substrat apareixen com bandes clares respecte el contrast del blau fosc del fons.

**4.2.12) Anàlisi dels nivells d'ubiquitinització de MDM2**

Per analitzar els nivells d'ubiquitinització de Mdm2, es va fer un “pull down” de totes les proteïnes poliubiquitinitzades amb el kit d'agarosa-TUBES (LifeSensors) i posteriorment es va detectar les proteïnes d'interès per immunoblot.

Primerament la resina es va equilibrar i es va obtenir la quantitat necessària per cada mostra (es va determinar 20 µL de resina per 500µL de tampó de lisis contenint 2 mg de proteïna) centrifugant el compost aquós a 2.500g durant 5 minuts a temperatura ambient. La resina es va resuspendre en 1 mL de TBS-T (20mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,15M NaCl, 0.1% Tween20) i es va deixar en agitació durant 5 minuts. El procés de recol·lecció i rentat de la resina es va repetir dues vegades més.

Mostres de miocardi dels diferents grups de rates amb remodelat per administració d'isoproterenol es van homogeneïtzar amb 500 µL de tampó de lisis (50mM Tris-HCl pH 7,5, 0,15M NaCl, 1mM EDTA, 1% NP-40, 10% glicerol, 1% inhibidor proteases), i es van centrifugar a 14.000g durant 10 minuts a 4 °C. La concentració proteica de les mostres es va quantificar pel mètode de Bradford, es van carregar 2 mg de proteïna als tubs amb la resina i es van incubar durant la nit a 4°C en rotació.

Al dia següent la resina es va obtenir de nou per centrifugació a 2500g a 4°C durant 5 minuts. El sobrenadant es va guardar com a fracció proteica no unida i la resina es va rentar amb 1 mL de TBS-T 3 vegades. Finalment la resina es va resuspendre en 20 µL de tampó reductor amb SDS (Laemli 1X) i es va portar la mostra a la temperatura d'ebullició (100°C) durant 5 minuts per separar les proteïnes unides a la resina. Finalment, després de centrifugar la mostra a 13.000g durant 5 minuts els sobrenadant obtingut es va guardar a -80°C com a fracció proteica enriquida d'ubiquitina.

**4.2.13) Anàlisi dels nivells de poliubiquitinització de GRK2**

Mostres de miocardi dels diferents grups de rates amb remodelat per administració d'isoproterenol es van homogeneïtzar amb un tampó de lisis (50mM Tris-HCl pH 7.5, 0.15M NaCl, 1mM EDTA, 1% NP-40, 10% glicerol, 1% inhibidor proteases). Per la immunoprecipitació de GRK2, els sobrenadants es van incubar amb un anticòs monoclonal per GRK2 (clon C5/1.1, Upstate) conjugat amb agarosa durant la nit a 4°C en rotació. Després d'eluir el complex immunològic (ebullició de la resina amb Laemli 1X durant 5 minuts), es va córrer en un gel de poliacrilamida no reductor del 7,5% i es va incubar amb un anticòs per ubiquitina que reconeix totes les formes de cadenes mono i poliubiquitina conjugades a proteïnes. A continuació es va realitzar un *stripping* i les membranes es van incubar de nou amb un anticòs per detectar cadenes de poliubiquitina amb unions K48 unides a GRK2 per la seva degradació al proteosoma. Finalment els blots es van incubar amb un l'anticòs GRK2 (sc-562) per detectar la proteïna total immunoprecipitada. Els nivells d'ubiquitina es van normalitzar respecte els nivells totals de GRK2.

**4.2.14) Anàlisi estadístic**

L'anàlisi de les dades es va fer utilitzant el programa SPSS de Windows. La suposició de normalitat es va examinar abans de realitzar l'anàlisi estadístic utilitzant el test de Shapiro-Wilk. Les mitjanes entre grups es van comparar per una ANOVA d'un factor. Es va aplicar la prova de diferència menys significativa (test LSD) com a prova post hoc quan les diferències observades van ser significatives. El t-test no aparellat es va fer servir en la figures 21A-B i 39C. L'ANOVA amb mesures repetides i la prova de Dunnett com a prova post hoc es van fer servir per comprar les diferències temporals. Els anàlisis de regressió lineal es van utilitzar per analitzar la correlació entre els nivells de mRNA de calpaïna 1 i els marcadors d'hipertròfia. Tots els resultats estan expressats com la mitjana  $\pm$  l'error estàndard de la mitjana (SEM). El p valor menor a 0,05 es va considerar com estadísticament significatiu.





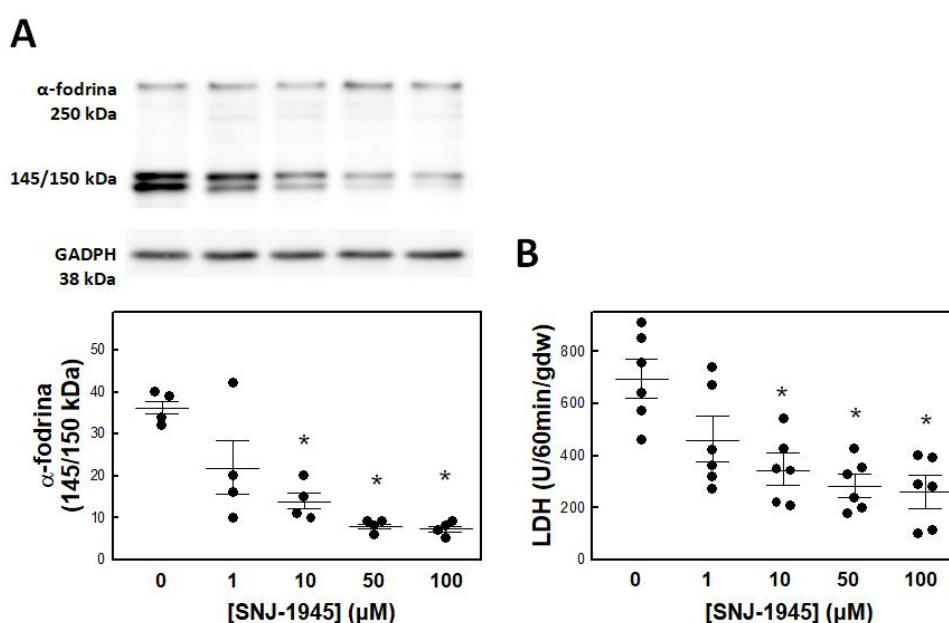




## 5.1) CARACTERITZACIÓ DEL SNJ-1945: ESTUDI DE DOSIS I ESPECIFICITAT

### 5.1.1) Estudi de dosis en cors aïllats sotmesos a isquèmia-reperfusió

La caracterització de l'efecte cardioprotector del SNJ-1945 es va dur a terme inicialment en cors aïllats de rates perfosos en un sistema Langendorff sotmesos a un protocol d'isquèmia-reperfusió. Es va fer servir la quantificació per western blot dels fragments de  $\alpha$ -fodrina de 145 i 150 kDa com a marcador de l'activitat *in vivo* de les calpaines i l'alliberament de LDH com a indicador de mort cel·lular. La proteòlisi de  $\alpha$ -fodrina va mostrar una alta activació de les calpaines durant la reperfusió. La perfusió dels cors amb diferents concentracions de SNJ-1945 va reduir la formació dels fragments de  $\alpha$ -fodrina de forma dosi-dependent (Figura 16A), assolint la significació estadística a 10  $\mu$ M. La mort cel·lular, expressada com LDH alliberat durant 60 minuts de reperfusió per gram de teixit sec, va mostrar una correlació directament proporcional amb l'activació de les calpaines ( $r^2=0,99$ ,  $p<0,001$ ), arribant a una reducció màxima del 63% (Figura 16B).

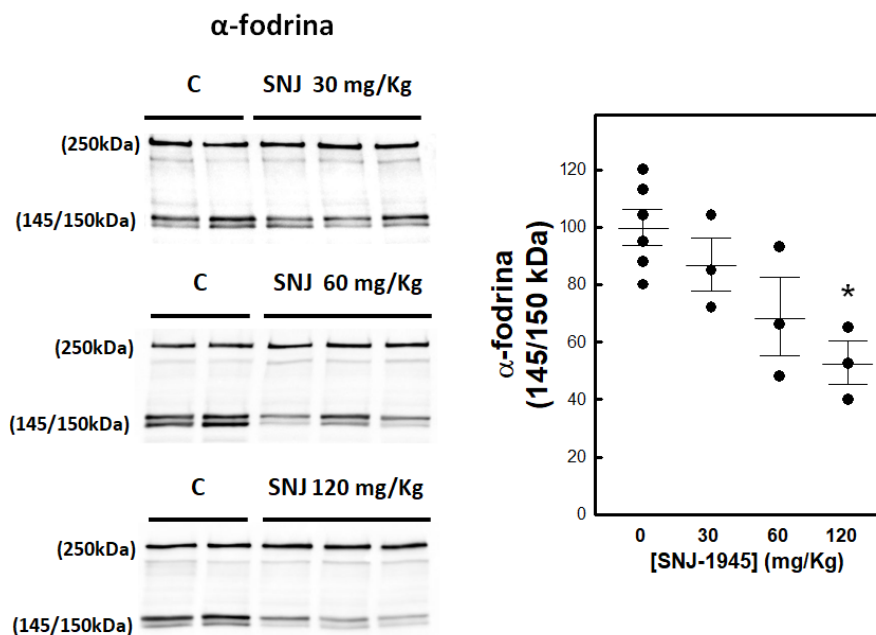


**Figura 16.** Cors aïllats sotmesos a 40 minuts d'isquèmia seguits d'una reperfusió amb SNJ-1945 a diferents concentracions (1, 10, 50 i 100  $\mu$ M). A) Imatges representatives del western blot i anàlisi densitomètric de les bandes de degradació de la  $\alpha$ -fodrina (n=4 per grup). B) Activitat de lactat deshidrogenasa alliberat en 60 minuts de reperfusió per gram de teixit sec (gdw) (n=6 per grup). Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  SEM. \* $P<0,05$  respecte al grup control.

### 5.1.2) Estudi de dosis en rates sotmeses a isquèmia-reperfusió

Tenint en compte les dades obtingudes en el model de Langendorff i els paràmetres farmacocinètics del SNJ-1945<sup>287</sup>, l'inhibidor es va administrar de forma oral a les rates a les dosis de 30, 60 i 120 mg/kg una hora abans del protocol d'isquèmia-reperfusió. L'anàlisi dels fragments de  $\alpha$ -fodrina de 145 i 150 kDa va mostrar una reducció dosi dependent de l'activitat de la calpaina que va ser estadísticament significativa a la dosi de 120 mg/kg de SNJ-1945

(Figura 17). Amb aquests resultats, la concentració de 120 mg/kg va ser l'escollida per la resta d'experiments *in vivo* de l'estudi.



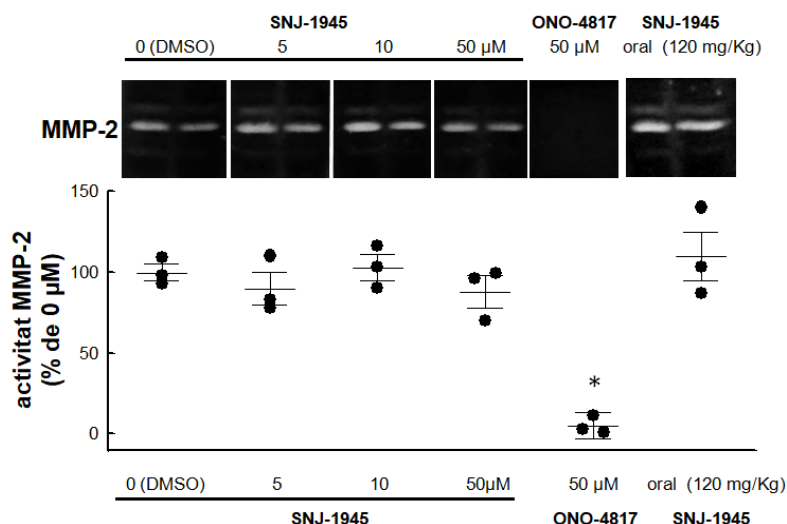
**Figura 17.** Imatges representatives del western blot i anàlisi densitomètric de les bandes de degradació de la α-fodrina i expressats en percentatge respecte als nivells de rates sense l'administració de SNJ-1945 (n=6 grup control, n=3 grups amb SNJ-1945). Els resultats estan expressats com a mitjana ± SEM. \*P<0,05 respecte al grup control.

### 5.1.3) El SNJ-1945 no inhibeix l'activitat de la MMP-2

Alguns treballs suggereixen que les calpaïnes i la MMP2 tenen substrats compartits i que algunes molècules usades com inhibidors de calpaina no són capaces de discriminar entre les dues proteases. Per descartar la possibilitat que els efectes del SNJ-1945 descrits en els punts anteriors fossin conseqüència de l'acció inhibidora sobre la MMP-2, es va analitzar l'activitat gelatinolítica de la MMP-2 per zimografia en mostres incubades amb diferents concentracions de SNJ-1945 (0, 5, 10 i 50 μM). Com a control de l'efecte inhibitori, les mostres també es van incubar amb l'inhibidor selectiu de les MMP ONO-4817. L'aparició de les bandes reflecteix l'activitat de la MMP-2, i en els resultats obtinguts no es va observar cap diferència entre el control i les diferents concentracions de SNJ-1945 (Figura 18). En canvi, a les mostres incubades amb l'inhibidor ONO-4817 es va inhibir totalment la MMP-2.

A més, també es van analitzar extractes de miocardi de rates tractades oralment amb l'inhibidor durant 14 dies a la concentració final escollida (120 mg/kg) per descartar un comportament diferent en el model *in vivo*. L'activitat gelatinolítica observada no va diferir de la resta de mostres incubades amb SNJ-1945 o DMSO (Figura 18).

Aquests resultats demostren doncs que, a les concentracions testades, el SNJ-1945 no inhibeix l'activitat de la MMP-2, donant suport a que els efectes observats són deguts a la inhibició de les calpaïnes.

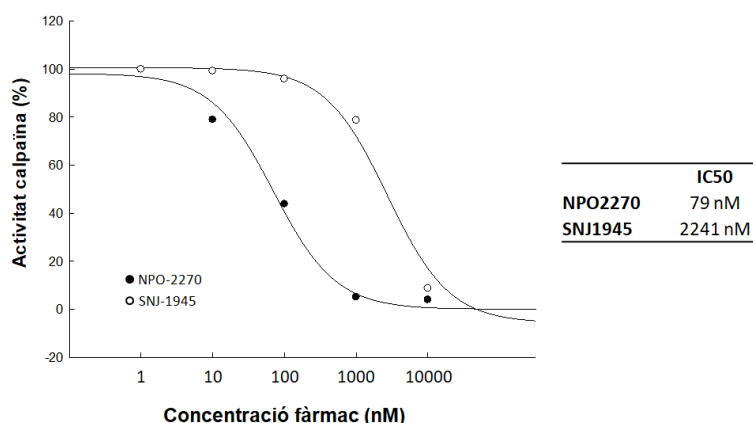


**Figura 18.** Presència de bandes gelatinolítiques per zimografia de mostres de miocardi de rates control reperfores durant 21 dies i incubades durant 12 hores a 37 °C amb DMSO, SNJ-1945 o ONO-4817, o de mostres de miocardi de rates administrades amb el SNJ-1945 de forma oral durant 14 dies (n=3 per grup). Els resultats estan expressats com a mitjana ± SEM. \*P<0,05 respecte al grup control amb DMSO.

## 5.2) CARACTERITZACIÓ DEL NPO-2270: ESTUDI DE DOSIS

### 5.2.1) La potència inhibidòria del NPO-2270 és superior a la del SNJ-1945

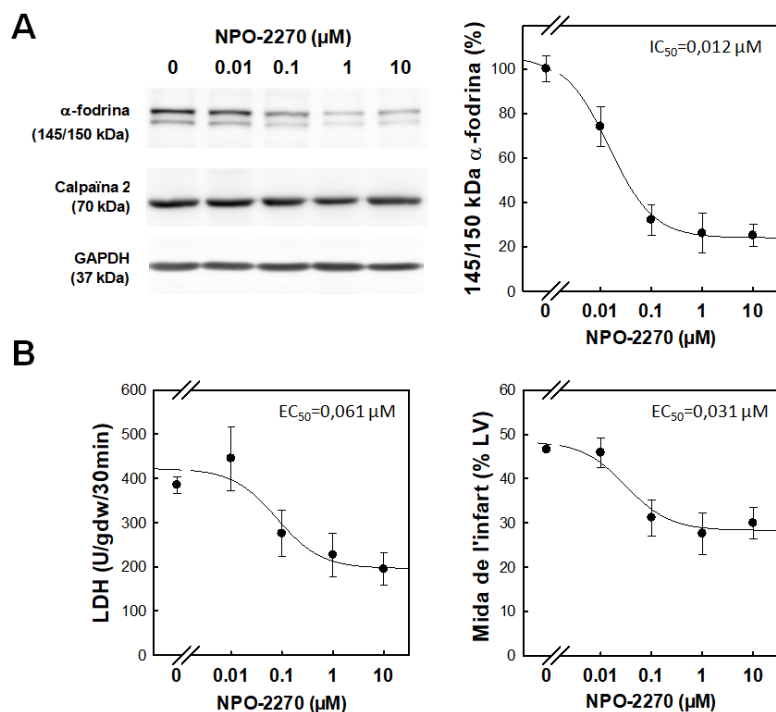
A més del SNJ-1945, es va avaluar l'eficàcia de la inhibició farmacològica de les calpaïnes contra el remodelat ventricular fent servir un nou inhibidor farmacològic anomenat NPO-2270. L'activitat de la calpaïna mesurada *in vitro* en mostres d'homogenat de miocardi amb diferents concentracions dels dos inhibidors (Figura 19) va mostrar que el NPO-2270 té una potència superior al SNJ-1945 (IC50 79 nM vs. 2241 nM respectivament).



**Figura 19.** Activitat de la calpaïna *in vitro* expressada en percentatge generada pel trencament del pèptid substrat de la calpaïna Suc-LLVY-AMC durant 30 minuts en mostres de miocardi incubades amb diferents concentracions de NPO-2270 i SNJ-1945.

Inicialment es va determinar la dosi efectiva de NPO-2270 en cors aïllats de rata sotmesos a isquèmia-reperfusió en el sistema de Langendorff. L'anàlisi dels fragments de α-fodrina per western blot va mostrar una reducció de l'activitat de les calpaïnes de forma dosi dependent

( $IC_{50}=0,012 \mu\text{M}$ ; Figura 20A). La perfusió de NPO-2270 durant els 15 primers minuts de la reperfusió va atenuar l'alliberament de LDH i la mida de l'infart després de 40 minuts d'isquèmia global i 60 minuts de reperfusió de forma dosi-dependent (Figura 20B). En tots els paràmetres es va assolir la significació a partir de la concentració de  $0,1 \mu\text{M}$  ( $p<0,001$  per la  $\alpha$ -fodrina,  $p=0,021$  per la LDH i  $p=0,001$  per la mida de l'infart) i la  $EC_{50}$  (concentració a la que es produeix un 50% de l'efecte màxim) calculada a partir de l'atenuació de l'increment en la mida de l'infart i l'alliberació de LDH va oscil·lar entre  $0,031$  i  $0,061 \mu\text{M}$ .



**Figura 20.** Cors aïllats sotmesos a isquèmia-reperfusió perfosos amb diferents concentracions de NPO-2270 (0, 0.01, 0.1, 1 i  $10 \mu\text{M}$ ) durant els primers 15 minuts de la reperfusió. A) Imatge representativa del western blot i anàlisi densitomètric de les bandes dels fragments de  $\alpha$ -fodrina normalitzats per GAPDH i expressats en percentatge respecte a  $0 \mu\text{M}$  ( $n=4$  per grup). A) Alliberació acumulada de la lactat deshidrogenasa en 30 minuts de reperfusió i pressió desenvolupada del ventricle esquerre. Passats els 60 minuts, els cors es van tallar en seccions transversals i es van tenyir amb TTC per mesurar la mida de l'infart, expressat com percentatge del ventricle esquerre ( $n=6$  per grup). Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  SEM. \* $P<0,05$  respecte al grup control.

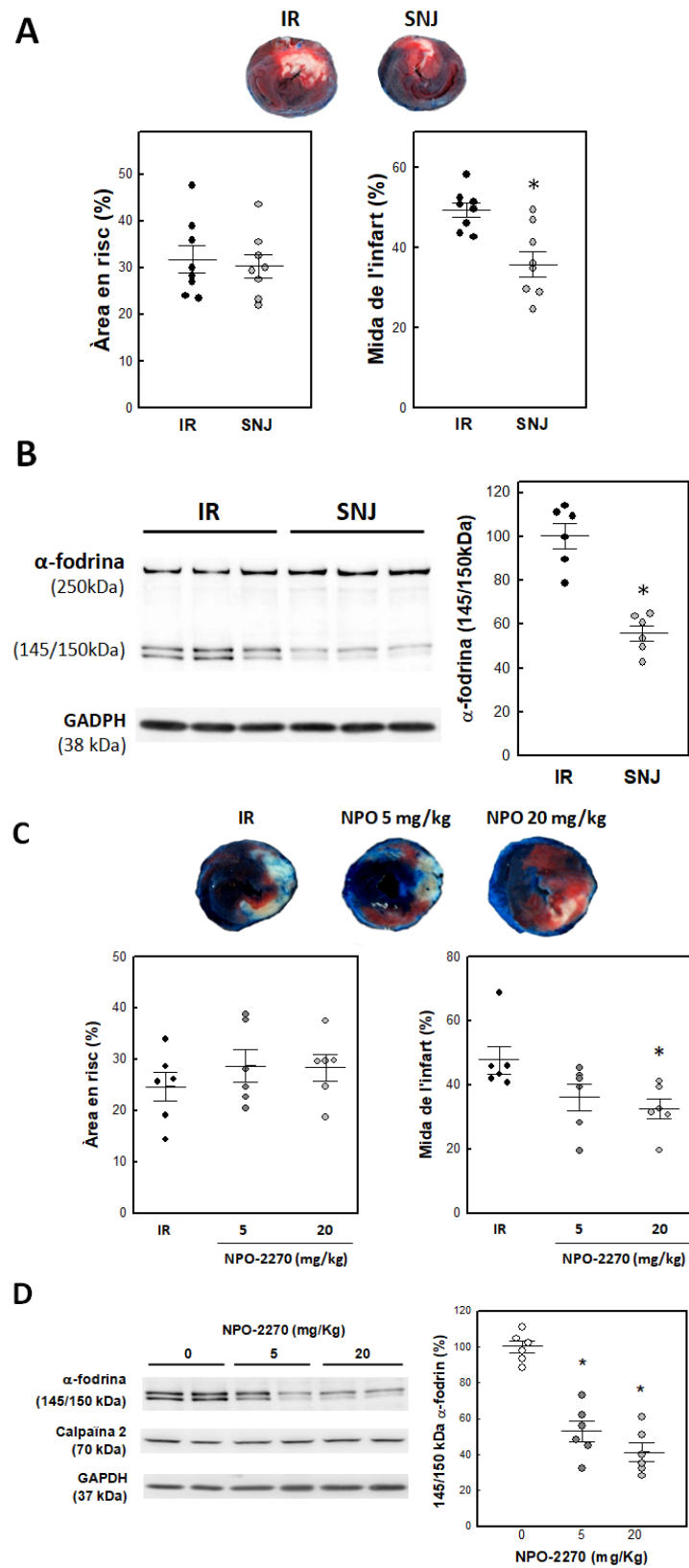
### **5.3) L'ADMINISTRACIÓ INTRAPERITONEAL DE SNJ-1945 O NPO-2270 JUST ABANS DE LA REPERFUSIÓ REDUEIX LA MIDA DE L'INFART**

Els nostres resultats indiquen que el SNJ-1945 inhibeix de forma efectiva l'activitat de la calpaïna i la mort cel·lular en el model *ex vivo* de Langendorff. Un cop establerta la dosi, es va analitzar l'efecte de l'inhibidor sobre la mida de l'infart en rates sotmeses a 30 minuts d'isquèmia i 24 hores de reperfusió. No es van observar diferències significatives en l'àrea en risc entre el grup control i els animals que van rebre l'administració intraperitoneal de SNJ-1945 just abans de l'inici de la reperfusió ( $31,8 \pm 2,9\%$  grup IR vs.  $30,3 \pm 2,4\%$  grup SNJ-1945; Figura 21A), descartant així també possibles diferències en les característiques anatòmiques de l'oclusió entre els dos grups. En canvi, l'administració de SNJ-1945 va reduir la mida de l'infart en un 25% ( $49,4 \pm 1,8\%$  grup IR vs.  $36,9 \pm 3,2\%$  grup SNJ-1945,  $p=0,005$ ; Figura 21A).

Per tal de comprovar l'eficàcia de l'administració del SNJ-1945 en la inhibició de les calpaïnes, es va mesurar per western blot la degradació de  $\alpha$ -fodrina. La quantificació dels resultats mostrats a la figura 21B indiquen una reducció dels fragments resultants de la proteòlisi de  $\alpha$ -fodrina en el grup SNJ-1945 d'un 45% ( $p=0,001$ ).

Per altra banda, amb els resultats obtinguts en el model *ex vivo* i els paràmetres farmacocinètics del NPO-2270 proporcionats per la companyia farmacèutica, es van repetir els experiments d'isquèmia-reperfusió en el model *in vivo* en ratolins amb aquest inhibidor. Els resultats no van mostrar diferències entre els grups en la massa de miocardi en risc ( $24,65 \pm 2,83$  grup IR,  $28,68 \pm 3,18$  grup NPO5 i  $28,34 \pm 6,23$  grup NPO20). En canvi, l'infart de miocardi mesurat després de 24 hores de reperfusió es va reduir de forma significativa en els ratolins que van ser administrats amb NPO-2270 a una dosi de 20 mg/kg ( $47,8 \pm 4,27$  grup control vs  $32,5 \pm 3,12$ ; grup NPO20,  $p=0,016$ ), mentre que es va observar una tendència que no va arribar a ser significativa en la dosi de 5 mg/kg de NPO-2270 ( $p=0,053$ ; Figura 21C). La quantificació dels fragments de degradació de  $\alpha$ -fodrina per western blot indica una inhibició efectiva de l'activitat de les calpaïnes en ambdues concentracions ( $p<0,001$ ; Figura 21D).





**Figura 21.** Imatges representatives de seccions transversals de cors infartats dels diferents grups experimentals de A) rates sotmeses a 30 minuts d'oclusió coronària i 24 hores de reperfusió (n=8 per grup) i de C) ratolins sotmesos a 45 minuts d'oclusió coronària i 24 hores de reperfusió (n=6 per grup) on es mostra l'àrea en risc (delimitada per Evans Blue) i l'àrea de necrosi (marcada per TTC). B-D) Imatges representatives dels western blot i anàlisi densitomètric de les bandes dels fragments de  $\alpha$ -fodrina i calpaina 2 relativitzat per GAPDH (n=6 per grup). Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  SEM. \*P<0.05 vs. grup IR.

#### **5.4) PAPER DE LES CALPAÏNES EN EL REMODELAT VENTRICULAR POSTINFART**

##### **5.4.1) L'administració oral i retardada del SNJ-1945 atenua l'activació de la calpaïna**

Un cop confirmat l'efecte cardioprotector del SNJ-1945 sobre la mida de l'infart, es va analitzar el seu potencial per reduir el remodelat ventricular postinfart fent servir un model de rates sotmeses a isquèmia i 21 dies de reperfusió.

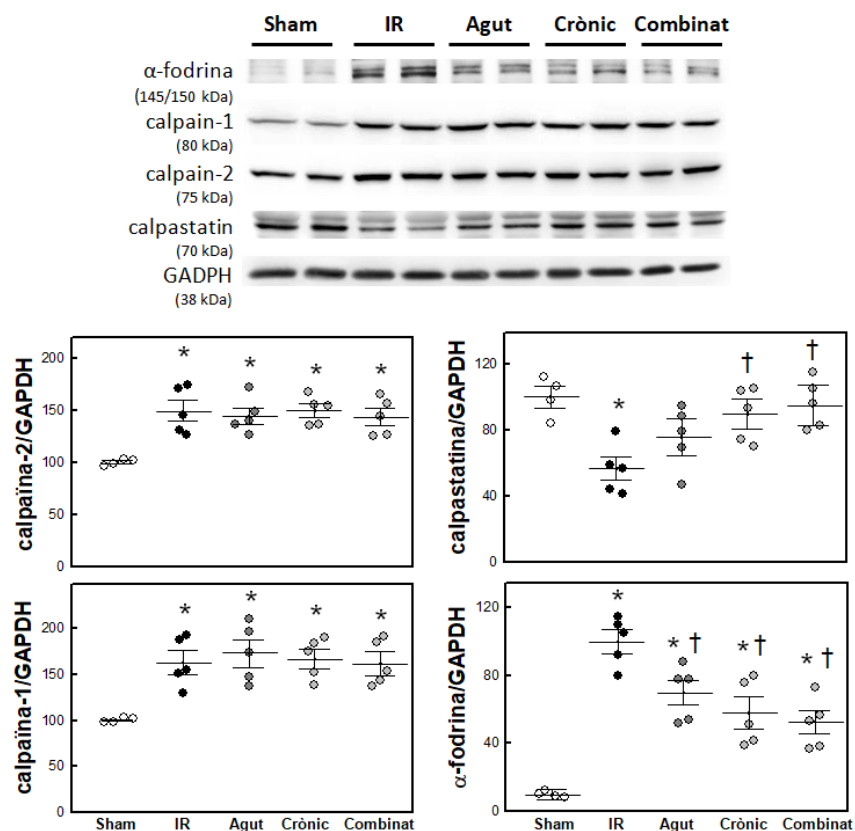
Per diferenciar si els efectes de la inhibició de les calpaïnes sobre el remodelat postinfart són merament una conseqüència de la reducció en l'extensió de l'infart o d'un efecte sobre els mecanismes responsables del procés de remodelat, un grup va rebre una única dosi de SNJ-1945 abans de començar la reperfusió (grup agut) i un altre grup va rebre SNJ-1945 diàriament per via oral amb inici 24h després la reperfusió, temps suficient per evitar un efecte sobre l'extensió de l'infart (grup crònic). Finalment, es va analitzar un possible efecte additiu en un grup d'animals que va rebre la combinació dels dos tractaments.

Primerament, es van analitzar els nivells d'expressió proteica de les calpaïnes i calpastatina, així com els marcadors d'activitat en mostres de la zona remota del miocardi dels diferents grups experimentals.

Els nivells proteics de calpaïna-1 i calpaïna-2 obtinguts en mostres de miocardi no infartat obtingudes de ratolins del grup sense tractament (IR) van augmentar durant la reperfusió en un 65 i 48% respectivament ( $p=0,008$  i  $p=0,003$  respectivament respecte el grup Sham). L'administració del SNJ-1945 de forma aguda o crònica no va modificar la sobreexpressió de les calpaïnes respecte el grup IR (Figura 22).

Els nivells de la calpastatina, l'inhibidor endogen de la calpaïna i que és a la seva vegada substrat, es van veure reduïts en els cors reperfosos dels animals del grup IR (Figura 22). L'administració de SNJ-1945 de forma aguda i crònica va atenuar aquesta disminució respecte el grup IR, assolint la significança únicament en els grups tractats de forma crònica ( $p=0,026$  grup crònic,  $p=0,006$  grup combinat).

L'augment de l'expressió de la calpaïna va anar acompanyat d'un increment en la seva activitat, quantificada a partir dels fragments proteolítics de  $\alpha$ -fodrina de 145/150 kDa. El tractament amb SNJ-1945 tant de forma aguda com crònica va reduir la degradació de fodrina, sent aquesta més pronunciada en el tractament crònic ( $p=0,032$  i  $p=0,002$  respectivament). La combinació dels dos tractaments mostra una tendència, encara que estadísticament no significativa respecte als tractaments individuals, a una major reducció de l'activitat calpaïna.



**Figura 22.** Imatges representatives dels western blot i anàlisi densitomètric de les bandes dels fragments de 145/150 kDa de α-fodrina, calpaïna 1, calpaïna 2 i calpastatina (n= 4-5 per grup). Els resultats estan relativitzats per GAPDH i expressats com a mitjana ± SEM. \*P≤0.05 vs. grup sham. †P≤0,05 vs. grup IR.

#### 5.4.2) L'administració oral i crònica de SNJ-1945 o NPO-2270 atenua el remodelat postinfart

En l'estudi del SNJ-1945, la mortalitat entre les 48 rates operades va ser d'un 12,5% sense cap diferència en la ràtio de supervivència entre grups (4 rates van morir durant la cirurgia i 2 a les 12 i 24 hores de reperfusió). A més, 4 animals es van excloure de l'estudi perquè no es va confirmar que el segment ST s'elevés durant la fase d'isquèmia.

Es van realitzar ecocardiografies als animals de forma basal (abans de realitzar la cirurgia i on no es va observar cap diferència entre els diferents grups), així com als 7 i 21 dies de reperfusió. L'anàlisi ecocardiogràfic va mostrar en el grup IR un increment progressiu del volum sistòlic i diastòlic, reflectint la dilatació del ventricle esquerre característica del remodelat postinfart, així com una marcada caiguda en la fracció d'ejecció (Figura 23A). En canvi no es van observar variacions significatives en el gruix de la paret del ventricle o el septe. Tant la dilatació del ventricle esquerre com la disfunció contràctil mesurats a partir dels 7 dies es van atenuar significativament en els grups que van rebre SNJ-1945 durant la fase aguda de la reperfusió (LVESD: p=0,026 i p=0,020; LVEDD: p=0,005 i p=0,015; FE: p<0,001 i 0,003 a 7 i 21 dies respectivament pel grup agut; LVESD: p=0,043 i p=0,004; LVEDD: p=0,021 i p=0,004; FE: p<0,001 i p=0,006 a 7 i 21 dies pel grup combinat) i també ho van fer als 21 dies en el grup crònic (p=0,042 i p=0,241 per LVEDD i FE respectivament; Figura 23A).

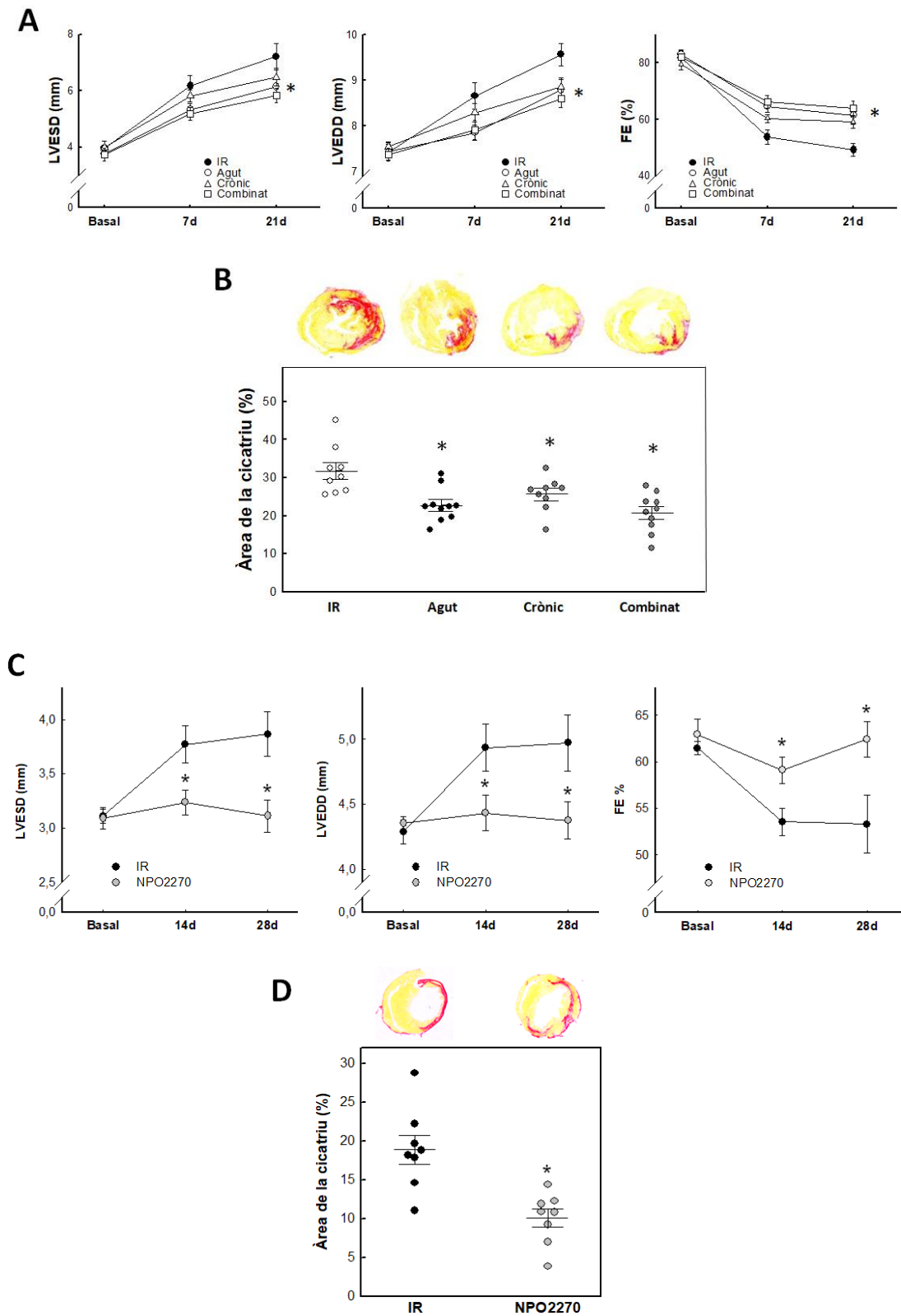
Als 21 dies de reperfusió, els animals es van sacrificar i es van realitzar talls histològics dels cors. La quantificació de la mida de la cicatriu de col·lagen (Figura 23B) tenyida amb picrosirius red va mostrar una reducció d'aquesta en els grups tractats amb SNJ-1945 ( $31,8 \pm 2,1\%$  grup IR, vs.  $22,7 \pm 1,56\%$  grup agut,  $25,6 \pm 1,70\%$  grup crònic i  $20,74 \pm 1,61\%$  grup combinat,  $p=0,001$ ,  $p=0,016$  i  $p<0,001$  respectivament) indicant un menor remodelat ventricular postinfart. No s'observen diferències significatives en la disminució entre els diferents grups tractats.

Tot i que el tractament combinat va mostrar una tendència a una atenuació més efectiva del remodelat ventricular reflectida en la disminució dels volums ventriculars, increment de la fracció d'ejecció i reducció de la cicatriu, la millora respecte els tractaments individuals no va ser estadísticament significativa.

En l'estudi del NPO-2270, entre els 20 ratolins operats la mortalitat va ser del 20% sense cap diferència entre la ràtio de supervivència del grup IR i el grup NPO (3 ratolins van morir durant la cirurgia i 1 ratolí va morir al sisè dia de tractament).

Les ecocardiografies es van fer de forma basal abans de realitzar la cirurgia i als 14 i 28 dies de reperfusió, i el seu anàlisi va mostrar una reducció pràcticament total tant en la disfunció ( $p=0,008$  i  $p=0,015$  a 14 i 28 dies respectivament) com en la dilatació ventricular (LVESD:  $p=0,009$  i  $p=0,005$ ; LVEDD:  $p=0,025$  i  $p=0,023$  a 14 i 28 dies respectivament) en els ratolins tractats amb NPO-2270 respecte al grup IR (Figura 23C). No es van observar diferències significatives respecte als valors basals. L'anàlisi de l'àrea de la cicatriu per tinció amb el picrosirius red també va mostrar una disminució significativa en el grup tractat respecte al grup IR ( $18,4\%$  del grup IR vs.  $10,5\%$  grup NPO,  $p=0,005$ ; Figura 23D).

Tot i les diferències entre els dos models (especies animals, temps d'isquèmia i reperfusió, temps d'administració dels inhibidors), la comparació dels resultats ecocardiogràfics obtinguts amb NPO2270 amb els obtinguts amb el tractament amb SNJ1945 corresponents al grup combinat, confirmen la contribució de les calpaïnes al remodelat postinfart i demostren que l'efecte i potència farmacològica del NPO-2270 és superior a la del SNJ-1945.



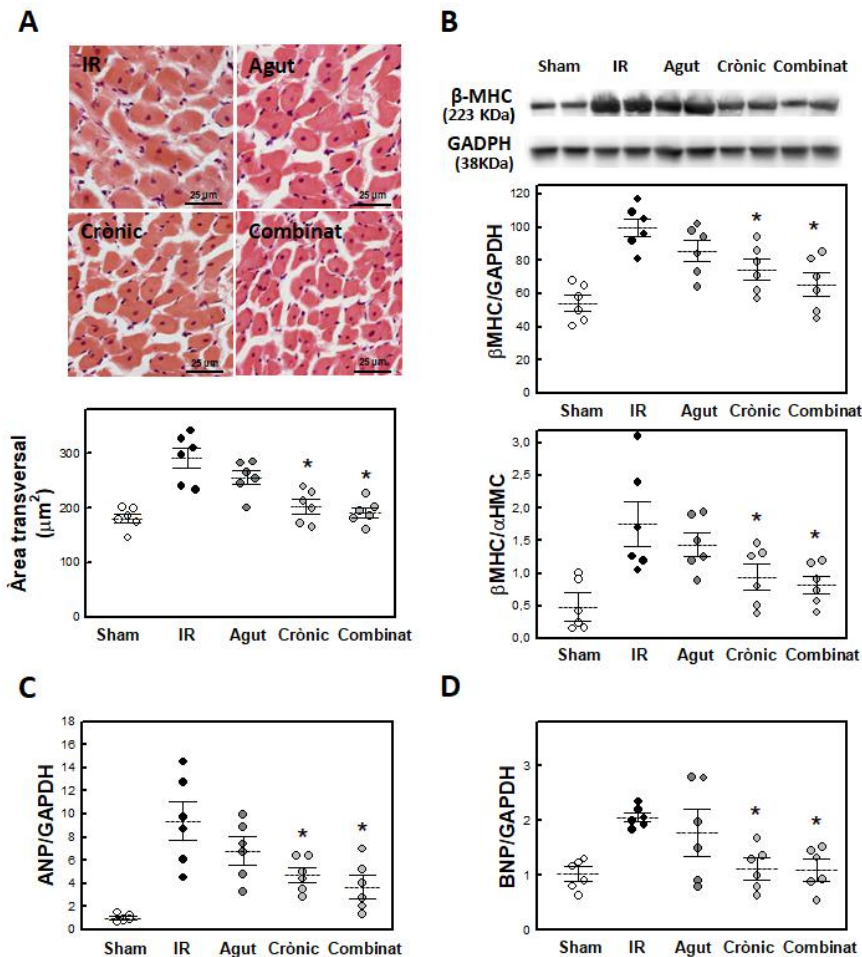
**Figura 23.** Evolució temporal dels diàmetres interns del ventricle esquerre al final de la sístole (LVEDS) i de la diàstole (LVEDD), i de la fracció d'ejecció (FE) en els diferents grups experimentals de A) rates sotmeses a 30 minuts d'isquèmia i 21 dies de reperfusió (n=9-10 per grup) i C) ratolins sotmesos a 45 minuts d'isquèmia i 28 dies de reperfusió (n=8 per grup). Imatges representatives de seccions transversals de cors de B) rata i D) ratolí remodelats i tenyits amb picosirius red. L'àrea de la cicatriu està expressada com a percentatge respecte a l'àrea del ventricle esquerre. Els resultats estan expressats com a mitjana ± SEM. \*P<0.05 vs. grup IR.

#### 5.4.2.1) L'administració crònica però no aguda de SNJ-1945 limita la hipertròfia dels cardiomiòcits al miocardi no infartat

Un cop demostrat que el SNJ-1945 redueix el remodelat ventricular postinfart, es va passar a analitzar com modifica els diferents processos que es desenvolupen durant el procés de remodelat, com són la hipertròfia dels cardiomiòcits, la fibrosi intersticial i la infiltració de cèl·lules inflamatòries a l'àrea no infartada.

Talls histològics de miocardi no infartat es van tenyir amb hematoxilina-eosina i es va mesurar l'àrea transversal dels cardiomiòcits. L'infart de miocardi va provocar la hipertròfia dels cardiomiòcits (Figura 24A), augmentant la seva àrea en un 61% respecte al grup sham ( $p < 0,001$ ). L'administració crònica de SNJ-1945, però no l'administració aguda, va atenuar de forma significativa l'augment de l'àrea transversal dels cardiomiòcits ( $p = 0,041$  en el grup crònic i  $p = 0,024$  en el grup combinat respecte al grup IR).

Per tal de recolzar la disminució de la hipertròfia observada en els grups tractats crònicament amb SNJ-1945, es van analitzar els canvis en els nivells de mRNA de diferents marcadors clàssics d'hipertròfia com la ràtio entre les isoformes  $\alpha$  i  $\beta$  de la cadena pesada de la miosina ( $\beta$ -MHC/  $\alpha$ -MHC) i els pèptids natriurètics ANP i BNP, així com els nivells proteics de  $\beta$ -MHC (Figura 24B-D). Tots aquests marcadors van augmentar en el grup IR, confirmant la transformació del miocardi cap a un fenotip hipertròfic durant la reperfusió. En concordança amb les dades histològiques, l'administració aguda de SNJ-1945 no va produir cap efecte significatiu sobre aquests marcadors. En canvi, l'administració crònica va reduir els nivells de proteïna de  $\beta$ -MHC ( $p = 0,035$ ) així com el ratio  $\beta$ -MHC/ $\alpha$ -MHC ( $p = 0,034$ ) i l'expressió de ANP ( $p = 0,020$ ) i BNP ( $p = 0,022$ ). La combinació de l'administració aguda i crònica de SNJ-1945 no va provocar una millora significativa respecte a l'administració únicament crònica, encara que sí es va observar una tendència cap a una major reducció en els nivells de tots els marcadors d'hipertròfia mesurats.



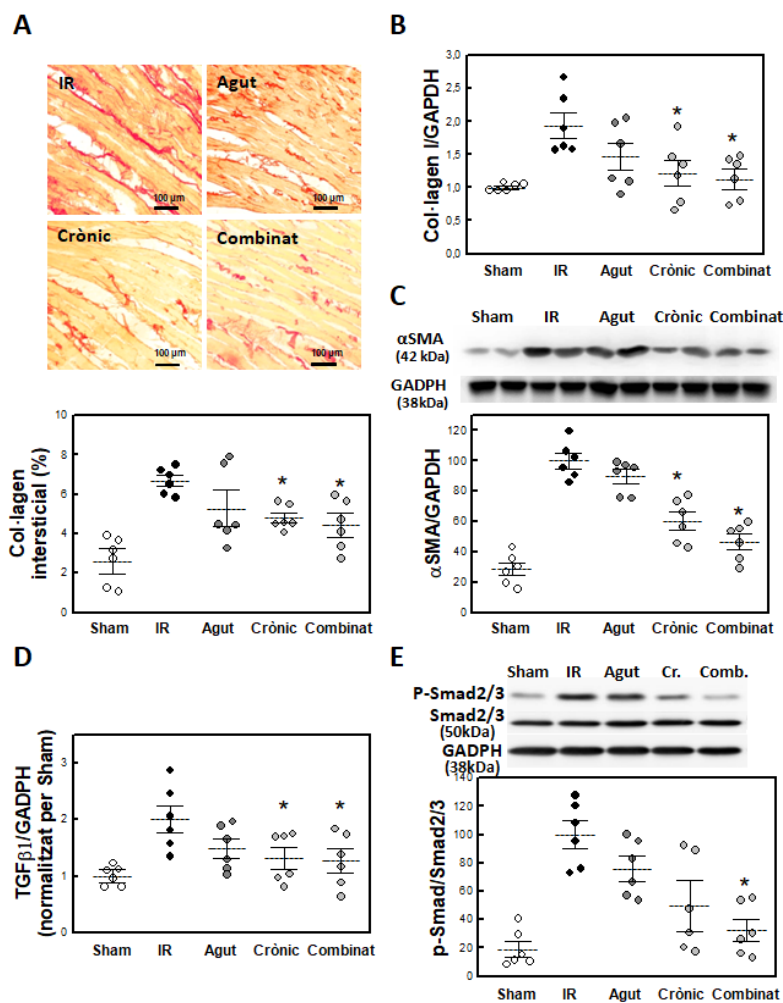
**Figura 24.** A) Imatges representatives de seccions transversals de la regió del ventricle no infartada i tenyides amb hematoxilina-eosina, i quantificació de l'àrea transversal dels cardiomiòcits (50 cèl·lules mesurades aleatòriament/cor, n= 6 cors per grup). B) Imatge representativa del western blot i anàlisi densitomètric de la proteïna  $\beta$ -MHC relativitzat per GAPDH (n=6 per grup). El panell inferior mostra l'anàlisi de la ràtio de mRNA de  $\beta$ -MHC/ $\alpha$ -MHC (n=6 per grup). C) Nivells de mRNA de ANP normalitzats per l'expressió de GAPDH i expressats respecte els nivells dels animals sham (n=6 per grup). D) Nivells de mRNA de BNP normalitzats per l'expressió de GAPDH i expressats respecte els nivells dels animals sham (n=6 per grup). Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  SEM. \*P<0.05 vs. grup IR.

#### 5.4.2.2) L'administració crònica però no aguda de SNJ-1945 limita la deposició de col·lagen intersticial al miocardi no infartat

Talls histològics dels mateixos miocardis no infartats es van tenyir amb picosirius red per tal de marcar les fibres de col·lagen dipositades a l'àrea intersticial. La quantificació de les imatges de microscopia preses van demostrar que l'infart de miocardi incrementa en tots els grups la presència de fibres de col·lagen en el miocardi no infartat respecte els animals sham (Figura 25A). L'administració crònica de SNJ-1945 va reduir la deposició de col·lagen, no així l'administració aguda del fàrmac (p=0,029 en el grup crònic i p=0,109 en el grup agut). La combinació dels protocols d'administració no va significar un increment de l'efecte reductor respecte els tractaments individuals (p=0,016).

L'expressió gènica del col·lagen I (Figura 25B) i l'expressió de la proteïna  $\alpha$ -SMA (Figura 25C), indicadors de l'activació dels fibroblasts, van confirmar el resultat obtingut per la tinció histològica. Tant l'expressió del mRNA de col·lagen I com de  $\alpha$ -SMA es van trobar elevades respecte el grup sham ( $p=0,003$  i  $p<0,001$  respectivament). L'administració crònica però no aguda de SNJ-1945 va atenuar l'increment respecte el grup IR ( $p=0,026$  grup crònic i  $p=0,008$  grup combinat per col·lagen I;  $p=0,008$  grup crònic i  $p=0,002$  grup combinat per  $\alpha$ -SMA).

Per últim, es va analitzar si l'inhibició de les calpaïnes amb SNJ-1945 inhibeix l'eix canònic d'activació dels fibroblasts TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 (Figura 25E). El TGF- $\beta$ 1 és considerat un mediador essencial en la fibrosi tissular, i la unió d'aquest al seu receptor provoca la fosforilació de Smad2/3, formant complexos amb Smad4 i translocant-se al nucli, on activen la transcripció de gens pro-fibròtics. L'expressió de mRNA de TGF- $\beta$ 1 i els nivells de fosforilació de Smad2/3 es van trobar clarament augmentats en el grup IR ( $p<0,001$ ). L'administració aguda de SNJ-1945 va produir una tendència a reduir l'expressió de TGF- $\beta$ 1 i la fosforilació de Smad2/3 respecte el grup IR ( $p=0,065$  i  $p=0,070$  respectivament) que va resultar significativa en els grups que van rebre el fàrmac de forma crònica ( $p=0,032$  grup crònic i  $p=0,024$  grup combinat per l'expressió de TGF- $\beta$ 1;  $p=0,046$  grup crònic i  $p=0,018$  grup combinat per la fosforilació de Smad2/3).



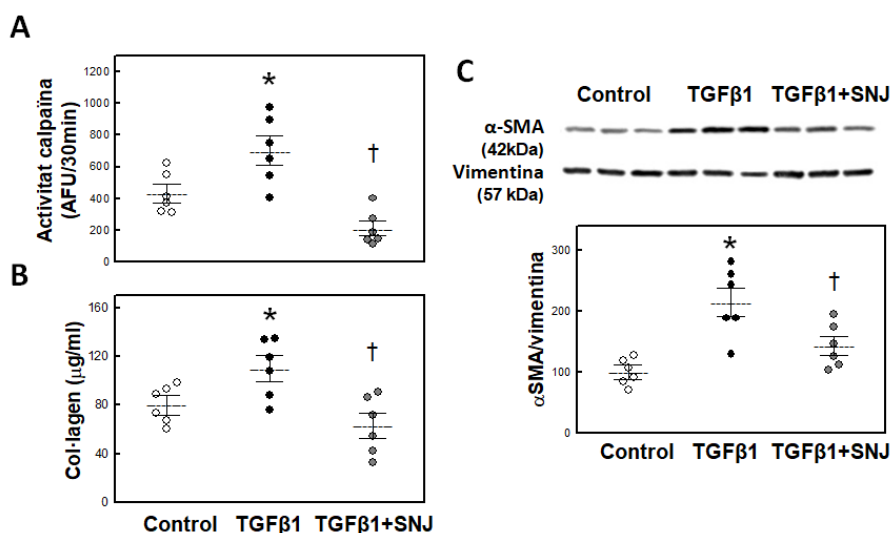
**Figura 25.** A) Imatges representatives de seccions transversals de la regió del ventricle no infartada i tenyides amb picrosirius red, i quantificació de la deposició de col·lagen intersticial (6 micrografies aleatòries/cor, n= 6 cors per grup). B) Nivells de mRNA de col·lagen I normalitzats per l'expressió de GAPDH i expressats respecte els nivells dels



animals sham (n=6 per grup). C) Imatge representativa del western blot i anàlisi densitomètric de la proteïna  $\alpha$ -SMA relativitzat per GAPDH i expressada en percentatge respecte el grup IR (n=6 per grup). D) Nivells de mRNA de TGF- $\beta$ 1 normalitzats per l'expressió de GAPDH i expressats respecte els nivells dels animals sham (n=6 per grup). E) Imatge representativa del western blot i anàlisi densitomètric de la proteïna total i fosforilada Smad2/3 normalitzats per l'expressió de GAPDH i expressats respecte els nivells dels animals IR (n=6 per grup). Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  SEM. \*P<0.05 vs. grup IR.

### 5.4.2.3) La inhibició de les calpaïnes redueix l'activació dels fibroblasts i la producció de col·lagen

Per discernir si l'efecte del tractament crònic amb SNJ-1945 observat en la fibrosi era degut a la inhibició directa de les calpaïnes en els fibroblasts o per un efecte paracrí dels cardiomiòcits, es van aïllar i cultivar fibroblasts de cors de rata, i la seva activació es va estimular amb l'addició de TGF- $\beta$ 1. L'estimulació amb TGF- $\beta$ 1 va provocar l'increment de l'activitat de les calpaïnes (Figura 26A) així com la síntesi de col·lagen (Figura 26B) i de  $\alpha$ -SMA (Figura 26C). En canvi, l'administració de SNJ-1945 als cultius tractats amb TGF- $\beta$ 1, va reduir significativament l'activació de les calpaïnes (p<0,001) així com la producció de col·lagen i  $\alpha$ -SMA (p=0,015 i 0,027 respectivament). Aquests resultats demostren que les calpaïnes poden provocar directament l'activació dels fibroblasts i producció de col·lagen.



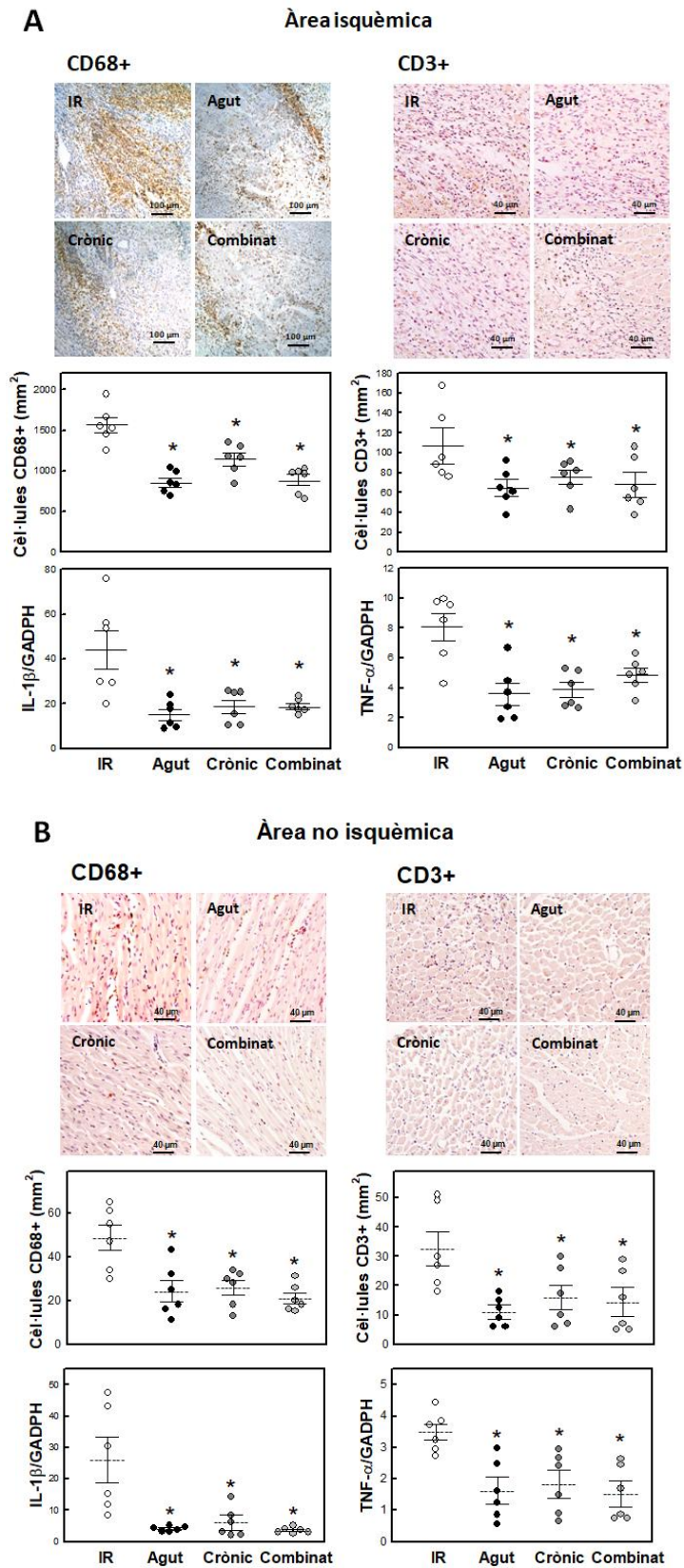
**Figura 26.** El SNJ-1945 redueix l'activació dels fibroblasts en cultiu estimulats per TGF- $\beta$ 1. A) Activitat de la calpaïna mesurada com unitats arbitràries de fluorescència generada pel trencament del pèptid substrat de la calpaïna t-BOC-Leu-Met-CMAC durant 30 minuts. B) Producció de col·lagen detectada amb el kit Chondrex Sirius Red. C) Imatge representativa del western blot i anàlisi densitomètric de la proteïna  $\alpha$ -SMA relativitzat per vimentina i expressada en percentatge respecte el grup control sense estimulació amb TGF- $\beta$ 1. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  SEM. \*P $\leq$ 0.05 vs. grup control. <sup>†</sup>P $\leq$ 0.05 vs. grup TGF- $\beta$ 1.

#### 5.4.2.4) La inhibició de les calpaïnes atenua la infiltració de cèl·lules inflamatòries en el miocardi isquèmic i remot

El possible efecte de la inhibició de calpaïnes sobre la resposta inflamatòria postinfart es va analitzar en un subgrup d'animals amb només 3 dies de reperfusió (n=6 per grup). En estudis previs s'ha demostrat que a aquest temps la infiltració de macròfags proinflamatoris és màxima<sup>300</sup>. La infiltració de cèl·lules inflamatòries CD68 positives (monòcits/macròfags) i CD3 positives (cèl·lules T) es va determinar tant en seccions de miocardi infartat com no infartat.

Els resultats mostren que la inhibició tant aguda com crònica de les calpaïnes redueix la infiltració de cèl·lules CD68<sup>+</sup> (p<0,001 grup agut i p=0,031 grup crònic) i cèl·lules CD3<sup>+</sup> (p=0,016 grup agut i p=0,022 grup crònic) en la zona isquèmica (Figura 27A), però també en la zona no isquèmica (p=0,009 grup agut i p=0,017 grup crònic per cèl·lules CD68<sup>+</sup>; p=0,011 grup agut i p=0,016 grup crònic per cèl·lules CD3<sup>+</sup>; Figura 27B). La combinació dels dos tractaments no va produir efectes additius.

Per confirmar els resultats, es van analitzar els nivells de mRNA dels marcadors proinflamatoris TNF- $\alpha$ , citosina que estimula la fase aguda de la inflamació, i IL-1 $\beta$ , citosina alliberada per macròfags i monòcits en resposta al TNF- $\alpha$ . Els dos marcadors es van veure significativament reduïts per la inhibició aguda (p=0,018 i p=0,023 respectivament) i crònica (p=0,013 i p=0,041) de les calpaïnes en el miocardi isquèmic, així com en el no isquèmic (p<0,001 i p=0,028 grup agut, p=0,026 i p=0,019 grup crònic). De nou, la combinació dels dos tractaments no va suposar una millora addicional respecte els tractaments individuals.

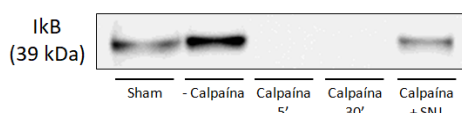


**Figura 27.** Infiltració de cèl·lules inflammatòries al miocardi A) infartat i B) no infartat. Imatges representatives de seccions transversals i immunotenyides contra CD68 i CD3, i quantificació cèl·lules CD68<sup>+</sup> i CD3<sup>+</sup> (6 micrografies aleatòries/cor, n=6 cors per grup). Els panells inferiors mostren els nivells de mRNA de IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  normalitzats per l'expressió de GAPDH (n=6 per grup). Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  SEM. \*P<0.05 vs. grup IR.

### 5.4.3) L'administració oral de SNJ-1945 atenua l'activació de NF-κB

Estudis previs demostren que l'activació del factor nuclear κB (NF-κB) està causalment associada al procés de remodelat cardíac. D'altra banda, s'ha suggerit que les calpaïnes poden degradar l'inhibidor del NF-κB (IκB), pas necessari perquè es produeixi la seva translocació i activació al nucli on produiria canvis en la transcripció de gens que afavoreixen la hipertròfia.

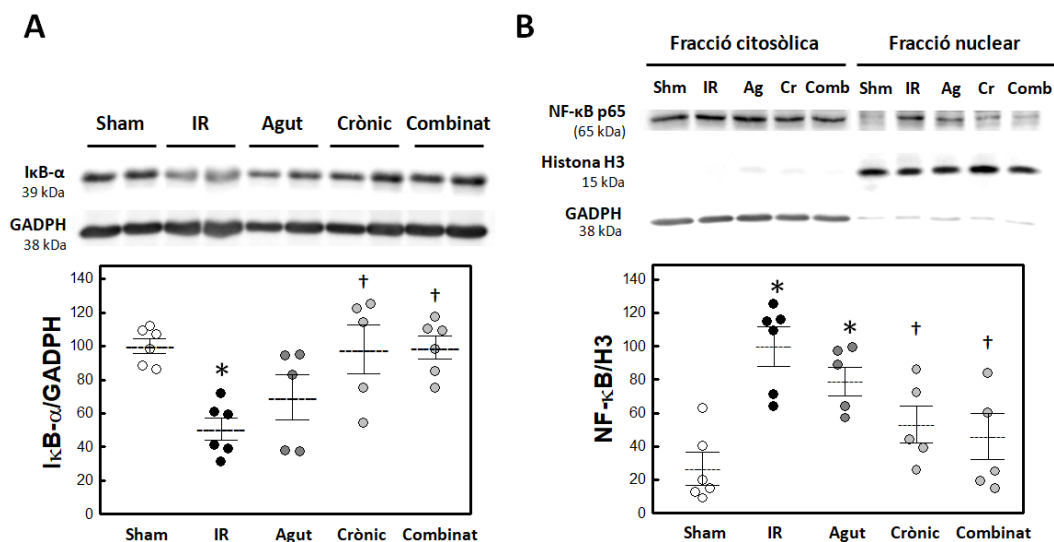
Per determinar si la contribució de les calpaïnes al procés de remodelat postinfart està mediat per l'activació de NF-κB, inicialment es va analitzar en un assaig *in vitro* la capacitat de la calpaïna per degradar l'inhibidor κB. Els resultats obtinguts van mostrar una ràpida i total degradació de IκB en mostres de miocardi exposades a calpaïna activada (Figura 28). A més, aquesta degradació va ser atenuada amb l'addició a les mostres de l'inhibidor SNJ-1945.



**Figura 28.** Extractes de miocardi de rata es van incubar amb calpaïna recombinant 1 amb o sense  $\text{Ca}^{2+}$  exogen i amb o sense inhibidor SNJ-1945, i es va analitzar el potencial de degradació mediat per calpaïna de IκB per western blot.

A continuació es van comprovar els nivells de IκB i de NF-κB per western blot en les mostres de rates sotmeses a isquèmia-reperfusió.

A la fracció citosòlica de les mostres de miocardi no infartat dels animals del grup IR es va observar una disminució significativa de IκB respecte als animals sham operats (49,5% de disminució,  $p=0,005$ ; Figura 29A). Aquesta disminució de IκB es va correlacionar amb l'increment de la subunitat p65 NF-κB a la fracció nuclear de les mostres (74% d'increment,  $p=0,001$ ; Figura 29B). L'administració crònica del SNJ-1945 però no l'aguda va reduir de forma significativa la degradació de IκB ( $p=0,006$  grup crònic i  $p=0,002$  grup combinat) i la conseqüent translocació de NF-κB al nucli ( $p=0,017$  crònic grup i  $p=0,012$  grup combinat) respecte el grup control.



**Figura 29.** Imatge representativa del western blot i anàlisi densitomètric de A) la proteïna citosòlica IκB relativitzada per GAPDH i B) la proteïna NF-κB p65 a la fracció citosòlica i nuclear i relativitzada per la histona H3. Les dades estan expressades en percentatge respecte el grup sham (A) i respecte el grup IR (B). Els resultats estan expressats com a mitjana ± SEM. \*P<0,05 vs. grup sham. †P<0,05 vs. grup IR (n=5-6 per grup).

## 5.5) PAPER DE LES CALPAÏNES EN EL REMODELAT INDUÏT PER ISOPROTERENOL

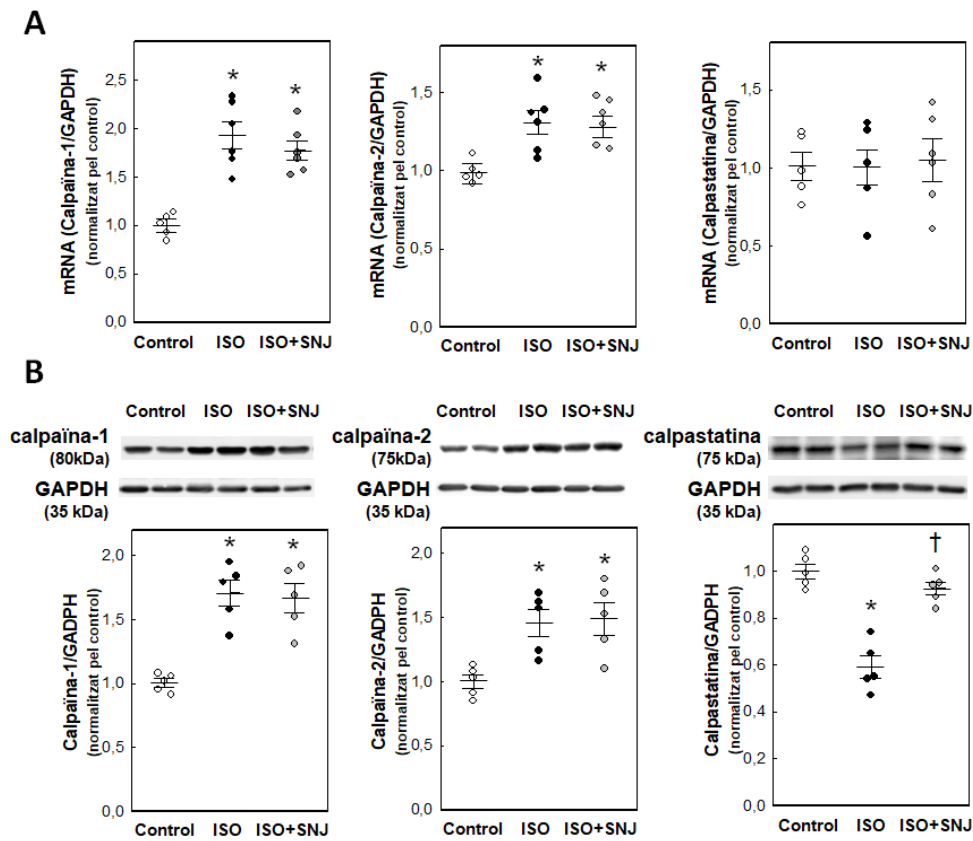
### 5.5.1) L'administració crònica d'isoproterenol induïx l'activació de les calpaïnes en rates

Després d'haver caracteritzat el paper de les calpaïnes en el remodelat ventricular postinfart, es va determinar la contribució de les calpaïnes al remodelat ventricular induït per estímuls crònics no isquèmics. El primer d'aquests models va ser un model de sobrecàrrega adrenèrgica i inicialment es va caracteritzar el patró d'expressió de les calpaïnes.

Entre les 20 rates administrades amb isoproterenol la mortalitat va ser del 15%, sense diferències en la ràtio de supervivència entre els grups experimentals. Tots els animals que van morir ho van fer poques hores després de l'administració de la primera dosi d'isoproterenol.

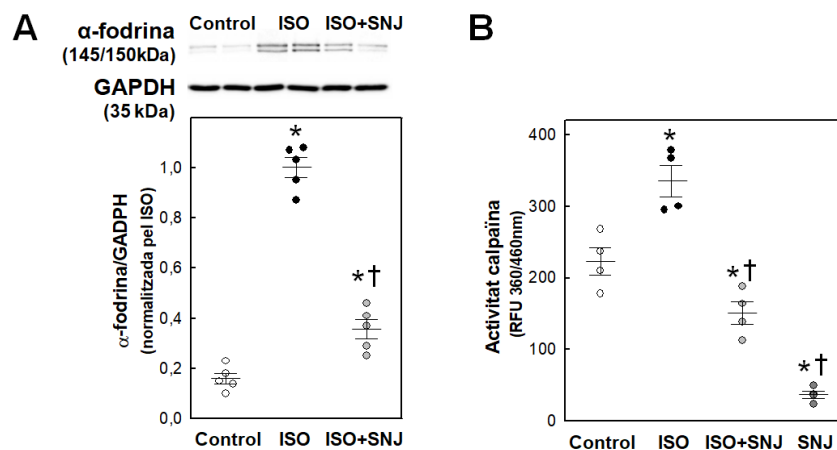
L'anàlisi dels nivells mRNA per RT-qPCR de les calpaïnes va mostrar un augment tant de la calpaïna 1 com la calpaïna 2 en les rates tractades de forma crònica amb isoproterenol respecte al seu grup control (p<0,001 i p=0,008 respectivament; Figura 30A) que va correlacionar amb un increment a nivell proteic de les dues isoformes (70% i 46% d'increment respecte el grup control; p<0,001 per la calpaïna 1 i p=0,018 per la calpaïna 2; Figura 30B). L'administració crònica i per via oral de SNJ-1945 no va produir cap efecte en els nivells d'expressió de les calpaïnes.

Els nivells de mRNA de calpastatina no van variar amb l'administració d'isoproterenol sent semblants en tots els grups. Els nivells de proteïna, però, en el grup administrat amb isoproterenol, es trobaven molt disminuïts, no sent així en el grup tractat amb SNJ-1945.



**Figura 30.** A) Nivells de mRNA de calpaïna 1, calpaïna 2 i calpastatina normalitzats per l'expressió de GAPDH i expressats respecte els nivells del grup control. B) Imatges representatives dels western blots i anàlisi densitomètric de les proteïnes calpaïna 1, calpaïna 2 i calpastatina normalitzats per GAPDH i expressats respecte els nivells del grup control. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  vs. grup control. † $P < 0.05$  vs. grup ISO (n=5-6 per grup).

La sobreexpressió de les calpaïnes i la disminució dels nivells de proteïna de calpastatina, substrat de les calpaïnes, és indicatiu d'activació de les calpaïnes. Confirmant l'activitat de les calpaïnes, la quantificació dels fragments de 145/150 kDa de  $\alpha$ -fodrina en homogenats de cor va mostrar que aquests es trobaven elevats respecte els homogenats del grup control (increment del 84%,  $p < 0,001$ ; Figura 31A). L'activitat màxima de la calpaïna també es va analitzar *in vitro*, mostrant de nou una activitat elevada en el grup tractat amb isoproterenol ( $p = 0,007$ , Figura 31B). En ambdós casos, l'administració oral de SNJ-1945 va atenuar tant l'activitat total de les calpaïnes mesurada *in vitro* com la degradació de  $\alpha$ -fodrina ( $p < 0,001$  respecte el grup ISO), confirmant l'eficàcia de la droga així com la via d'administració a l'hora de prevenir l'activació de les calpaïnes induïda per isoproterenol.



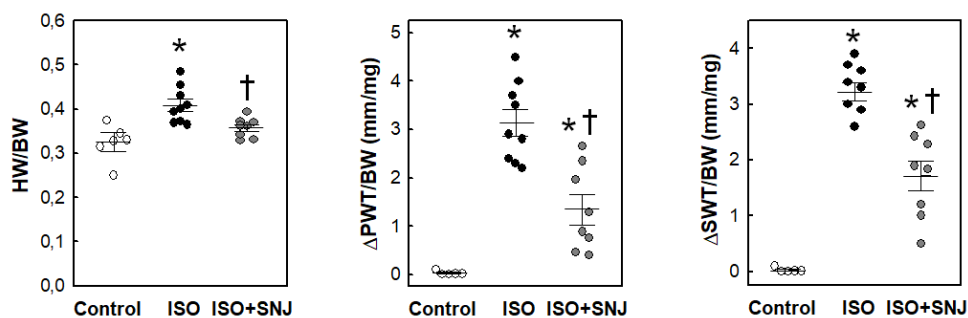
**Figura 31.** A) Imatge representativa del western blot i anàlisi densitomètric de les bandes dels fragments de α-fodrina relativitzat per GAPDH i expressat respecte el grup ISO. B) Activitat de la calpaina *in vitro* expressada com unitats relatives de fluorescència generada pel trencament del pèptid substrat de la calpaina Suc-LLVY-AMC durant 30 minuts en mostres de miocardi dels diferents grups. El grup SNJ són homogenats de cors controls als que es va afegir 10 μmol/L de SNJ-1945. Els resultats estan expressats com a mitjana ± SEM. \*P<0.05 vs. grup control. †P<0.05 vs. grup ISO (n=4-6 per grup).

### 5.5.2) L'administració oral i crònica de SNJ-1945 atenua el remodelat induït per isoproterenol en rates

#### 5.5.2.1) L'administració de SNJ-1945 limita la hipertròfia dels cardiomiòcits al miocardi

Després d'una setmana de tractament amb isoproterenol, la ràtio pes del cor respecte pes del cos de l'animal va augmentar en el grup tractat amb isoproterenol respecte al grup control (24% d'increment,  $p < 0,001$ ; Figura 32). Els resultats ecocardiogràfics van confirmar la hipertròfia del miocardi reflectida en un increment en el gruix tant del septe com de la paret del cor (68% i 62% d'increment respectivament; Figura 32).

En els animals tractats amb l'inhibidor SNJ-1945, els increments tant del pes del cor com de les parets es van atenuar de forma significativa ( $p = 0,02$  respecte el grup ISO per el pes del cor i  $p < 0,001$  respecte el grup ISO per les parets).



**Figura 32.** A) Cors d'animals des diferents grups experimentals es van analitzar per la ràtio pes cor/pes animal (HW/BW) i per l'increment del gruix del septe (ΔSWT) i la paret (ΔPWT). Els resultats estan expressats com a mitjana ± SEM. \*P<0.05 vs. grup control. †P<0.05 vs. grup ISO (n=4-6 per grup).

Com a conseqüència de l'augment de grandària de les parets, els volums sistòlics i diastòlics es van veure reduïts en els animals tractats amb isoproterenol, mentre que la reducció va ser més atenuada en el grup amb el SNJ-1945. La resta de paràmetres de funció cardíaca, així com la freqüència cardíaca no van mostrar diferències entre grups, suggerint una fase de desenvolupament d'hipertròfia encara compensatòria (Taula 3).

**Taula 3.** Pes i dades ecocardiogràfiques després d'una setmana de tractament amb isoproterenol

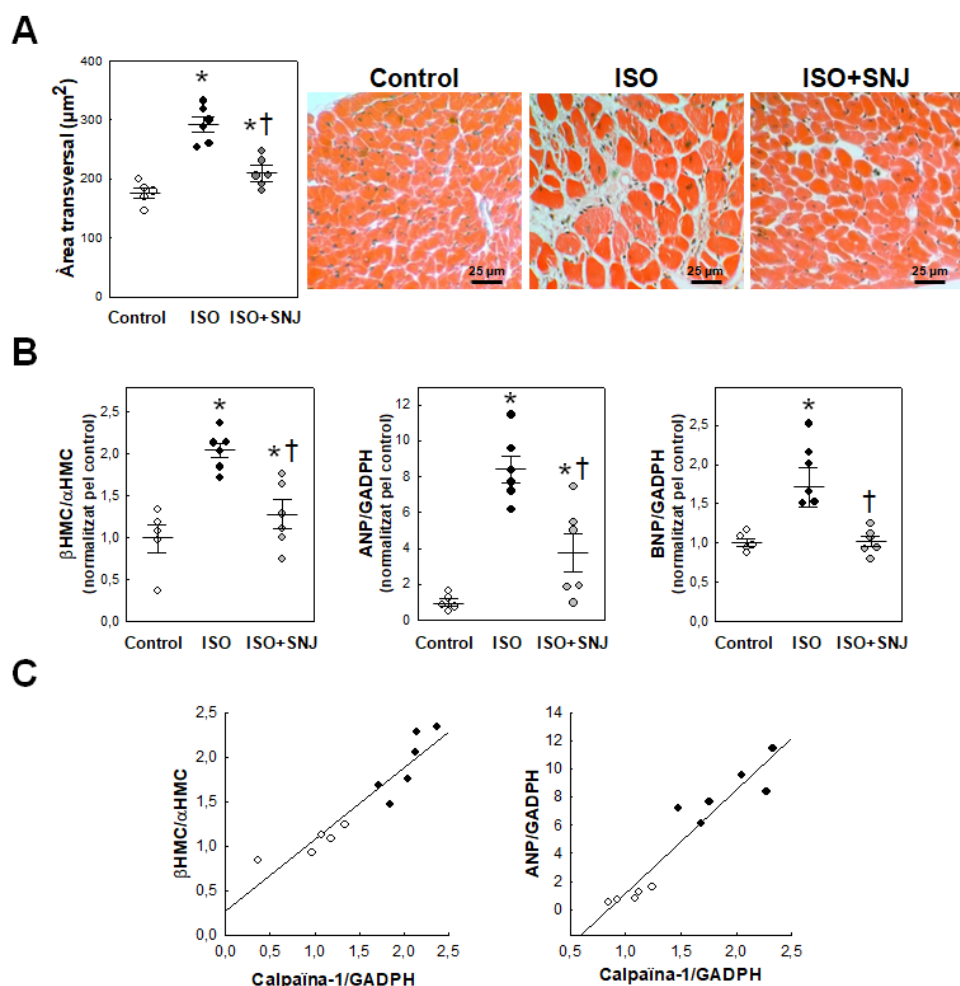
	Control (n=6)	ISO (n=9)	ISO+SNJ (n=8)
<b>BW (g)</b>	332±12,5	336,2±13,8	330,1±8,8
<b>HW (g)</b>	1,07±0,02	1,38±0,02*	1,18±0,04*†
<b>HW/BWx100</b>	0,33±0,02	0,41±0,01*	0,36±0,01†
<b>HR (bpm)</b>	342±17	362±12	348±9
<b>LVPWT (mm)</b>	1,81±0,12	2,78±0,12*	2,30±0,12*†
<b>SWT (mm)</b>	1,6±0,09	2,66±0,05*	2,17±0,15*†
<b>LVEDD (mm)</b>	7,29±0,16	6,01±0,17*	6,71±0,18*†
<b>LVEDS (mm)</b>	3,9±0,12	2,77±0,14*	3,47±0,24†
<b>FE (%)</b>	82,33±1,92	78,46±2,32	85,47±2,25

BW pes de l'animal, HW pes del cor, HR freqüència cardíaca, LVPWT gruix de la paret posterior del ventricle esquerre, SWT gruix del septe intraventricular, LVEDD diàmetre intern del ventricle esquerre al final de la sístole, LVEDS diàmetre intern del ventricle esquerre al final de la diàstole, FE fracció d'ejecció. Les dades estan expressades com mitjana ± SEM. \*P<0.05 vs. grup control. †P<0.05 vs. grup ISO (n=6-9 per grup).

La grandària dels cardiomiòcits mesurada en talls histològics tenyits amb hematoxilina-eosina, es va trobar augmentada en les rates tractades amb isoproterenol (66% d'increment, p<0,001; Figura 33A). De la mateixa manera que la resta de paràmetres, l'administració de SNJ-1945 va atenuar la hipertròfia de les cèl·lules.

Per confirmar que la inhibició de les calpaïnes redueix el fenotip hipertròfic induït per l'administració d'isoproterenol, es van mesurar per RT-qPCR diferents marcadors d'hipertròfia com la ràtio entre  $\beta$ -MHC/ $\alpha$ -MHC, ANP i BNP (Figura 33B). En tots tres, l'anàlisi va mostrar que la inhibició de les calpaïnes atenua l'increment observat en els nivells de mRNA després de l'administració d'isoproterenol. Aquests marcadors d'hipertròfia van mostrar una excel·lent correlació lineal amb els nivells de mRNA de calpaïna-1 ( $r^2= 0,88$ , p<0,001 per la ràtio  $\beta$ -MHC/ $\alpha$ -MHC;  $r^2= 0,89$ , p<0,001 per ANP; Figura 33C).



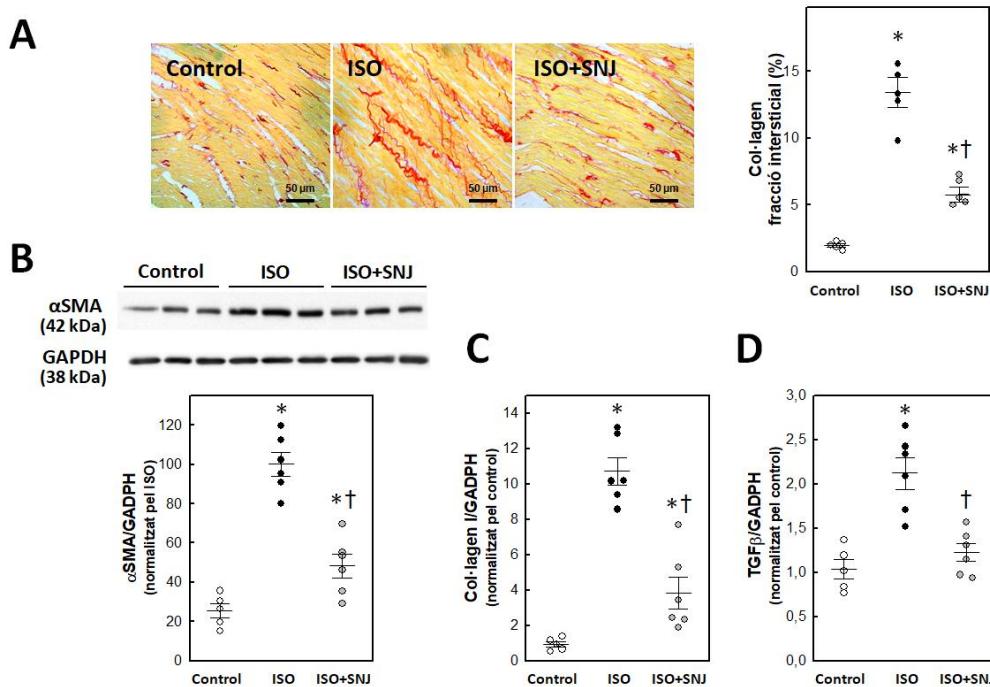


**Figura 33.** A) Imatges representatives de seccions transversals del ventricle i tenyides amb hematoxilina-eosina, i quantificació de l'àrea transversal dels cardiomiòcits (50 cèl·lules mesurades aleatòriament/cor, n= 5-6 cors per grup). B) Nivells de mRNA de la ràtio  $\beta$ -MHC/ $\alpha$ -MHC, ANP i BNP normalitzats per l'expressió de GAPDH i expressats respecte els nivells del grup control. C) Correlació lineal entre els nivells de mRNA de la calpaïna 1 i els marcadors de hipertrofia (mRNA de la ràtio  $\beta$ -MHC/ $\alpha$ -MHC i ANP), n=5-6 per grup. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  SEM. \*P<0.05 vs. grup control. †P<0.05 vs. grup ISO.

### 5.5.2.2) L'administració de SNJ-1945 limita la deposició de col·lagen intersticial al miocardi

La deposició de fibres de col·lagen intersticial es va mesurar en talls histològics tenyits amb picrosirius red. El tractament amb isoproterenol va incrementar la deposició de col·lagen respecte el grup control ( $1,95\% \pm 0,13$  vs.  $13,21\% \pm 0,99$ ,  $p < 0,001$ ), mentre que l'administració de SNJ-1945 va atenuar de forma significativa la fibrosi ( $5,95\% \pm 0,44$ ,  $p < 0,001$  respecte el grup ISO; Figura 34A).

La quantificació dels nivells de marcadors de fibrosi com la proteïna  $\alpha$ -SMA (Figura 34B) i la expressió gènica de col·lagen I i del TGF- $\beta$  (Figura 34 C i D) van confirmar el resultat obtingut en la tinció histològica. L'administració d'isoproterenol va elevar els nivells de tots els marcadors, i la inhibició de les calpaïnes va contrarestar aquest increment.



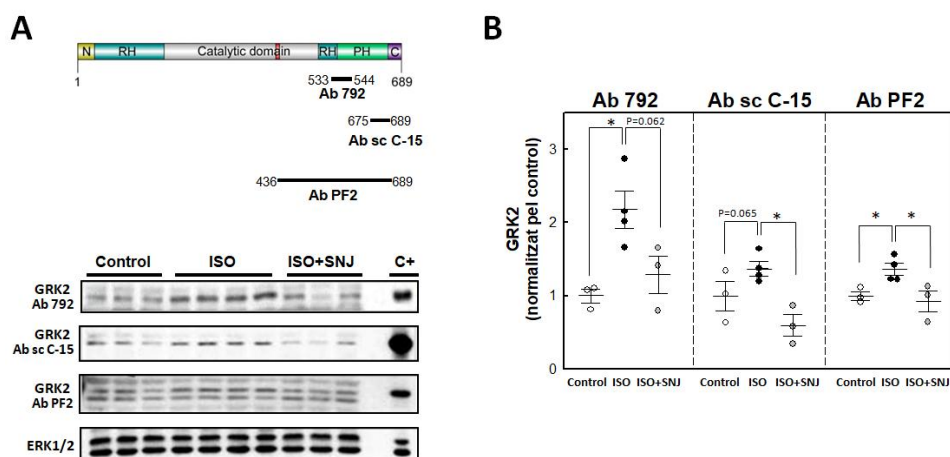
**Figura 34.** A) Imatges representatives de seccions transversals del ventricle i tenyides amb picrosirius red, i quantificació de l'àrea transversal dels cardiomiòcits (6 micrografies aleatòries/cor, n= 5-6 cors per grup). B) Imatges representatives del western blot i anàlisi densitomètric de la α-SMA normalitzat per GAPDH i expressat respecte els nivells del grup ISO. C-D) Nivells de mRNA del col·lagen I i TGF-β normalitzats per l'expressió de GAPDH i expressats respecte els nivells del grup control, n=5-6 per grup. Els resultats estan expressats com a mitjana ± SEM. \*P<0.05 vs. grup control. †P<0.05 vs. grup ISO.

### 5.5.3) La hipertròfia induïda per isoproterenol i dependent de calpaïna està mediada per GRK2

La isoforma 2 de la cinasa de receptors associats a proteïnes G (GRK2) té com a substrat la forma activa dels receptors β-adrenèrgics, i degut a que s'ha proposat que juga una paper rellevant en la hipertròfia cardíaca i que pot ser una diana terapèutica en el tractament de la insuficiència cardíaca<sup>301</sup>, el següent pas que es va dur a terme va ser analitzar si els efectes associats a la inhibició de les calpaïnes estan lligats a la regulació d'aquesta proteïna.

#### 5.5.3.1) La inhibició de les calpaïnes preveu l'increment dels nivells de GRK2 induït per isoproterenol

Per determinar els nivells proteics de GRK2 es van fer servir 3 anticossos diferents que reconeixien diferents regions de GRK2 (Figura 35A). Els 3 anticossos van mostrar que després de 7 dies de tractament amb isoproterenol, els nivells de GRK2 en el miocardi es trobaven elevats, increment que va ser previngut amb la inhibició crònica de les calpaïnes (Figura 35B).



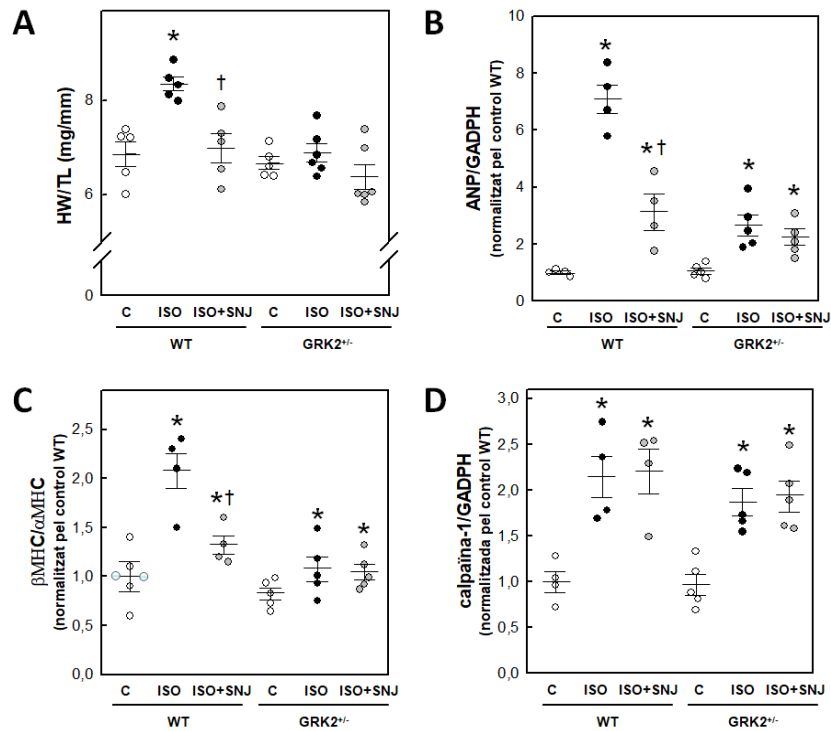
**Figura 35.** A) Esquema de la seqüència de GRK2 i de les regions reconegudes pels diferents anticossos utilitzats per detectar els nivells de GRK2 en les mostres de miocardi dels diferents grups experimentals. El grup C+ correspon a mostres enriquides en proteïna GRK2. Es mostren imatges representatives dels western blot. B) Anàlisi densitomètric de GRK2 relativitzat per ERK1/2 i expressat respecte els nivells del grup control. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  SEM. \*P<0,05 vs. grup ISO. N=3-4 per grup.

### 5.5.3.2) La deleció de GRK2 atenua la hipertròfia induïda per isoproterenol en ratolins

Donat que els resultats anterior suggerien que la sobreexpressió de GRK2 és conseqüència de l'activació de les calpaïnes causada per isoproterenol es van avaluar els efectes de l'administració d'isoproterenol i la inhibició de la calpaïna en un model de ratolí GRK2 hemizigot (GRK2<sup>+/-</sup>) prèviament caracteritzat<sup>302</sup>. Entre els 22 ratolins WT i GRK2<sup>+/-</sup> administrats amb isoproterenol, la mortalitat va ser nul·la.

Es van tornar a analitzar els mateixos paràmetres utilitzats en el model amb rates per comprovar si els ratolins GRK2<sup>+/-</sup> eren capaços de desenvolupar hipertròfia induïda per isoproterenol. En els ratolins WT es van confirmar els resultats obtinguts en rates. Així, l'administració crònica d'isoproterenol va incrementar la ràtio de pes del cor respecte la longitud de la tibia (Figura 36A), així com els nivells de mRNA de ANP i la ràtio de  $\beta$ -MHC/ $\alpha$ -MHC (Figura 36B-C), confirmant la hipertròfia miocardiaca. La calpaïna 1 també es va trobar sobreexpressada (Figura 36D), i la seva inhibició amb SNJ-1945 va reduir tots els paràmetres indicadors d'hipertròfia (Figura 36A-C).

La deleció del 50% de GRK2 en els ratolins GRK2<sup>+/-</sup>, va atenuar de forma molt pronunciada la hipertròfia miocardiaca induïda per isoproterenol ( $p=0,001$  per la ràtio HW/TL i  $p<0,001$  per ANP i la ràtio  $\beta$ -MHC/ $\alpha$ -MHC respecte el grup ISO WT; Figura 35). A més, la inhibició de les calpaïnes amb SNJ-1945 no va produir cap efecte additiu en els animals. Els nivells de calpaïna 1 però, es van mantenir elevats en els ratolins GRK2<sup>+/-</sup> tractats amb isoproterenol, donant suport a la idea que els efectes de GRK2 sobre la via molecular d'inducció de la hipertròfia es troben per sota l'activació de la calpaïna, i que aquest eix juga un paper rellevant en la hipertròfia induïda per isoproterenol.



**Figura 36.** A) Ràtio de pes del cor/longitud tíbia (HW/TL), nivells de mRNA de B) ANP i D) calpaïna 1 i C) ràtio mRNA  $\beta$ -MHC/mRNA  $\alpha$ -MHC en ratolins WT o GRK2 hemizigot (GRK2<sup>+/-</sup>) dels diferents grups experimentals. Els nivells de mRNA estan normalitzats per GAPDH i expressats respecte els nivells del grup control (WT). Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  SEM. \*P<0.05 vs. grup control. †P<0.05 vs. grup ISO. N=4-6 per grup.

### 5.5.3.3) L'activació de la calpaïna regula els nivells de GRK2

#### 5.5.3.3.1) L'activació de la calpaïna disminueix la degradació de GRK2

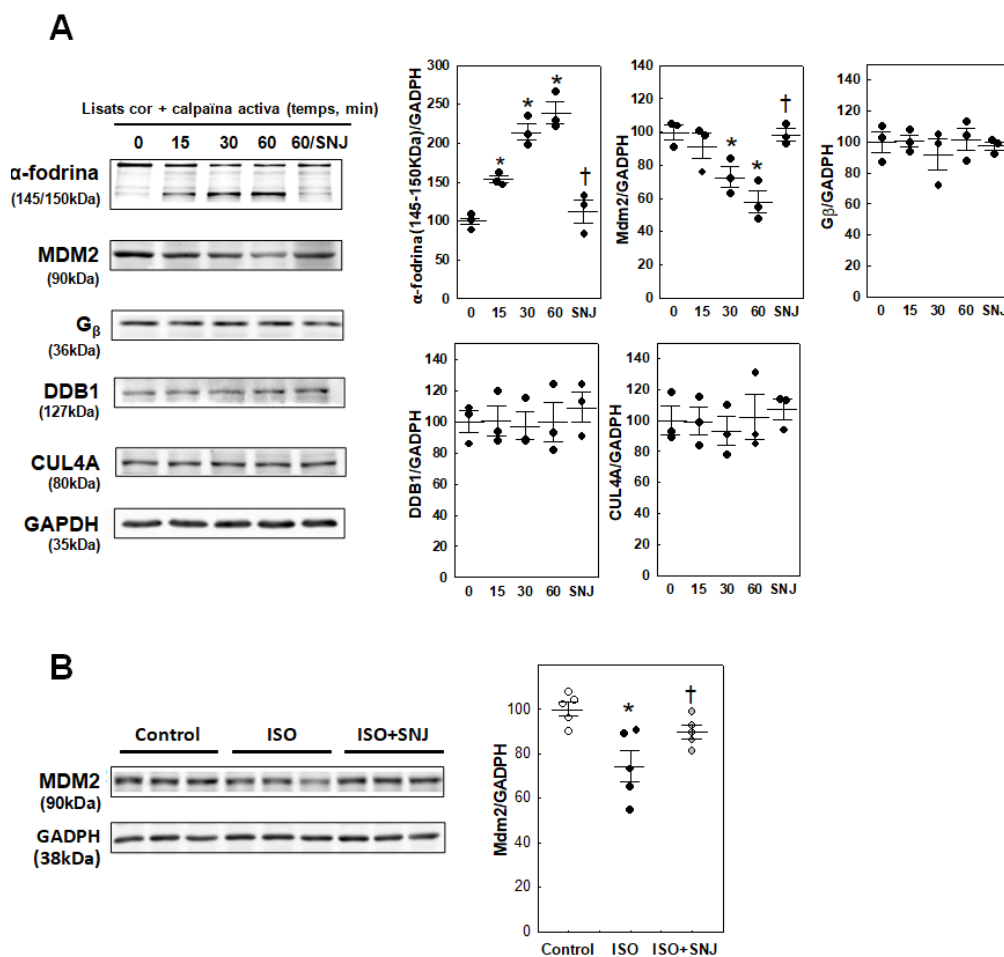
Sabent que els nivells de GRK2 es troben augmentats en el model d'isoproterenol de manera dependent a l'activació de les calpaïnes, es van analitzar els mecanismes a través dels quals les calpaïnes provoquen aquest increment. Una possible explicació és que les calpaïnes redueixin la seva degradació. S'ha descrit que la proteïna GRK2 és una proteïna que té una vida curta, i que es poliubiquitina ràpidament per degradar-se per la via del proteosoma<sup>303</sup>. Per això, es va analitzar *in vitro* la capacitat de la calpaïna per degradar diferents ligases E3 d'ubiquitina que s'ha proposat en estudis previs que poden tenir com a diana GRK2<sup>303,304</sup>. La potencial degradació d'aquestes ligases per la calpaïna afavoriria una estabilització de GRK2.

Es van analitzar extractes de miocardi de rates control, que es van incubar *in vitro* durant diferents temps amb calpaïna 1 exògena activada. Els resultats per western blot van mostrar una reducció significativa i progressiva en el temps dels nivells de la ubiquina ligasa MDM2 que és previnguda amb la co-incubació del SNJ-1945 (Figura 37A). Com a control positiu de l'activació de la calpaïna es va analitzar la  $\alpha$ -fodrina, que va seguir un patró de degradació molt semblant al de MDM2.

En contrast, la incubació dels extractes amb calpaïna no va induir canvis significatius en el contingut proteic de la subunitat  $\beta$  de la proteïna G (G $\beta$ ), CUL4A o DDB1, proteïnes que formen

un complex ubiquitina ligasa que també s'ha suggerit que podria tenir com a diana GRK2<sup>304</sup>(Figura 37A).

La reducció dels nivells proteics de MDM2 es va confirmar en mostres de miocardi de rates tractades amb isoproterenol (disminució del 25,6% respecte el grup control, p=0,002), però no en les rates que van rebre la coadministració de SNJ-1945 (p=0,042 respecte el grup ISO; Figura 36B).



**Figura 37.** A) Extractes de miocardi incubats amb calpaïna 1 recombinant amb o sense SNJ-1945 durant 0, 15, 30 o 60 minuts. Es va analitzar la capacitat de les calpaïnes de degradar MDM2, G $\beta$ , CUL4A o DDB1 per western blot (n=3 per grup). B) Nivells de MDM2 en extractes de miocardi dels diferents grups experimentals (n=5 per grup). En els dos panells es mostren imatges representatives dels western blot i l'anàlisi densitomètric de les bandes relativitzades per GAPDH i expressades respecte el grup control. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  SEM. \*P<0.05 vs. grup control. †P<0.05 vs. grup ISO/grup 60'.

Donat que la poliubiquitinació de MDM2 per la pròpia ligasa o per altres factors pot portar a incrementar el recanvi de MDM2<sup>305</sup>, es va analitzar també si l'activitat de la calpaïna podria modular l'estabilitat proteica de MDM2 d'una forma dependent d'ubiquitina.

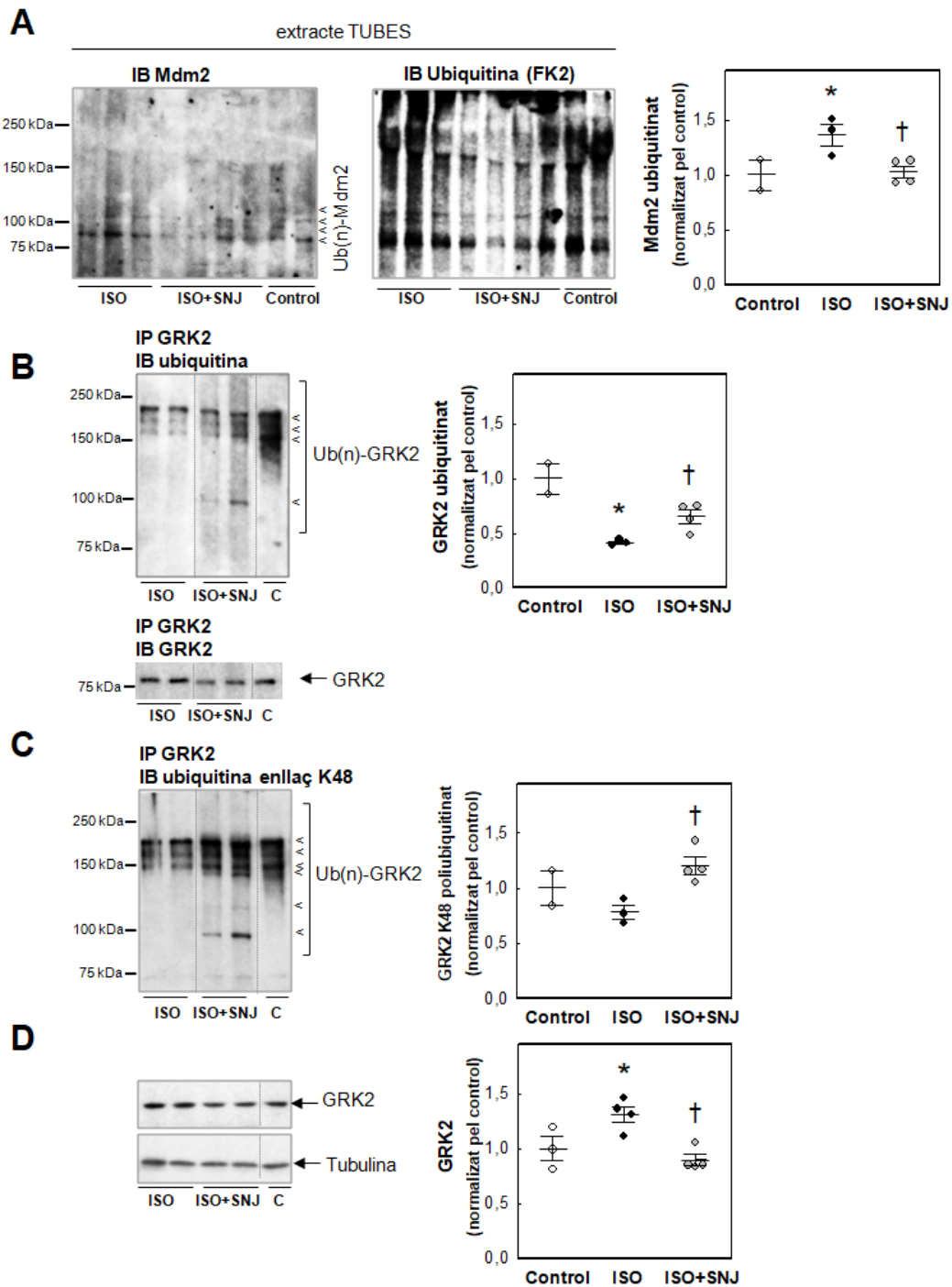
Totes les proteïnes poliubiquitinades de forma endògena van ser capturades i eluïdes d'extractes de mostres de miocardi de rata utilitzant *tandem ubiquitin binding entities (TUBEs)*. L'extracte de proteïnes ubiquitinades es va córrer per western blot i les membranes es van

incubar amb anticossos específics contra MDM2. Els resultats mostren un augment en l'ubiquitinació de MDM2 en les rates que van rebre l'isoproterenol (1,36 vegades superior als nivells del grup control,  $p=0,039$ ), mentre que la inhibició de les calpaïnes va prevenir aquest increment ( $p=0,028$  respecte el grup ISO; Figura 38A).

En conjunt els resultats indiquen que l'activació de les calpaïnes per l'administració d'isoproterenol reduiria els nivells de MDM2, bé per proteòlisi directa de les calpaïnes o bé de forma indirecta per proteòlisi de factors reguladors de MDM2 no identificats, que farien incrementar la seva ubiquitinació i posterior degradació pel proteosoma. En qualsevol de les opcions, la inhibició crònica oral de les calpaïnes evitaria aquesta disminució de MDM2.

Donat que el MDM2 és clau en la ubiquitinació de GRK2 per la seva degradació pel proteosoma, era d'esperar que una disminució d'aquesta ligasa comportés una disminució de l'estat de poliubiquitinació de GRK2. Per demostrar aquest punt es va immunoprecipitar la proteïna GRK2 d'extractes de miocardi de rates dels diferents grups experimentals, l'eluït es va córrer per western blot i les membranes es van incubar contra ubiquitina. De forma consistent amb els anteriors resultats, l'anàlisi mostra una disminució de GRK2 poliubiquitinat (observable en el patró de bandes en *smear* entre 120 i 200 kDa, que corresponen a diferents formes de GRK2 poliubiquitinat) en les mostres d'animals tractats amb isoproterenol respecte al grup control (disminució del 59%,  $p=0,002$ , figura 38B), i aquest efecte va ser atenuat per inhibició de les calpaïnes ( $p=0,043$  respecte el grup ISO).

Seguint el mateix procediment, també es van analitzar els nivells de GRK2 amb cadenes d'ubiquitina conjugades via enllaços lisina-K48 (figura 38C), que és la principal senyal d'ubiquitinació reconeguda pel proteosoma, així com el principal patró d'ubiquitinació derivat de l'acció de MDM2 sobre GRK2 al miocardi. Igual que en el cas anterior, l'isoproterenol redueix els nivells de GRK2 amb cadenes d'ubiquitina K48 respecte el grup control, mentre que en el cas del grup amb l'inhibidor SNJ-1945 els incrementa. Aquest increment es produeix tant en formes de GRK2 amb cadenes d'ubiquitina K48 d'alt pes (sobre 150 kDa) com amb cadenes de només 2-3 residus d'ubiquitina (sobre els 100 kDa). Tot i que els nivells globals entre el grup control i SNJ-1945 són semblants, en aquest últim el patró de cadenes d'ubiquitina conjugades via enllaços lisina-K48 mostra més formes de cadenes d'ubiquitina amb pocs residus (semblants a les detectades amb l'anticòs de la figura 38B), que poden ser degradades de forma menys eficient pel proteosoma. En conjunt, els resultats suggereixen que l'increment dels nivells de GRK2 induïts pel tractament amb isoproterenol són deguts a una degradació defectuosa al proteosoma per la via de MDM2-ubiquitina.



**Figura 38.** A) Nivells de poliubiquitinació de MDM2 en extractes de miocardi dels diferents grups experimentals. Anàlisi densitomètric de les bandes de MDM2, normalitzades per la ubiquitina total i expressades respecte el grup control. B) Anàlisi dels nivells de GRK2 poliubiquitinat o dels nivells de C) GRK2 amb cadenes d'ubiquitina conjugades via enllaços lisina-K48, normalitzats pels nivells de GRK2 totals i expressats respecte el grup control. D) Els nivells de GRK2 poliubiquitinats correlacionen de forma inversa amb els nivells totals de GRK2, normalitzats per la tubulina com a control de càrrega. Els resultats estan expressats com a mitjana ± SEM. \*P<0.05 vs. grup control. †P<0.05 vs. grup ISO. N=2-4 per grup.

### 5.5.3.3.2) L'activació de la calpaïna incrementa l'expressió de GRK2

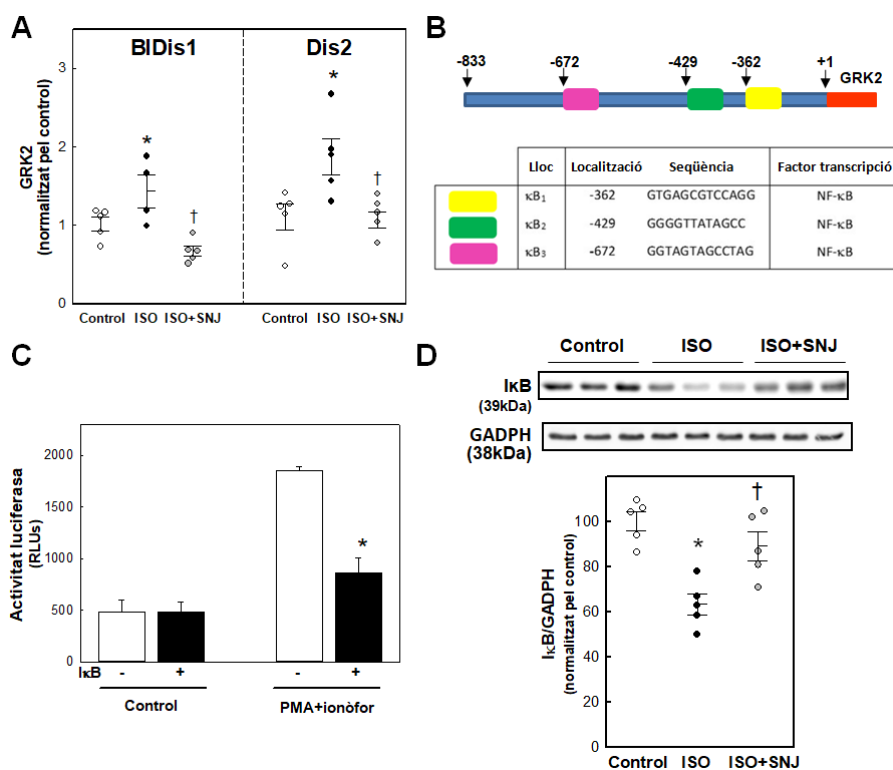
Un altre mecanisme pel qual l'activació de la calpaïna podria augmentar els nivells de proteïna de GRK2 és modulant la seva transcripció, de manera que es van analitzar els nivells de mRNA de GRK2 utilitzant dos *primers* diferents (Figura 39A). Els dos primers van mostrar un increment dels nivells d'expressió de GRK2 amb el tractament amb isoproterenol i la coadministració de l'inhibidor de les calpaïnes va prevenir aquest efecte.

Buscant un potencial mecanisme que expliqués l'increment en els nivells de mRNA de GRK2, es va observar que la regió flanquejant 5' del promotor humà del gen GRK2 contenia seqüències consens de resposta al factor de transcripció NF- $\kappa$ B (Figura 39B). Els resultats obtinguts prèviament ja han demostrat que NF- $\kappa$ B participa en la hipertròfia derivada de la isquèmia-reperfusió i que la calpaïna pot activar-lo per degradació del I $\kappa$ B. A més, estudis previs també han descrit que NF- $\kappa$ B es troba relacionat amb la hipertròfia induïda per isoproterenol<sup>256</sup> i que regula la transcripció de GRK5 en miòcits<sup>306</sup>.

Per tal d'estudiar l'activitat transcripcional del promotor de GRK2 a través de la via de NF- $\kappa$ B i en col·laboració amb el grup del doctor Federico Mayor (*Departamento de Biología Molecular y Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa"*; UAM-CSIC), es va expressar un vector que contenia el gen reporter luciferasa sota el promotor de GRK2 en limfòcits de sang perifèrica humana. El tractament de les cèl·lules amb una combinació d'estímuls que desencadenen l'estimulació de NF- $\kappa$ B van donar lloc a una marcada inducció en l'activitat del promotor de GRK2, que va ser inhibida amb la co-transfecció del gen I $\kappa$ B $\alpha$  (Figura 39C). Els resultats indiquen, doncs, que la transcripció de GRK2 estaria regulada per la cascada de NF- $\kappa$ B.

Extractes de miocardi de les rates tractades amb isoproterenol van mostrar una disminució dels nivells de I $\kappa$ B (disminució del 32%,  $p < 0,001$ ; Figura 39D), mentre que l'administració de SNJ-1945 va atenuar aquesta disminució ( $p = 0,004$  respecte el grup ISO). Els dos resultats indiquen una relació funcional entre l'activitat de NF- $\kappa$ B i l'expressió de GRK2 en aquest context.





**Figura 39.** A) Nivells de mRNA de GRK2 utilitzant dos primers diferents normalitzats per l'expressió de GAPDH i expressats respecte els nivells dels animals control (n=5 per grup). B) Esquema de la regió flanquejant 5' del promotor humà de GRK2. S'indiquen les seqüències de resposta al factor NF-κB i la seva posició relativa amb caixes. C) Limfòcits de sang perifèrica humana co-transfectats amb un vector amb el gen luciferasa sota el promotor pGRK2-0,9 i amb un vector buit o un vector d'expressió de la proteïna IκB. Les cèl·lules transfectades es van tractar amb PMA i el ionòfor de Ca<sup>2+</sup> A23187. L'activitat de la luciferasa està expressada com unitats relatives de fluorescència (cèl·lules obtingudes de 3 donants diferents). D) Imatges representatives del western blot i anàlisi densitomètric de les bandes de IκB en extractes de miocardi dels diferents grups experimentals. Les dades estan relativitzades per GAPDH i expressades respecte al grup control (n=5 per grup). Els resultats estan expressats com a mitjana ± SEM. \*P<0.05 vs. grup control. †P<0.05 vs. grup ISO.

## 5.6) CONTRIBUCIÓ DE LES CALPAÏNES EN EL REMODELAT INDUÏT PER ANGIOTENSINA II

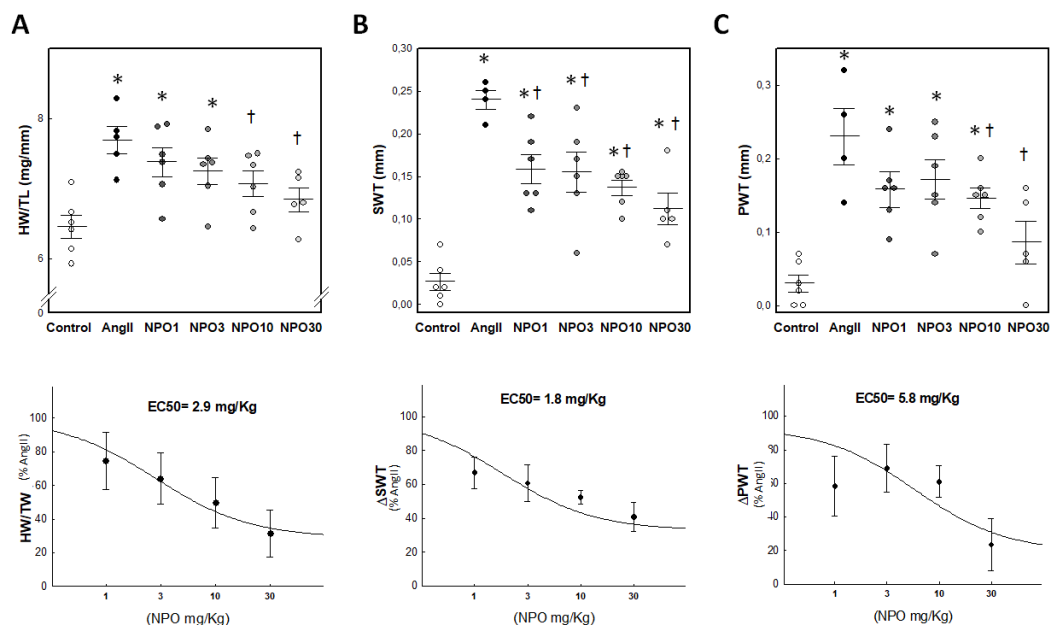
### 5.6.1) L'administració oral i crònica de NPO-2270 atenua el remodelat induït per angiotensina II

La infusió d'angiotensina II de manera crònica amb bombes osmòtiques subcutànies és un model clàssic per induir remodelat cardíac en animals que reproduïx l'estimulació del sistema RAS que s'observa en pacients amb IC.

Dels 36 ratolins als quals se'ls hi va implantar bombes subcutànies, únicament van morir un animal del grup control i un animal del grup NPO30 (5,5% de mortalitat).

La infusió d'angiotensina II durant 2 setmanes va provocar un increment del pes del cor corregit per la longitud de la tibia passades 2 setmanes (increment del 19%, p=0,001). La coadministració oral de NPO-2270 va reduir de forma dosi-dependent la hipertròfia induïda per l'angiotensina (Figura 40A) sent aquesta estadísticament significativa en les concentracions de 10 i 30 mg/kg (p=0,03 i p<0,01 respectivament).

L'anàlisi ecocardiogràfic (Taula 4) als 14 dies va confirmar la hipertròfia mostrant un increment en el gruix del septe i la paret del ventricle esquerre. L'administració del NPO-2270 va atenuar de forma dosi dependent els increments després de 14 dies de tractament (Figura 40B i C) sent la disminució estadísticament significativa a partir de la concentració de 3mg/kg i 10 mg/kg respectivament per cada variable ( $p<0,001$  i  $p=0,002$ ). Els ratolins no van presentar dilatació ni disfunció ventricular com a conseqüència del tractament d'angiotensina II, indicant que la hipertròfia desenvolupada és concèntrica. La EC50 pel NPO-2270 estimada a partir dels percentatges de disminució de HW/TL i de l'atenuació en l'increment del septe i la paret van oscil·lar entre 1,8-5,8 mg/kg.



**Figura 40.** A) Cors d'animals des diferents grups experimentals es van analitzar per la ràtio pes cor/longitud de la tibia (HW/TL) i per l'increment del gruix B) del septe ( $\Delta$ SWT) i C) la paret ( $\Delta$ PWT). EC50 calculada a partir de la quantificació relativa de cada paràmetre. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  SEM respecte els nivells del grup AngII. \* $P\leq 0,05$  vs. grup control.  $\dagger P\leq 0,05$  vs. grup AngII. N=5-6 per grup.

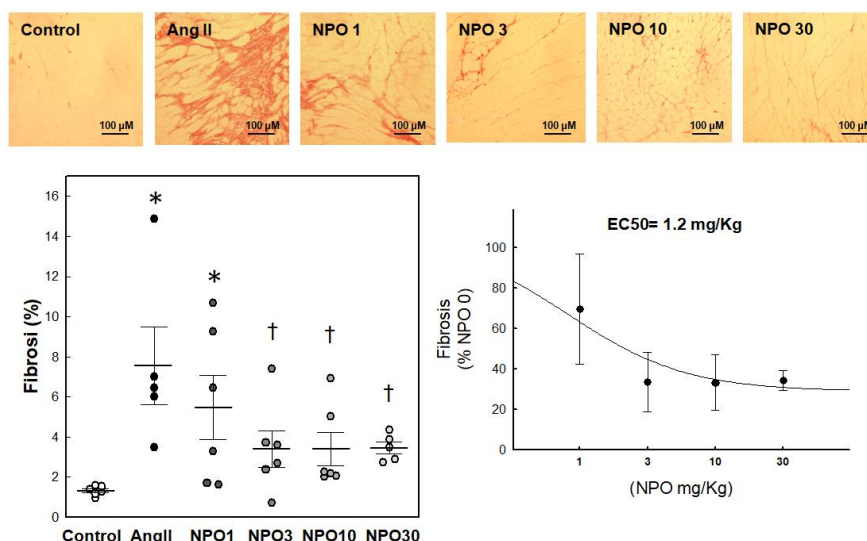
**Taula 4.** Pes i dades ecocardiogràfiques després de dos setmanes de tractament amb angiotensina II

	Sham (n=6)	AngII (n=5)	NPO 1 (n=6)	NPO 3 (n=6)	NPO 10 (n=6)	NPO 30 (n=5)
<b>BW (g)</b>	28,2 $\pm$ 0,5	27,3 $\pm$ 1,2	28,1 $\pm$ 0,9	28,3 $\pm$ 0,7	27,9 $\pm$ 0,7	27,7 $\pm$ 0,6
<b>HW (mg)</b>	113,9 $\pm$ 3,1	129,5 $\pm$ 5,4	128,0 $\pm$ 3,8	126,3 $\pm$ 2,7	123,5 $\pm$ 3,2	118,5 $\pm$ 3,3
<b>HW/TL (mg/mm)</b>	6,45 $\pm$ 0,16	7,69 $\pm$ 0,19 *	7,37 $\pm$ 0,2 *	7,24 $\pm$ 0,2 *	7,06 $\pm$ 0,18 * <sup>S</sup>	6,84 $\pm$ 0,17 <sup>S</sup>
<b>HR (beats/min)</b>	446 $\pm$ 16	457 $\pm$ 32	468 $\pm$ 2	416 $\pm$ 30	471 $\pm$ 27	435 $\pm$ 19
<b>LVPWT (mm)</b>	0,66 $\pm$ 0,01	0,87 $\pm$ 0,01 *	0,82 $\pm$ 0,02 *	0,81 $\pm$ 0,03*	0,78 $\pm$ 0,01 * <sup>S</sup>	0,75 $\pm$ 0,01 * <sup>S</sup>
<b>SWT (mm)</b>	0,79 $\pm$ 0,01	0,95 $\pm$ 0,01 *	0,92 $\pm$ 0,03 *	0,87 $\pm$ 0,02* <sup>S</sup>	0,85 $\pm$ 0,02 * <sup>S</sup>	0,84 $\pm$ 0,02 * <sup>S</sup>
<b>LVEDD (mm)</b>	4,03 $\pm$ 0,13	3,64 $\pm$ 0,09 *	3,75 $\pm$ 0,13	3,95 $\pm$ 0,11	3,79 $\pm$ 0,12	3,81 $\pm$ 0,06
<b>LVEDS (mm)</b>	2,89 $\pm$ 0,15	2,47 $\pm$ 0,09 *	2,69 $\pm$ 0,11	2,82 $\pm$ 0,10	2,61 $\pm$ 0,11	2,69 $\pm$ 0,05
<b>FE (%)</b>	61,8 $\pm$ 2,2	62,0 $\pm$ 3,0	61,3 $\pm$ 2,3	61,8 $\pm$ 2,20	60,83 $\pm$ 1,40	61 $\pm$ 2,1

BW pes de l'animal, HW pes del cor, HW/TL ràtio pes cor/longitud de la tibia, HR freqüència cardíaca, LVEDS diàmetre intern del ventricle esquerre al final de la sistole, LVEDD diàmetre intern del ventricle esquerre al final de la diàstole, LVPWT gruix de la paret posterior del ventricle esquerre, SWT gruix del septe intraventricular, FE fracció d'ejecció. Les dades estan expressades com mitjana  $\pm$  SEM. \* $P<0,05$  vs. grup Sham. <sup>S</sup> $P<0,05$  vs. grup AngII (n=5-6 per grup).

### 5.6.1.1) L'administració crònica de NPO-2270 limita la deposició de col·lagen intersticial al miocardi

La tinció amb picosirius red de talls histològics dels diferents grups experimentals va mostrar un marcat augment de la deposició de col·lagen intersticial en el miocardi respecte el grup control ( $1,31 \pm 0,10\%$  grup control vs.  $7,55 \pm 1,93\%$  grup AngII,  $p < 0,001$ ; Figura 41). L'administració de NPO-2270 va produir una reducció dosi dependent de la fibrosi, assolint la significació estadística a la concentració de 3 mg/kg ( $p = 0,02$ ). La reducció màxima de la fibrosi es va aconseguir amb la dosi de 30 mg/kg i va ser del 65% respecte el grup AngII ( $p < 0,001$ ). La EC50 pel NPO-2270 calculada a partir de l'atenuació en l'increment de fibrosi durant els 14 dies de tractament va ser de 1,2mg/kg.



**Figura 41.** L'administració oral del NPO-2270 redueix la fibrosi induïda per angiotensina II. Imatges representatives de seccions transversals del ventricle i tenyides amb picosirius red, i quantificació de la deposició de col·lagen intersticial (6 micrografies aleatòries/cor, n=5-6 cors per grup). Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  SEM. \* $P \leq 0,05$  vs. grup control. † $P \leq 0,05$  vs. grup AngII.

## 5.7) CONTRIBUCIÓ DE LES CALPAÏNES EN EL REMODELAT INDUÏT PER CONSTRICCIÓ AÒRTICA TRANSVERSAL

### 5.7.1) L'administració oral, crònica i retardada de NPO-2270 atenua el remodelat induït per constricció aòrtica transversal

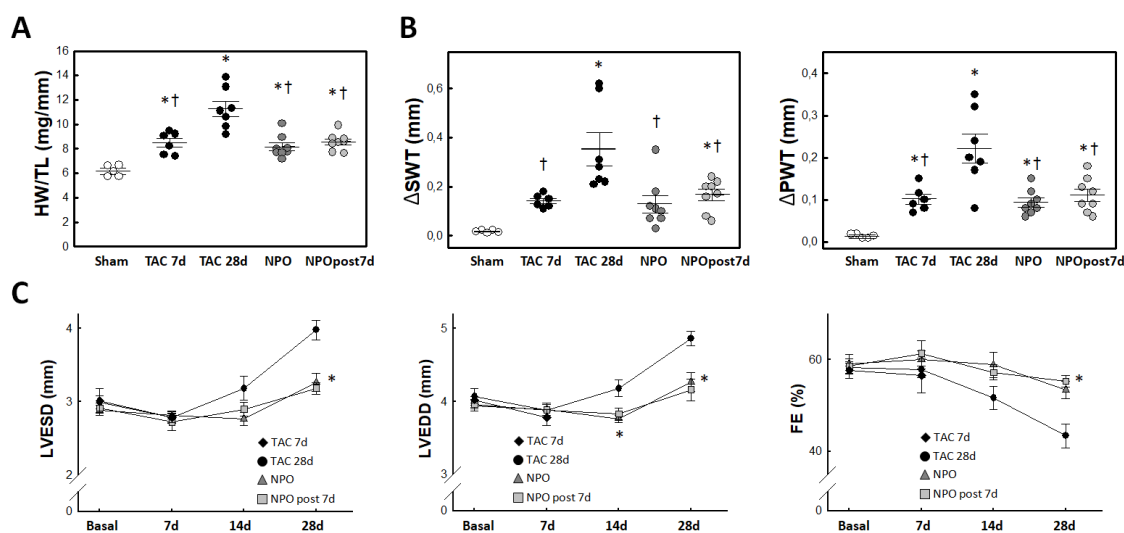
El model de constricció de l'aòrtica transversa és un model de sobrecàrrega de pressió que està caracteritzat per una fase inicial compensatòria on es produeix una hipertròfia concèntrica del ventricle esquerre seguida d'un allargament de les cambres cardíques associat amb un deteriorament de la funció del ventricle.

Entre els ratolins sotmesos a la cirurgia de constricció aòrtica, la mortalitat va ser d'un 23,7% sense diferències entre els diferents grups experimentals (4 ratolins van morir durant la cirurgia o immediatament després i 5 ratolins van morir entre 48 hores i 6 dies després de la cirurgia).

La constricció de l'aorta va provocar un augment progressiu del pes del cor corregit per la longitud de la tibia que va ser del 37% a la primera setmana ( $p=0,008$ ) i va arribar al 82% al cap de 4 setmanes ( $p<0,001$ ; Figura 42A), i va anar acompanyat d'un increment del gruix del septe i la paret del ventricle esquerre (Figura 42B). Les dades ecocardiogràfiques (Taula 5) seriadades mostren un augment dels diàmetres finals sistòlic i diastòlic així com un deteriorament de la funció ventricular a partir de la segona setmana d'oclusió (Figura 42C).

L'administració oral de NPO-2270 a una dosi de 10 mg/kg durant els 28 dies d'estenosis aòrtica va reduir de forma significativa la hipertròfia desenvolupada a les 4 setmanes ( $p<0,001$  pel pes del miocardi;  $p=0,003$  per l'increment del septe;  $p=0,001$  per l'increment de la paret posterior del ventricle esquerre; Figura 42). Aquest efecte va anar associat amb la prevenció de la dilatació del ventricle ( $p=0,001$  per LVESD i  $p=0,012$  per LVEDD) i de la disfunció ventricular ( $p=0,004$ ; Figura 43).

Per determinar si l'administració de NPO-2270 a més d'atenuar la seva progressió pot revertir el procés de remodelat, un grup addicional d'animals va rebre l'inhibidor 7 dies després de la constricció de l'aorta. Els resultats obtinguts en aquest grup mostren que tant el pes del miocardi com el gruix del septe i de la paret a les 4 setmanes (Figura 42A-B), així com els diàmetres del ventricle i la funció contràctil (Figura 42C) són similars als valors obtinguts en el grup sense tractament mesurats als 7 dies, indicant que l'administració de NPO-2270 preveu però no reverteix el desenvolupament d'hipertròfia. Si bé globalment es va observar una tendència a una major reducció de la hipertròfia en el grup que va rebre NPO-2270 durant les 4 setmanes respecte al grup tractat més tardanament, les diferències no van ser significatives.



**Figura 42.** A) Cors d'animals dels diferents grups experimentals es van analitzar per la ràtio pes cor/longitud de la tibia (HW/TL) i per l'increment del gruix B) del septe ( $\Delta$ SWT) i la paret ( $\Delta$ PWT). C) Evolució temporal dels diàmetres interns del ventricle esquerre al final de la sistole (LVESD) i de la diàstole (LVEDD), i de la fracció d'ejecció (FE). Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  SEM. \* $P\leq 0,05$  vs. grup sham.  $^\dagger P\leq 0,05$  vs. grup TAC28d. N=5-8 per grup.

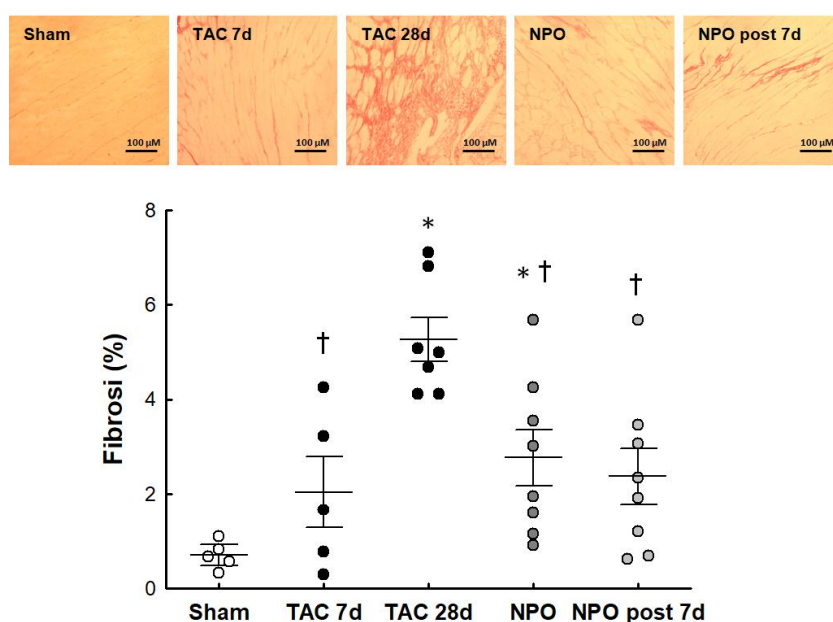
**Taula 5.** Pes i dades ecocardiogràfiques després d'una (grup TAC 7 d) o quatre setmanes de constricció aòrtica.

	Sham (n=5)	TAC 7d (n=6)	TAC 28d (n=7)	NPO (n=8)	NPO post 7d (n=8)
<b>BW (g)</b>	27,3±0,7	27,3±0,7	28,5±0,4	26,9±0,8	27,6±0,5
<b>HW (mg)</b>	110,85±4,7	151,16±6,07 * <sup>§</sup>	199±10,69 *	145,87±6,9 * <sup>§</sup>	151,06±4,58 * <sup>§</sup>
<b>HW/TL (mg/mm)</b>	6,18±0,26	8,49±0,36 * <sup>§</sup>	11,27±0,64 *	8,16±0,32 * <sup>§</sup>	8,56±0,25 * <sup>§</sup>
<b>HR (beats/min)</b>	466±24	475±13	485±14	435±26	451±19
<b>LVPWT (mm)</b>	0,64±0,01	0,72±0,01 * <sup>§</sup>	0,86±0,04 *	0,74±0,01 * <sup>§</sup>	0,76±0,01 * <sup>§</sup>
<b>SWT (mm)</b>	0,75±0,01	0,88±0,02 * <sup>§</sup>	1,10±0,06 *	0,87±0,03 * <sup>§</sup>	0,91±0,02 * <sup>§</sup>
<b>LVEDD (mm)</b>	4,06±0,11	4,37±0,10	4,86±0,1 *	4,27±0,13 <sup>§</sup>	4,16±0,15 <sup>§</sup>
<b>LVEDS (mm)</b>	2,99±0,09	3,28±0,06 <sup>§</sup>	3,98±0,13 *	3,27±0,12 <sup>§</sup>	3,18±0,08 <sup>§</sup>
<b>FE (%)</b>	58,29±1,38	56,6±3,8 <sup>§</sup>	43,38±2,55 *	53,42±1,88 <sup>§</sup>	55,29±1,30 <sup>§</sup>

BW pes de l'animal, HW pes del cor, HW/TL ràtio pes cor/longitud de la tibia, HR freqüència cardíaca, LVPWT gruix de la paret posterior del ventricle esquerre, SWT gruix del septe intraventricular, LVEDS diàmetre intern del ventricle esquerre al final de la sístole, LVEDD diàmetre intern del ventricle esquerre al final de la diàstole, FE fracció d'ejecció. Les dades estan expressades com mitjana ± SEM. \*P<0.05 vs. grup Sham. <sup>§</sup>P<0.05 vs. grup TAC 28d (n=5-8 per grup).

### 5.7.1.1) L'administració oral, crònica i retardada de NPO-2270 limita la deposició de col·lagen intersticial induïda per constricció aòrtica transversal

La constricció de l'aorta va provocar un augment progressiu en la deposició de col·lagen intersticial amb una alta variabilitat intragrup (Figura 43). L'increment de la fibrosi va mostrar una tendència no significativa als 7 dies (p=0,158) i va resultar marcadament significatiu als 28 dies (p<0,001). L'administració de NPO-2270 des de l'inici de l'estenosi com de forma retardada va reduir la deposició de col·lagen intersticial (p=0,02 i p=0,005 respectivament en relació al grup TAC sense tractament als 28 dies). La fibrosi mesurada en aquest grups no va diferir significativament dels valors obtinguts en el grup sense oclusió o als 7 dies d'oclusió.



**Figura 43.** Imatges representatives de seccions transversals del ventricle i tenyides amb picrosirius red, i quantificació de la deposició de col·lagen intersticial (6 micrografies aleatòries/cor, n=5-8 cors per grup). Els resultats estan expressats com a mitjana ± SEM. \*P<0.05 vs. grup Sham. <sup>§</sup>P<0.05 vs. grup TAC 28d.





### **6.1) MODELS EXPERIMENTALS DE REMODELAT VENTRICULAR I INSUFICIÈNCIA CARDÍACA**

Els models animals de remodelat ventricular i IC proporcionen informació molt útil que permet millorar el coneixement dels mecanismes fisiopatològics i l'evolució de la patologia, amb l'objectiu final de desenvolupar estratègies terapèutiques pel seu tractament.

Amb l'objectiu de determinar la contribució de les calpaïnes al remodelat i la IC, en aquesta tesi s'han utilitzat 4 models diferents que abasten diferents tipus d'estrès crònic, tots ells associats al desenvolupament de IC: model d'isquèmia-reperfusió (infart agut de miocardi), model d'isoproterenol (estimulació  $\beta$ -adrenèrgica), model d'angiotensina II (estimulació sistema RAS) i model de constricció aòrtica (estenosi aòrtica/hipertensió).

Cada un dels models presenta avantatges i desavantatges respecte els altres. Els models d'isoproterenol i angiotensina simulen l'estimulació neurohumoral que s'ha descrit en pacients amb IC, són senzills i presenten una mortalitat baixa i una ràpida evolució del remodelat, però són clínicament menys fisiològics que els models de constricció o isquèmia. Aquests però, són tècnicament més complexos i requereixen d'una corba d'aprenentatge, tenen una mortalitat més elevada i el desenvolupament del remodelat és més lent. Com tots els models experimentals, aquests també presenten les limitacions inherents a l'ús d'animals de laboratori com són les diferències entre espècies, l'ús d'animals joves (sense patologies o medicació) o la severitat dels models i que fan que les cinètiques de desenvolupament de remodelat cardíac i la seva progressió a IC siguin diferents les descrites en pacients. En el cas del model de constricció aòrtica, aquest provoca una sobrecàrrega de pressió de forma immediata, fet que contrasta amb la lenta progressió de la patologia en pacients amb hipertensió i estenosi de la vàlvula aòrtica.

Els resultats obtinguts mostren que el curs temporal de desenvolupament del remodelat i el grau d'aquest en cada un dels models és diferent. Al final del procediment, en els nostres models d'administració d'isoproterenol o angiotensina II s'observa un increment en la hipertròfia i la fibrosi, associat a una reducció del volum del ventricle i una fracció d'ejecció preservada. El model d'isoproterenol però, amb només 7 dies de tractament indueix una hipertròfia i fibrosi més elevada a la desenvolupada en el model d'angiotensina durant 14 dies. Per altre banda en els models de TAC i isquèmia-reperfusió després de 3 o 4 setmanes els animals a més d'hipertròfia i fibrosi desenvolupen dilatació ventricular i IC amb fracció d'ejecció disminuïda. L'evolució temporal, però, no és la mateixa, ja que els animals sotmesos a TAC inicialment desenvolupen una hipertròfia amb fracció d'ejecció preservada. A més, el grau d'hipertròfia que presenten els animals després de 7 dies de constricció és superior a la desenvolupada a tota la resta de models.

Degut a limitacions tècniques no s'ha pogut avaluar la funció diastòlica dels animals. Per això no podem descartar que els models d'estimulació neurohumoral, tot i tenir una funció sistòlica preservada, no presentin disfunció diastòlica, tal i com han descrit diferents treballs en models realitzats amb les mateixes condicions<sup>307</sup>. Aquests models també poden donar lloc a una IC amb fracció d'ejecció reduïda si s'incrementa la dosi utilitzada o si el model s'allarga suficientment en el temps<sup>308,309</sup>. L'increment d'isoproterenol a dosis altes però pot incrementar la mortalitat substancialment<sup>310</sup>. Igualment, la modificació del grau de constricció



de l'aorta<sup>311</sup> en el model d'estenosi o la duració de l'oclusió de l'artèria descendent en el model d'isquèmia-reperfusió<sup>312</sup> també indueix diferents fenotips.

La cronologia de la progressió del remodelat també depèn de l'espècie, l'edat o el gènere. En el model de constricció aòrtica, s'ha descrit que els ratolins desenvolupen hipertròfia als 7 dies i mostren IC a les 4 setmanes, tal i com confirmen els nostres resultats, mentre que en rata la progressió fins a la IC ocupa un període de mesos<sup>313</sup>. En canvi, els resultats obtinguts en el model d'isquèmia-reperfusió mostren que la progressió del remodelat i IC tant en ratolins com en rates és semblant.

## **6.2) L'ACTIVACIÓ DE LES CALPAÏNES ÉS UNA CARACTERÍSTICA GENERAL DEL REMODELAT VENTRICULAR**

La sobreexpressió i activació tant de la calpaina 1 com la de calpaina 2 s'ha descrit en mostres de miocardi de pacients amb IC congestiva<sup>251,314</sup> i en múltiples models de remodelat ventricular i IC en rata i ratolí, incloent l'oclusió coronària permanent<sup>139,252</sup>, TAC<sup>141,314</sup> i l'administració crònica d'angiotensina II<sup>138</sup> o d'isoproterenol<sup>314,315</sup>. Els resultats del nostre estudi confirmen aquest fet en els models d'isquèmia transitòria i isoproterenol. Tots aquests estudis demostren sòlidament que l'alteració del sistema calpaina/calpastatina és un fenomen associat al procés de remodelat i IC de manera independent al tipus d'estres crònic que el provoca.

A més, els resultats obtinguts en el model d'isquèmia-reperfusió indiquen que els mecanismes pels quals l'activitat de la calpaina es veu augmentada són diferents a l'inici de la reperfusió i durant el procés de remodelat que té lloc més tardiamment. Durant la fase aguda de la reperfusió, l'activació de les calpaïnes és conseqüència de la sobrecàrrega de  $Ca^{2+}$  i la normalització del pH intracel·lular, i aquesta contribuiria a través de la proteòlisi d'una gran varietat de proteïnes a la mort cel·lular per necrosi que caracteritza el dany agut per reperfusió<sup>136</sup>. Més endavant en el temps, l'activació de les calpaïnes està associada a l'increment de la seva expressió en el miocardi no isquèmic. S'ha suggerit que la sobreexpressió de les diferents isoformes de les calpaïnes durant el remodelat postinfart tenen un patró temporal diferent. La sobreexpressió de la calpaina 1 es produiria de forma crònica i de forma preferencial al septe intraventricular, mentre que la calpaina 2 es sobreexpressaria de forma màxima als 3 dies postinfart i localitzada principalment a la paret del ventricle<sup>316</sup>, encara que les conseqüències d'aquestes diferències no s'han establert encara. D'altra banda, s'ha demostrat que la sobreexpressió de calpaïnes en cardiomiòcits pot augmentar l'activitat global de la calpaina en presència de nivells fisiològics de  $Ca^{2+}$  intracel·lulars<sup>317</sup>.

Els mecanismes pels quals es produeix la sobreexpressió de les calpaïnes durant la reperfusió o en resposta a altres estímuls crònics encara no s'han establert. En el cas de la reperfusió, una possibilitat podria ser que l'activació inicial de les calpaïnes dependent de  $Ca^{2+}$  fos a la vegada responsable d'aquesta sobreexpressió més tardiamment. En aquest sentit, l'activació de les calpaïnes s'ha demostrat que pot activar els factors nuclears NF- $\kappa$ B i NFAT<sup>257,318</sup> i l'activació d'aquests s'ha associat a canvis en l'expressió de diferents gens durant el remodelat postinfart<sup>319,320</sup>. En la mateixa direcció, aquest mecanisme també podria explicar la sobreexpressió

en altres models d'estrés cardíac com són l'estimulació crònica amb isoproterenol o angiotensina i el TAC, models en els que també es produeix una desregulació de l'homeòstasi de  $Ca^{2+}$ <sup>321-323</sup> i on s'ha demostrat, i els nostres resultats confirmen, l'activació d'aquests factors nuclears de manera dependent de calpaïnes<sup>138,256</sup>. D'altre banda, és important fer notar que aquesta hipòtesis no descarta la sobreexpressió de les calpaïnes como a conseqüència de l'activació de factors transcripció per altres vies clàssiques<sup>324</sup>.

### **6.3) LA INHIBICIÓ DE LES CALPAÏNES IMMEDIATAMENT ABANS DE LA REPERFUSIÓ REDUEIX LA MIDA DE L'INFART**

L'evidència experimental obtinguda a partir de diferents aproximacions com la proteòlisis de substrats coneguts de les calpaïnes, l'ús d'inhibidors de calpaïnes i models transgènics han demostrat prèviament l'activació i participació de les calpaïnes en el dany per isquèmia-reperfusió<sup>223,277,325</sup>. Els nostres resultats obtinguts en el model d'isquèmia transitòria tant en el cor aïllat perfòs en el sistema Langendorff com *in situ* per lligadura de la coronària descendent anterior en rata i ratolí indiquen que l'administració d'una dosi única dels inhibidors SNJ-1945 i NPO-2270 just abans d'iniciar la reperfusió atenua l'activitat de la calpaïna i la mida de l'infart. Confirmant les observacions anteriors, aquest resultats inicials demostren la capacitat de les dues molècules per inhibir l'activitat calpaïna en el cor intacte i permeten determinar les concentracions adequades per realitzar els estudis en models de remodelat ventricular.

### **6.4) LA INHIBICIÓ FARMACOLÒGICA DE LES CALPAÏNES LIMITA EL REMODELAT I DISFUNCIÓ VENTRICULAR POSTINFART**

La contribució de les calpaïnes en els processos que donen lloc al remodelat ventricular postinfart està menys caracteritzada que el seu efecte sobre la fase aguda de la reperfusió. Estudis previs obtinguts en models transgènics amb el sistema calpaïna/calpastatina alterat i sotmesos a protocols d'oclusió coronària permanent han reportat resultats contradictoris respecte a la participació de les calpaïnes en el remodelat ventricular postinfart. La reducció de l'activitat de la calpaïna bé per la deleció específica en cardiomiòcits tant de la calpaïna 1 com de la 2<sup>140</sup>, o bé per la sobreexpressió de la calpastatina<sup>252</sup>, va reduir el remodelat ventricular i la disfunció, mentre que l'activació de la calpaïna en un model amb deleció de la calpastatina va tenir l'efecte contrari<sup>326</sup>. En canvi, un altre estudi en ratolins amb sobreexpressió de calpastatina descriu una major mortalitat després de 40 dies d'oclusió coronària permanent causada pel trencament del ventricle com a conseqüència d'un procés de cicatrització defectuós<sup>253</sup>.

Les raons que poden explicar la divergència d'aquests resultats no es coneixen però tal com s'ha detallat, les calpaïnes participen en funcions fisiològiques, i la seva inhibició per sobreexpressió de la calpastatina s'ha associat amb el desenvolupament de cardiomiopatia dilatada<sup>317</sup>, indicant que la interpretació dels resultats obtinguts en models genètics amb alteracions constitutives del sistema calpaïna/calpastatina pot ser complexa. El nostre estudi minimitza aquest problema fent servir una estratègia farmacològica per inhibir les calpaïnes

que a més d'analitzar el potencial de les calpaïnes com a diana terapèutica, permet excloure els efectes inespecífics intrínsecs al model transgènic.

És important fer notar que tots aquests estudis previs han fet servir models d'oclusió coronària permanent, model que no reflecteix la situació clínica dels pacients amb infart agut de miocardi que reben una reperfusió urgent com a tractament d'elecció, tal i com recomanen les guies clíniques<sup>327</sup>.

Aquest treball, a diferència dels estudis anteriors, ha sigut dissenyat fent servir un model experimental d'oclusió coronària transitòria, que reproduceix el tractament amb tècniques de revascularització del pacient amb un IAM. Per tant, el nostre estudi té en consideració el fenomen del dany per reperfusió que es produeix en aquest context clínic i que ha estat obviat en estudis previs. A més, l'administració de l'inhibidor de les calpaïnes únicament durant la fase aguda o de manera crònica iniciant l'administració a les 24 hores de la reperfusió, temps suficient per que quedi establert la mida de l'infart<sup>297,328</sup>, ha permès diferenciar la contribució de les calpaïnes als efectes aguts de la reperfusió d'aquells efectes sobre el remodelat cardíac postinfart que són deguts a la modulació directa dels mecanismes responsables d'aquests. Finalment i de manera important, aquest estudi analitza per primera vegada l'efectivitat de l'administració per via oral de dos nous inhibidors de les calpaïnes en el tractament del remodelat ventricular i IC postinfart.

Els resultats obtinguts demostren que l'administració oral de SNJ-1945 amb inici després de l'oclusió coronària inhibeix de forma efectiva l'activitat de les calpaïnes en rates. L'administració crònica de SNJ-1945 després un dia després d'iniciar la reperfusió va reduir la dilatació i disfunció ventricular i l'àrea de la cicatriu. A l'àrea no isquèmica del miocardi, l'administració del SNJ-1945 va atenuar la hipertròfia dels cardiomiòcits, la deposició de col·lagen intersticial i la infiltració de cèl·lules inflamatòries. El nostre disseny experimental descarta un possible efecte sobre el dany agut per reperfusió i ens permet assegurar que els resultats observats són deguts a efectes sobre les vies i mecanismes implicats en el remodelat ventricular. D'altra banda, l'administració de SNJ-195 durant tant la fase aguda com la crònica del protocol experimental va mostrar en tots els paràmetres mesurats una tendència a millorar l'atenuació del remodelat postinfart obtinguda només amb l'administració crònica, encara que aquesta no va arribar a la significació estadística.

El potencial terapèutic de la inhibició farmacològica de les calpaïnes en la prevenció del remodelat postinfart es va confirmar a una espècie diferent com és el ratolí i amb una molècula diferent, NPO-2270, amb unes característiques farmacocinètiques més favorables que el SNJ-1945. L'administració oral i crònica de NPO-2270 també va reduir de forma significativa l'activació de les calpaïnes i el remodelat advers postinfart però amb una dosi inferior a la utilitzada amb el SNJ-1945.

S'han proposat diversos mecanismes pels quals les calpaïnes podrien contribuir al remodelat postinfart. S'ha descrit que l'activació de les calpaïnes durant la reperfusió provoca la degradació de N-cadherina, que podria induir remodelat ventricular trencant les unions cèl·lula-cèl·lula als discs intercalats<sup>326</sup>. En el mateix model experimental, s'ha correlacionat l'activitat de la calpaïna amb la proteòlisi de la junctofilina-2, proteïna que connecta el

sarcoplasma amb el reticle sarcoplàsmic sent essencial pel control de  $\text{Ca}^{2+}$  durant la contracció dels cardiomiòcits, i que provocaria disfunció contràctil<sup>243</sup>.

Altres grups han suggerit que les calpaïnes interaccionen amb el sistema apoptòtic activant la caspasa 3 i provocant la mort per apoptosi dels cardiomiòcits durant el remodelat postinfart<sup>272</sup>. No obstant, s'ha demostrat que l'apoptosi no juga un paper significatiu en la mort cel·lular per isquèmia-reperfusió donat que les caspases es troben silenciades en els cardiomiòcits adults<sup>329</sup>. En aquest sentit, la deleció cardioespecífica dels gens de les caspases executores 3 i 7 no produeix disminució en la mida de l'infart ni en la severitat del remodelat ventricular en ratolins sotmesos a un protocol d'isquèmia/reperfusió<sup>330</sup>.

Diferents estudis suggereixen que les calpaïnes poden activar la via calcineurina/NFAT a través de la proteòlisi del domini autoinhibitori de la calcineurina<sup>257</sup> o a través del clivatge del seu inhibidor endogen cain/cabin<sup>331</sup>, portant a la defosforilació dels residus de NFAT i la seva translocació al nucli, on activa l'expressió de gens pro-hipertròfics<sup>332</sup>.

Per últim, s'ha demostrat que les calpaïnes degraden l'inhibidor  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , que porta a la translocació nuclear de NF- $\kappa\text{B}$ . Animals amb una deleció genètica de la subunitat p50 del factor NF- $\kappa\text{B}$  o que expressen el super-repressor de NF- $\kappa\text{B}$  mostren una hipertròfia limitada en resposta a la infusió crònica d'angiotensina II o isoproterenol<sup>256</sup>. Per altre banda, la sobreexpressió de calpastatina o la deleció de la subunitat reguladora de les calpaïnes redueix la translocació de la subunitat p65 de NF- $\kappa\text{B}$  al nucli<sup>138,140</sup>. S'ha proposat a més que l'activació d'aquesta via als cardiomiòcits seria suficient per induir l'expressió de citocines pro-inflamatòries, hipertròfia i fibrosi gràcies a l'activació de senyals autocrins i paracrins<sup>256,320</sup>.

En línia amb aquest últim mecanisme, els nostres resultats demostren que la inhibició de les calpaïnes redueix la degradació de  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  i la translocació nuclear de NF- $\kappa\text{B}$ , atenua l'expressió de citocines inflamatòries i l'activació de la via canònica de fibrosi TGF- $\beta$ 1/smad. A més, s'ha descrit que les calpaïnes poden activar la forma latent del TGF- $\beta$ 1 a través de la proteòlisi del seu pèptid latent associat (LAP)<sup>333</sup>, promovent així també l'activació de la via.

Si bé estudis amb animals transgènics amb deleció de les calpaïnes cardioespecífica indiquen que l'activació de NF- $\kappa\text{B}$  en cardiomiòcits és necessària en el procés de remodelat, els resultats obtinguts en cultiu de fibroblasts demostren que l'acció de les calpaïnes no es limita als cardiomiòcits i que també intervenen en altres tipus cel·lulars. En aquest sentit, s'ha descrit que les calpaïnes poden participar en els processos d'inflamació i resposta immunitària a través de l'activació de NF- $\kappa\text{B}$  i induir l'expressió de MCP-1 que recluta els limfòcits i macròfags o a través de la degradació de proteïnes del citoesquelet com la talina o l'ezrina, responsables d'extravasació i migració dels leucòcits<sup>334</sup>. D'acord amb aquestes evidències, ratolins amb una alta expressió de calpastatina sotmesos a una oclusió coronària permanent presenten un reclutament de cèl·lules inflamatòries alterat i retardat<sup>138</sup>. De forma consistent, en el nostre model els resultats obtinguts en talls histològics tant del miocardi infartat com del remot mostren una marcada reducció de la infiltració de monòcits/macròfags i cèl·lules T amb l'administració crònica de SNJ-1945.

En conjunt, els resultats obtinguts i l'evidència prèvia suggereixen que l'atenuació del remodelat ventricular postinfart observat amb l'administració crònica del SNJ-1945 pot ser deguda, almenys en part, a la inhibició de la via de senyalització de NF-κB.

### **6.5) LES CALPAÏNES PARTICIPEN EN EL PROCÉS DE REMODELAT VENTRICULAR D'ORIGEN NO ISQUÈMIC**

Més enllà del remodelat postinfart, diferents estudis proposen que les calpaïnes també participen en el remodelat cardíac en resposta a diversos tipus d'estrès crònic<sup>314,335,336</sup>.

A més de l'augment en l'expressió i activitat de les calpaïnes en mostres de pacients amb IC i models experimentals de remodelat i IC comentats anteriorment, estudis previs han descrit que models transgènics amb sobreexpressió de calpaina 1 restringida a cardiomiòcits<sup>314,317</sup> o mitocondries de cardiomiòcits<sup>245</sup> generen remodelat advers i mortalitat prematura en absència de cap estímul crònic o canvis significatius en la concentració intracel·lular de Ca<sup>2+</sup>, mentre que la seva inhibició per sobreexpressió de calpastatina prevé el remodelat ventricular en ratolins tractats crònicament amb angiotensina II<sup>138</sup>. En sentit contrari, un altre estudi ha descrit una major severitat del remodelat ventricular i disfunció en ratolins amb deleció de Capn4 sotmesos a TAC o amb tractament crònic amb isoproterenol<sup>254</sup>.

Malgrat aquesta evidència, un únic estudi ha testat recentment el potencial farmacològic de la inhibició de les calpaïnes com a estratègia terapèutica en el tractament del remodelat de causa no isquèmica<sup>314</sup>. En ell, l'administració per via intraperitoneal de l'inhibidor de les calpaïnes MDL-28170 va reduir la hipertròfia i disfunció contràctil en ratolins tractats amb isoproterenol o sotmesos a TAC. No obstant, MDL-28170 no és un inhibidor selectiu i a les concentracions utilitzades també inhibeix altres cisteïna proteases com les catepsines.

Per aquest motiu, en aquest estudi s'han analitzat els efectes de l'administració oral del SNJ-1945 o del NPO-2270 en dos models de remodelat ventricular induït per estimulació neurohumoral (administració crònica d'isoproterenol i d'angiotensina II) i un altre d'hipertensió per estenosi de l'aorta.

L'estimulació adrenèrgica de manera sostinguda s'ha associat amb el desenvolupament d'hipertròfia i la progressió d'aquesta a IC tant en models animals com en humans. En el nostre estudi, l'administració d'isoproterenol per via intraperitoneal de forma crònica durant una setmana va induir hipertròfia dels cardiomiòcits i augment de col·lagen intersticial tant en rata com en ratolí. Aquests canvis, en concordança amb altres estudis<sup>337</sup>, no van anar acompanyats de dilatació ventricular, ni variacions significatives en la fracció d'ejecció, que si s'observen amb concentracions més elevades d'isoproterenol o temps de tractament més perllongats<sup>308,309</sup>. El remodelat induït per isoproterenol va anar associat amb un marcat increment de l'expressió de la calpaïna 1 i 2 i de la seva activació, i el grau de sobreexpressió de calpaïna 1 va mostrar una estreta correlació amb els nivells de marcadors hipertròfics. Aquests resultats donen suport a observacions prèvies i indiquen que la desregulació de les calpaïnes es produeix abans de la descompensació de la hipertròfia generada i el desenvolupament de disfunció contràctil. L'administració crònica i per via oral de l'inhibidor

SNJ-1945 va reduir significativament l'activació de les calpaïnes i la resposta hipertròfica i fibròtica a l'isoproterenol tant en rates com ratolins.

Partint de l'efectivitat del SNJ-1945 en l'atenuació del remodelat induït per isoproterenol i tenint en compte estudis previs que demostren que tan l'expressió com l'activitat de les calpaïnes també es troba augmentada en els models de remodelat i IC induïts tant per administració crònica d'angiotensina II com per TAC<sup>138,338</sup>, es va analitzar si la inhibició de les calpaïnes pot atenuar el remodelat ventricular en aquests models .

De manera semblant als resultats obtinguts amb el model d'isoproterenol, l'administració crònica d'angiotensina II durant dues setmanes va provocar hipertròfia i fibrosi sense variacions significatives en els volums ventriculars i la funció contràctil i aquest remodelat va ser atenuat amb l'administració oral i crònica del inhibidor NPO-2270.

Per altre banda, la constricció aòrtica en el model de TAC va induir a les 4 setmanes hipertròfia, fibrosi així com dilatació i disfunció ventricular tal com han observat altres estudis<sup>311</sup>, i aquest remodelat advers i IC es van atenuar marcadament amb l'administració crònica de NPO-2270. De manera important, els resultats obtinguts administrant NPO-2270 una setmana després de realitzar la constricció, indiquen que l'inhibició de les calpaïnes és capaç de frenar però no revertir el procés de remodelat ventricular. A més, el fet de que l'efecte del NPO-2270 sigui similar en els grups que reben la seva administració des del primer dia i després d'una setmana pot suggerir que inicialment el procés de remodelat és independent de l'activació de les calpaïnes o que el tractament per via oral no ha assolit encara la seva màxima capacitat per inhibir les calpaïnes.

Alguns dels mecanismes descrits anteriorment per explicar la contribució de les calpaïnes al remodelat postinfart també s'ha suggerit que podrien participar en el remodelat d'origen no isquèmic. Dintre d'aquests tindriem l'activació dels factors nuclears NF- $\kappa$ B i NFAT, així com la degradació de proteïnes estructurals com la N-cadherina<sup>326</sup> o la distrofina<sup>338</sup>. Aquesta última proporciona estabilitat mecànica a la membrana plasmàtica a través de les seves interaccions amb el citoesquelet d'actina, i la seva degradació també s'ha proposat que podria marcar la transició de hipertròfia compensatoria a IC en un model de TAC<sup>141</sup>. Finalment, s'ha descrit que l'activació de les calpaïnes en els models d'isoproterenol i TAC provoquen la degradació de junctofilina. La inhibició de les calpaïnes o la sobreexpressió de junctofilina atenuen la hipertròfia i IC en aquests models d'estrés cardíac.

## **6.6) PAPER DE GRK2 EN EL REMODELAT VENTRICULAR INDUÏT PER ADMINISTRACIÓ D'ISOPROTERENOL**

Diferents estudis han demostrat que la GRK2 es troba sobreexpressada en el miocardi de pacients amb IC i en models preclínic d'estrès crònic amb un paper causal en el desenvolupament del remodelat cardíac<sup>339-341</sup>. La inhibició genètica de l'activitat de GRK2 ha mostrat prevenir la hipertròfia induïda tant per TAC com per l'estimulació  $\beta$ -adrenèrgica<sup>106,304</sup>.

En línia amb aquests estudis, els resultats obtinguts en el model de remodelat per estimulació  $\beta$ -adrenèrgica mostren un increment dels nivells de GRK2 i que es preveu amb la inhibició

crònica de les calpaïnes. D'altra banda, l'ús de ratolins GRK2 hemizigots va atenuar la hipertròfia cardíaca induïda per isoproterenol, així com l'expressió dels marcadors d'hipertròfia, mentre que l'expressió de la calpaïna es va mantenir incrementada en aquests ratolins. En conjunt, aquests resultats suggereixen que l'increment de GRK2 és un esdeveniment rellevant en la hipertròfia cardíaca i que és dependent de l'activació de les calpaïnes per isoproterenol.

Els nostres resultats demostren a més que l'increment dels nivells de GRK2 induït per les calpaïnes és degut a mecanismes que afecten tant a la seva degradació com a la seva síntesi (Figura 44).

GRK2 és una proteïna de vida curta (1 hora de vida mitja) que és degradada ràpidament per la via del proteosoma<sup>342</sup>. S'ha descrit que la principal ligasa E3 implicada en la seva ubiquitinització i degradació després de l'activació de GPCR és la MDM2<sup>303,343</sup>. Els nostres resultats mostren que el tractament amb isoproterenol promou la degradació de MDM2 per acció de calpaïna. D'acord amb aquest resultat, a la bibliografia s'han descrit seqüències PEST (principals determinants reguladors de la degradació mediada per calpaïnes en moltes proteïnes) en la seqüència proteica de MDM2<sup>344</sup>. Estudis previs a més ja han demostrat que la calpaïna degrada MDM2 en l'epidèrmis després de la irradiació amb UV<sup>345</sup>. A més de la degradació de MDM2 per acció directa de les calpaïnes, els nostres resultats indiquen que aquestes també podrien modular l'estabilitat de MDM2 a través de la proteòlisi de factors de regulació de MDM2. Això provocaria l'increment de la ubiquitinització de MDM2 i la seva degradació pel proteosoma.

MDM2 però no és l'única ligasa reguladora de GRK2 que s'ha descrit. La proteïna G<sub>β</sub> s'uneix a la proteïna DDB1 i a través del complex DDB1-CUL4A-ROC1 E3 ligasa ubiquitinitzen GRK2<sup>304</sup>. S'ha proposat que l'estimulació adrenèrgica fosforila aquest complex estabilitzant els nivells de GRK2. Els nostres resultats però no han detectat que les proteïnes d'aquest complex ligasa sigui substrat de les calpaïnes, de manera que la regulació MDM2 sembla ser el factor determinant en l'increment dels nivells de GRK2 induït per isoproterenol. Diverses dades recolzen aquest mecanisme; els nivells endògens de GRK2 augmenten mentre que els fibroblasts embrionaris de ratolí no expressen MDM2<sup>343</sup>; la deleció global o cardioespecífica de MDM2 en ratolins provoca un augment significatiu dels nivells cardíacs de GRK2<sup>346</sup>. A més, la deleció condicional de MDM2 als cardiomiòcits provoca una mala funció cardíaca i disminueix la resposta a l'estimulació dels receptors β-adrenèrgics, mentre que la inhibició GRK2 reverteix els efectes<sup>346</sup>. Altres estudis també han relacionat la disminució de MDM2 amb el desenvolupament de hipertròfia cardíaca induïda per fenilefrina o endotelina-1<sup>347</sup>.

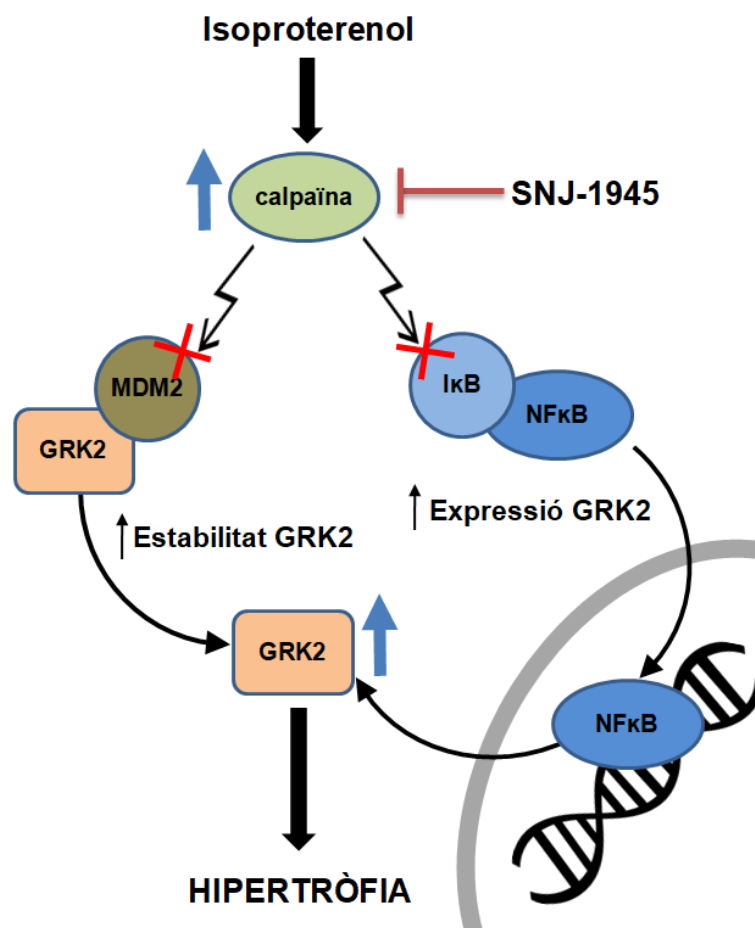
Alguns estudis han suggerit que la calpaïna 2 podria degradar de forma directa la proteïna GRK2<sup>348</sup>. A pesar de la sobreexpressió i activació de les calpaïnes, en el nostre model no hem detectat fragments de GRK2 proteolitzats. Això podria ser degut a que les vies de senyalització hipertròfiques podrien induir modificacions post-transcripcionals a GRK2 que la fessin resistent a l'acció de la calpaïna o bé que promourien la seva localització lluny de l'acció de les calpaïnes.

Per altre banda els nostres resultats també demostren que l'isoproterenol provoca un increment de la síntesi de GRK2 a través de l'activació dependent de calpaïna de la via de

transcripció de NF- $\kappa$ B. Les regions 5' flanquejants del promotor de GRK2 presenten diversos llocs d'unió del factor NF- $\kappa$ B. Això ha permès descriure en un model de limfòcits humans que l'activació de NF- $\kappa$ B promou un increment en l'activitat transcripcional del promotor de GRK2, mentre que la presència del seu inhibidor I $\kappa$ B atenua significativament l'activitat transcripcional.

Els nostres resultats obtinguts en el model d'isquèmia-reperfusió també identifiquen el I $\kappa$ B com a substrat de les calpaïnes associat al desenvolupament del remodelat postinfart. L'anàlisi de les mostres tractades amb isoproterenol va confirmar que l'activació de les calpaïnes també redueix els nivells de I $\kappa$ B en aquest model. En conjunt, els resultats suggereixen que l'activació de les calpaïnes donaria lloc a la degradació de I $\kappa$ B i activació del factor de transcripció NF- $\kappa$ B i aquest provocaria un increment en la síntesi de GRK2.

La contribució de NF- $\kappa$ B a la hipertròfia cardíaca induïda per estrès crònic, incloent l'estimulació adrenèrgica s'ha demostrat en diferents estudis<sup>256,349,350</sup>. Donat que s'ha proposat que GRK2 pot activar NF- $\kappa$ B i induir una hipertròfia maladaptativa<sup>351</sup>, i els nostres resultats han mostrat la regulació transcripcional de GRK2 a través de NF- $\kappa$ B, és possible que existeixi una co-regulació entre ambdós que reguli l'activació transcripcional de gens hipertròfics.



**Figura 44.** Mecanismes a través dels quals l'activació de les calpaïnes induïda per isoproterenol pot contribuir a incrementar els nivells de la proteïna GRK2 i donar lloc a hipertròfia. L'administració oral de SNJ-1945 és una estratègia efectiva per prevenir aquests efectes.



## **6.7) EVOLUCIÓ DE LA INHIBICIÓ FARMACOLÒGICA DE LES CALPAÏNES**

La inhibició farmacològica de les calpaïnes ha tingut tradicionalment moltes limitacions degut a la baixa selectivitat per les calpaïnes respecte altres proteases, i la baixa solubilitat i permeabilitat a les membranes de les diferents molècules que s'han generat, fet que ha reduït les possibilitats d'analitzar el seu potencial en estudis clínics.

En aquest estudi hem fet servir dos inhibidors de la calpaïna, el SNJ-1945, propietat de Senju Pharmaceutical, i el nou inhibidor NPO-2270, propietat de Landsteiner Genmed SL. Ambdós presenten un perfil inhibidor de les calpaïnes amb grans avantatges respecte els inhibidors de les calpaïnes disponibles fins al moment.

El SNJ-1945 és un inhibidor de les calpaïnes de tercera generació que va ser dissenyat específicament per incrementar la seva solubilitat aquosa, biodisponibilitat i penetració tissular<sup>352</sup>. Aquest inhibidor ha demostrat efectivitat en el tractament d'altres malalties en models experimentals, com són l'esclerosi múltiple<sup>290</sup>, la isquèmia retinal<sup>353</sup>, la lissencefàlia<sup>354</sup> o en lesions cerebrals traumàtiques<sup>355</sup>. En el context de la cardiologia, l'únic antecedent ha descrit la protecció envers la disfunció ventricular en un model d'isquèmia breu que provoca atordiment del miocardi però no infart<sup>293</sup>. En tots ells, el SNJ-1945 ha mostrat resultats prometedors, sent la via d'administració en alguns casos oral<sup>287,290</sup>, convertint el SNJ-1945 en una molècula amb un gran potencial pel seu ús en la clínica.

Alguns treballs han suggerit que les calpaïnes i la MMP2 tenen substrats compartits i que molts dels efectes atribuïts a les calpaïnes són en realitat deguts a MMP2. En aquest sentit, SERCA2, que es degradada durant el dany per isquèmia-reperfusió i que s'havia identificat com substrat de la calpaïna<sup>235</sup>, recentment s'ha vist que podria ser degradat en primera instància per la MMP2<sup>356</sup>. Aquestes discrepàncies podrien tenir origen en l'ús de molècules poc selectives per les calpaïnes i que també inhibirien l'activitat de la MMP2<sup>357</sup>. Per aquest motiu, el nostre estudi va descartar a partir de la mesura de l'activitat gelatinolítica de la MMP2 que els efectes obtinguts amb el tractament amb SNJ-1945 eren conseqüència de la inhibició de la MMP-2 i no de les calpaïnes.

Una de les limitacions històriques de molts inhibidors és la seva poca selectivitat envers altres cisteïna proteases com son les catepsines<sup>358</sup>. Aquest fet és degut a que el centre catalític de la superfamília de les cisteïna proteases és una seqüència altament conservada i tradicionalment el disseny de les molècules s'ha centrat en generar estructures que reaccionen amb ell. Per solucionar aquest problema actualment es treballa en generar derivats d'inhibidors de calpaïnes a través de modificacions químiques sistemàtiques que permeten que aquests es puguin unir a altres punts de l'enzim causant la seva inhibició al·lostèrica.

Diferents estudis han descrit que els nivells de catepsines es troben augmentats en pacients amb infart de miocardi o hipertròfia ventricular i s'ha associat la seva activació amb els processos d'hipertròfia, fibrosi i inflamació cardíaca en models experimentals d'estrès crònic<sup>359,360</sup>. Aquesta evidència ha fet qüestionar si és realment essencial l'ús d'inhibidors que tinguin una alta selectivitat per les calpaïnes respecte a les catepsines per obtenir un benefici clínic<sup>361</sup>.

En el cas del SNJ-1945, presenta el desavantatge de tenir una IC50 calculada per la companyia relativament alta per la inhibició de les calpaïnes 1 i 2 (0,14  $\mu\text{M}$  i 0,24  $\mu\text{M}$  respectivament). A les concentracions usades en aquest estudi no es pot descartar que els resultats obtinguts amb el SNJ-1945 en el model de remodelat postinfart o d'estrés per isoproterenol sobreestimïn la contribució de les calpaïnes degut a la possible inhibició de catepsines. Aquesta possibilitat però queda descartada amb els estudis realitzats amb el NPO-2270.

El NPO-2270 és un nou inhibidor més potent que el SNJ-1945, amb una IC50 proporcionada per la companyia de 0,008  $\mu\text{M}$  i 0,01  $\mu\text{M}$  per les calpaïnes 1 i 2 respectivament. En el nostre estudi, la IC50 per la calpaïna 1 o 2 determinada en homogenats de miocardi va ser de 2,24  $\mu\text{M}$  en el cas de SNJ-1945 i 0,08  $\mu\text{M}$  per NPO-2270. A més, presenta una selectivitat major, sent la IC50 per les catepsines L, B i S  $10^3$  vegades superior a la de les calpaïnes (dades proporcionades per la companyia). En el nostre estudi, l'administració del NPO-2270 per via oral i crònica en el model d'isquèmia-reperfusió va reproduir els resultats obtinguts amb el SNJ-1945, i en dos models d'estrés crònic d'origen no isquèmic va reduir el remodelat i IC administrat a dosis inferiors.

La caracterització farmacològica del SNJ-1945 es troba més avançada que la del NPO-2270 i actualment s'està avaluant en un estudi en fase II la seva eficàcia i seguretat en pacients amb retinopaties (jRTC2021190013). D'altra banda, en el cas del NPO-2270 no s'han detectat alteracions ecocardiogràfiques ni altres signes de toxicitat en ratolins després de 28 dies d'administració per via oral indicant un perfil segur.

En conjunt, els resultats obtinguts proporcionen una evidència sòlida per a l'ús d'inhibidors de calpaïnes, i concretament, els dos estudiats en aquest treball, en assajos clínics que determinin la seva eficàcia en el tractament del remodelat i insuficiència cardíaca crònica.







## **7) Conclusions**

A partir dels resultats exposats es conclou que:

- 1) La sobreexpressió i activació de les calpaïnes és un fenomen associat al procés de remodelat ventricular independent de l'estímul patològic que el genera.
- 2) L'activació de les calpaïnes contribueix a la resposta hipertròfica i fibròtica que caracteritza el remodelat ventricular tant de causa isquèmica com no isquèmica, i a la resposta inflamatòria associada al remodelat post-infart on la regulació de l'activitat del factor de transcripció NF- $\kappa$ B juga un paper important.
- 3) Les calpaïnes participen en la hipertròfia induïda per isoproterenol a través de l'augment dels nivells proteics de GRK2 per mecanismes que regulen tant l'expressió com l'estabilitat de GRK2.
- 4) La inhibició farmacològica de les calpaïnes es pot aconseguir amb un tractament crònic per via oral i aquesta atenua el remodelat ventricular i la insuficiència cardíaca induïts tant per un estrès crònic d'origen isquèmic com no isquèmic.
- 5) Els nous inhibidors de les calpaïnes SNJ-1945 i NPO-2270 es mostren com a potencials candidats per estudiar l'eficàcia de la inhibició de les calpaïnes en el tractament del remodelat ventricular i la insuficiència cardíaca crònica en humans.



## LÍNIES DE FUTUR







## 8) Línies de futur

En aquesta tesi s'ha demostrat que la inhibició de les calpaïnes té efectes cardioprotectors envers la IC, reduint el remodelat postinfart i el remodelat induït per sobrecàrrega de pressió i estimulació neurohumoral en rates i ratolins. Els resultats exposats en aquesta tesi obren les portes a la possibilitat d'utilitzar dos nous inhibidors de les calpaïnes, SNJ-1945 i NPO-2270, per estudiar la seva eficàcia en el tractament de la IC crònica en pacients.

L'activitat de les calpaïnes és essencial en certs processos fisiològics, i s'han descrit efectes negatius deguts a la inhibició genètica de les calpaïnes en cardiomiòcits, el sistema immunitari o el tractament del càncer. Per tant s'ha de considerar la seguretat de la inhibició crònica de les calpaïnes i estudiar-se en profunditat. Si bé el SNJ-1945 compta amb estudis de farmacocinètica i farmacotoxicitat en models animals clínicament rellevants i actualment hi ha un estudi clínic en fase II, en el cas del NPO-2270, aquesta informació es més limitada i està actualment en fase de definició. Els resultats de la caracterització farmacològica del NPO-2270 junt als resultats obtinguts en aquest treball permetran escollir una de les dues molècules analitzades per determinar el seu potencial envers la IC en models fisiològicament més complexes com és el model porcí com a pas previ al seu ús en pacients.

D'altra banda és important comparar l'efecte dels inhibidors de calpaïnes amb altres fàrmacs utilitzats en el tractament de la IC com el Enalapril o Entresto i analitzar l'efecte combinat. Aquests resultats ajudaran a posar en context la rellevància clínica del tractament amb inhibidors de calpaïnes.

En l'àmbit de la investigació bàsica, el grup investigador es troba actualment treballant en diferents línies que inclouen la determinació dels mecanismes pels quals l'estrés cardíac causat per un estímul crònic provoca la sobreexpressió de les calpaïnes i l'extrapolació del mecanisme d'activació de GRK2 descrit en el model d'isoproterenol als altres models de remodelat estudiats (TAC i angiotensina II).

Una altra línia d'estudi analitza el paper de les calpaïnes en la resposta inflamatòria associada al procés de remodelat<sup>362</sup>. Diferents evidències assenyalen que la correcta migració quimiotàctica dels neutròfils i la seva expansió cel·lular és deguda a l'activitat de les calpaïnes sobre proteïnes associades al citoesquelet com l'eZRina<sup>363</sup>.







1. Ziaeeian, B. & Fonarow, G. C. Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat. Rev. Cardiol.* **13**, 368–378 (2016).
2. Ponikowski, A. del G. de T. P. *et al.* Guía ESC 2016 sobre el diagnóstico y tratamiento de la insuficiencia cardiaca aguda y crónica. *Rev. Española Cardiol.* (2016). doi:10.1016/j.recesp.2016.10.014
3. Anguita Sánchez, M. *et al.* Prevalence of heart failure in the Spanish general population aged over 45 years. The PRICE Study. *Rev. Esp. Cardiol.* **61**, 1041–1049 (2008).
4. Jones, N. R., Roalfe, A. K., Adoki, I., Hobbs, F. D. R. & Taylor, C. J. Survival of patients with chronic heart failure in the community: a systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Heart Fail.* **21**, 1306–1325 (2019).
5. Rodríguez-Artalejo, F., Banegas Banegas, J. R. & Guallar-Castillón, P. Epidemiology of Heart Failure. *Rev. Española Cardiol. (English Ed.)* **57**, 163–170 (2004).
6. Maggioni, A. P. *et al.* EURObservational Research Programme: regional differences and 1-year follow-up results of the Heart Failure Pilot Survey (ESC-HF Pilot). *Eur. J. Heart Fail.* **15**, 808–817 (2013).
7. Konstam, M. A., Kramer, D. G., Patel, A. R., Maron, M. S. & Udelson, J. E. Left ventricular remodeling in heart failure: current concepts in clinical significance and assessment. *JACC. Cardiovasc. Imaging* **4**, 98–108 (2011).
8. Hill, J. A. & Olson, E. N. Cardiac plasticity. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1370–1380 (2008).
9. Tham, Y. K., Bernardo, B. C., Ooi, J. Y. Y., Weeks, K. L. & McMullen, J. R. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch. Toxicol.* **89**, 1401–1438 (2015).
10. Grossman, W., Jones, D. & McLaurin, L. P. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J. Clin. Invest.* **56**, 56–64 (1975).
11. Shimizu, I. & Minamino, T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **97**, 245–262 (2016).
12. Hellermann, J. P. *et al.* Incidence of heart failure after myocardial infarction: is it changing over time? *Am. J. Epidemiol.* **157**, 1101–1107 (2003).
13. Levy, D., Larson, M. G., Vasan, R. S., Kannel, W. B. & Ho, K. K. The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA* **275**, 1557–1562 (1996).
14. Nakamura, M. & Sadoshima, J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat. Rev. Cardiol.* **15**, 387–407 (2018).
15. Mosterd, A. & Hoes, A. W. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart* **93**, 1137–1146 (2007).
16. McKay, R. G. *et al.* Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion. *Circulation* **74**, 693–702 (1986).
17. Mathers, C. D. & Loncar, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* **3**, e442 (2006).
18. Reimer, K. A., Lowe, J. E., Rasmussen, M. M. & Jennings, R. B. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* **56**, 786–794 (1977).
19. Garcia-Dorado, D. *et al.* Myocardial reperfusion in the pig heart model: infarct size and duration of coronary occlusion. *Cardiovasc. Res.* **21**, 537–544 (1987).
20. Stone, G. W. *et al.* Predictors of infarct size after primary coronary angioplasty in acute myocardial infarction from pooled analysis from four contemporary trials. *Am. J. Cardiol.* **100**, 1370–1375 (2007).
21. Committee, I. S. INTRAVENOUS STREPTOKINASE GIVEN WITHIN 0-4 HOURS OF ONSET OF MYOCARDIAL INFARCTION REDUCED MORTALITY IN ISIS-2. *Lancet* **329**, 502 (1987).
22. Downey, J. M. & Cohen, M. V. Reducing Infarct Size in The Setting of Acute Myocardial Infarction. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **48**, 363–371 (2006).
23. Goel, K., Pinto, D. S. & Gibson, C. M. Association of time to reperfusion with left ventricular function and heart failure in patients with acute myocardial infarction

- treated with primary percutaneous coronary intervention: A systematic review. *Am. Heart J.* **165**, 451–467 (2013).
24. Takemura, G., Nakagawa, M., Kanamori, H., Minatoguchi, S. & Fujiwara, H. Benefits of reperfusion beyond infarct size limitation. *Cardiovasc. Res.* **83**, 269–276 (2009).
  25. Lars, N.-C. *et al.* Benefit From Reperfusion With Primary Percutaneous Coronary Intervention Beyond 12 Hours of Symptom Duration in Patients With ST-Segment–Elevation Myocardial Infarction. *Circ. Cardiovasc. Interv.* **11**, e006842 (2018).
  26. Yellon, D. M. & Hausenloy, D. J. Myocardial reperfusion injury. *N. Engl. J. Med.* **357**, 1121–1135 (2007).
  27. Piper, H. M., García-Dorado, D. & Ovize, M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **38**, 291–300 (1998).
  28. Piper, H. M., Abdallah, Y. & Schäfer, C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* **61**, 365–371 (2004).
  29. García-Dorado, D., Rodríguez-Sinovas, A., Ruiz-Meana, M. & Inserte, J. Protección contra el daño miocárdico por isquemia-reperusión en la práctica clínica. *Rev. Española Cardiol.* **67**, 394–404 (2014).
  30. Piper, H. M., García-Dorado, D. & Ovize, M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **38**, 291–300 (1998).
  31. Barrabés, J. A. *et al.* Myocardial segment shrinkage during coronary reperfusion in situ. *Pflügers Arch.* **431**, 519–526 (1996).
  32. Priori, S. G., Mantica, M., Napolitano, C. & Schwartz, P. J. Early afterdepolarizations induced in vivo by reperfusion of ischemic myocardium. A possible mechanism for reperfusion arrhythmias. *Circulation* **81**, 1911–1920 (1990).
  33. Halestrap, A. P. What is the mitochondrial permeability transition pore? *J. Mol. Cell. Cardiol.* **46**, 821–831 (2009).
  34. Ruiz-Meana, M. *et al.* The role of mitochondrial permeability transition in reperfusion-induced cardiomyocyte death depends on the duration of ischemia. *Basic Res. Cardiol.* **106**, 1259–1268 (2011).
  35. Halestrap, A. P., Clarke, S. J. & Javadov, S. A. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* **61**, 372–385 (2004).
  36. Erickson, J. R., He, B. J., Grumbach, I. M. & Anderson, M. E. CaMKII in the cardiovascular system: sensing redox states. *Physiol. Rev.* **91**, 889–915 (2011).
  37. Vásquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B. & Martásek, P. The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications. *Free Radic. Res.* **37**, 121–127 (2003).
  38. Chareonthaitawee, P., Christian, T. F., Hirose, K., Gibbons, R. J. & Rumberger, J. A. Relation of initial infarct size to extent of left ventricular remodeling in the year after acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **25**, 567–573 (1995).
  39. Stone, P. H. *et al.* Prognostic significance of location and type of myocardial infarction: independent adverse outcome associated with anterior location. *J. Am. Coll. Cardiol.* **11**, 453–463 (1988).
  40. Lindsey, M. L. & Zamilpa, R. Temporal and spatial expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases following myocardial infarction. *Cardiovasc. Ther.* **30**, 31–41 (2012).
  41. Sun, Y. & Weber, K. T. Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc. Res.* **46**, 250–256 (2000).
  42. Weisman, H. F. & Healy, B. Myocardial infarct expansion, infarct extension, and reinfarction: pathophysiologic concepts. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **30**, 73–110 (1987).
  43. Sanjiv, K. There May Be More to Myocardial Viability Than Meets the Eye! *Circulation* **92**, 2790–2793 (1995).
  44. Kramer, C. M. *et al.* Regional differences in function within noninfarcted myocardium

- during left ventricular remodeling. *Circulation* **88**, 1279–1288 (1993).
45. Talman, V. & Ruskoaho, H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration. *Cell Tissue Res.* **365**, 563–581 (2016).
  46. Omura, T. *et al.* Differences in time course of myocardial mRNA expression in non-infarcted myocardium after myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.* **95**, 316–323 (2000).
  47. van Bilsen, M., van Nieuwenhoven, F. A. & van der Vusse, G. J. Metabolic remodelling of the failing heart: beneficial or detrimental? *Cardiovasc. Res.* **81**, 420–428 (2009).
  48. Pascual, F. & Coleman, R. A. Fuel availability and fate in cardiac metabolism: A tale of two substrates. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1861**, 1425–1433 (2016).
  49. Tsutsui, H., Kinugawa, S. & Matsushima, S. Oxidative stress and heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **301**, H2181-90 (2011).
  50. Akhmedov, A. T., Rybin, V. & Marín-García, J. Mitochondrial oxidative metabolism and uncoupling proteins in the failing heart. *Heart Fail. Rev.* **20**, 227–249 (2015).
  51. Keith, M. *et al.* Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **31**, 1352–1356 (1998).
  52. Murdoch, C. E., Zhang, M., Cave, A. C. & Shah, A. M. NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. *Cardiovasc. Res.* **71**, 208–215 (2006).
  53. Takimoto, E. & Kass, D. A. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **49**, 241–248 (2007).
  54. Jacob-Ferreira, A. L. & Schulz, R. Activation of intracellular matrix metalloproteinase-2 by reactive oxygen-nitrogen species: Consequences and therapeutic strategies in the heart. *Arch. Biochem. Biophys.* **540**, 82–93 (2013).
  55. Köhler, A. C., Sag, C. M. & Maier, L. S. Reactive oxygen species and excitation-contraction coupling in the context of cardiac pathology. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **73**, 92–102 (2014).
  56. Somanna, N. K. *et al.* The Nox1/4 Dual Inhibitor GKT137831 or Nox4 Knockdown Inhibits Angiotensin-II-Induced Adult Mouse Cardiac Fibroblast Proliferation and Migration. AT1 Physically Associates With Nox4. *J. Cell. Physiol.* **231**, 1130–1141 (2016).
  57. Sung, M. M. *et al.* Resveratrol treatment of mice with pressure-overload-induced heart failure improves diastolic function and cardiac energy metabolism. *Circ. Heart Fail.* **8**, 128–137 (2015).
  58. Keith, M. E. *et al.* A controlled clinical trial of vitamin E supplementation in patients with congestive heart failure. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 219–224 (2001).
  59. Gwathmey, J. K. *et al.* Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circ. Res.* **61**, 70–76 (1987).
  60. Yeh, Y.-H. *et al.* Calcium-handling abnormalities underlying atrial arrhythmogenesis and contractile dysfunction in dogs with congestive heart failure. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* **1**, 93–102 (2008).
  61. Kiss, E., Ball, N. A., Kranias, E. G. & Walsh, R. A. Differential changes in cardiac phospholamban and sarcoplasmic reticular Ca(2+)-ATPase protein levels. Effects on Ca2+ transport and mechanics in compensated pressure-overload hypertrophy and congestive heart failure. *Circ. Res.* **77**, 759–764 (1995).
  62. Hasenfuss, G. *et al.* Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ. Res.* **75**, 434–442 (1994).
  63. Schwinger, R. H. *et al.* Reduced Ca(2+)-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **31**, 479–491 (1999).
  64. Dridi, H. *et al.* Intracellular calcium leak in heart failure and atrial fibrillation: a unifying mechanism and therapeutic target. *Nat. Rev. Cardiol.* **17**, 732–747 (2020).



65. Wang, S. *et al.* Endoplasmic reticulum stress in the heart: insights into mechanisms and drug targets. *Br. J. Pharmacol.* **175**, 1293–1304 (2018).
66. Sozen, E., Karademir, B. & Ozer, N. K. Basic mechanisms in endoplasmic reticulum stress and relation to cardiovascular diseases. *Free Radic. Biol. Med.* **78**, 30–41 (2015).
67. Dirx, E., da Costa Martins, P. A. & De Windt, L. J. Regulation of fetal gene expression in heart failure. *Biochim. Biophys. Acta* **1832**, 2414–2424 (2013).
68. McMullen, J. R. *et al.* Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 12355–12360 (2003).
69. Woods, R. L. Cardioprotective functions of atrial natriuretic peptide and B-type natriuretic peptide: a brief review. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **31**, 791–794 (2004).
70. Gupta, M. P. Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **43**, 388–403 (2007).
71. Zhang, D. *et al.* mTORC1 regulates cardiac function and myocyte survival through 4E-BP1 inhibition in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 2805–2816 (2010).
72. Castets, P. *et al.* Sustained activation of mTORC1 in skeletal muscle inhibits constitutive and starvation-induced autophagy and causes a severe, late-onset myopathy. *Cell Metab.* **17**, 731–744 (2013).
73. Shioi, T. *et al.* Rapamycin attenuates load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation* **107**, 1664–1670 (2003).
74. Bishu, K. *et al.* Anti-remodeling effects of rapamycin in experimental heart failure: dose response and interaction with angiotensin receptor blockade. *PLoS One* **8**, e81325 (2013).
75. Tuomainen, T. & Tavi, P. The role of cardiac energy metabolism in cardiac hypertrophy and failure. *Exp. Cell Res.* **360**, 12–18 (2017).
76. Garnier, A. *et al.* Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J. Physiol.* **551**, 491–501 (2003).
77. Weiss, R. G., Gerstenblith, G. & Bottomley, P. A. ATP flux through creatine kinase in the normal, stressed, and failing human heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 808–813 (2005).
78. Diwan, A. & Dorn, G. W. 2nd. Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutic targets. *Physiology (Bethesda)*. **22**, 56–64 (2007).
79. Kehat, I. & Molkentin, J. D. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation* **122**, 2727–2735 (2010).
80. Kong, P., Christia, P. & Frangogiannis, N. G. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 549–574 (2014).
81. Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C. & Brown, R. A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 349–363 (2002).
82. Klingberg, F., Hinz, B. & White, E. S. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *J. Pathol.* **229**, 298–309 (2013).
83. Divakaran, V. *et al.* Adaptive and maladaptive effects of SMAD3 signaling in the adult heart after hemodynamic pressure overloading. *Circ. Heart Fail.* **2**, 633–642 (2009).
84. Koitabashi, N. *et al.* Pivotal role of cardiomyocyte TGF- $\beta$  signaling in the murine pathological response to sustained pressure overload. *J. Clin. Invest.* **121**, 2301–2312 (2011).
85. Anzai, T. Inflammatory Mechanisms of Cardiovascular Remodeling. *Circ. J.* **82**, 629–635 (2018).
86. Torre-Amione, G. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation* **93**, 704–711 (1996).
87. Bartekova, M., Radosinska, J., Jelemensky, M. & Dhalla, N. S. Role of cytokines and inflammation in heart function during health and disease. *Heart Fail. Rev.* **23**, 733–758

- (2018).
88. Davenport, A. P. *et al.* Endothelin. *Pharmacol. Rev.* **68**, 357 LP – 418 (2016).
  89. Finckh, M. *et al.* Enhanced cardiac angiotensinogen gene expression and angiotensin converting enzyme activity in tachypacing-induced heart failure in rats. *Basic Res. Cardiol.* **86**, 303–316 (1991).
  90. Lindpaintner, K. *et al.* Selective activation of cardiac angiotensinogen gene expression in post-infarction ventricular remodeling in the rat. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **25**, 133–143 (1993).
  91. Kobayashi, T. *et al.* Expression of endothelin-1, ETA and ETB receptors, and ECE and distribution of endothelin-1 in failing rat heart. *Am. J. Physiol.* **276**, H1197-206 (1999).
  92. Cody, R. J., Haas, G. J., Binkley, P. F., Capers, Q. & Kelley, R. Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in patients with chronic congestive heart failure. *Circulation* **85**, 504–509 (1992).
  93. Studer, R. *et al.* Increased angiotensin-I converting enzyme gene expression in the failing human heart. Quantification by competitive RNA polymerase chain reaction. *J. Clin. Invest.* **94**, 301–310 (1994).
  94. Newton, A. C., Antal, C. E. & Steinberg, S. F. Protein kinase C mechanisms that contribute to cardiac remodelling. *Clin. Sci. (Lond)*. **130**, 1499–1510 (2016).
  95. Braz, J. C. *et al.* PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat. Med.* **10**, 248–254 (2004).
  96. Ling, H. *et al.* Requirement for Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 1230–1240 (2009).
  97. Baks, J. *et al.* The delta isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 2342–2347 (2009).
  98. Molkenin, J. D. *et al.* A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **93**, 215–228 (1998).
  99. Wilkins, B. J. *et al.* Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* **94**, 110–118 (2004).
  100. Lymperopoulos, A., Rengo, G. & Koch, W. J. Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. *Circ. Res.* **113**, 739–753 (2013).
  101. Anand, I. S. *et al.* Changes in brain natriuretic peptide and norepinephrine over time and mortality and morbidity in the Valsartan Heart Failure Trial (Val-HeFT). *Circulation* **107**, 1278–1283 (2003).
  102. Du, X.-J. Distinct role of adrenoceptor subtypes in cardiac adaptation to chronic pressure overload. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **35**, 355–360 (2008).
  103. Sato, P. Y., Chuprun, J. K., Schwartz, M. & Koch, W. J. The evolving impact of G protein-coupled receptor kinases in cardiac health and disease. *Physiol. Rev.* **95**, 377–404 (2015).
  104. Woodall, M. C., Ciccarelli, M., Woodall, B. P. & Koch, W. J. G protein-coupled receptor kinase 2: a link between myocardial contractile function and cardiac metabolism. *Circ. Res.* **114**, 1661–1670 (2014).
  105. Iaccarino, G. *et al.* Elevated myocardial and lymphocyte GRK2 expression and activity in human heart failure. *Eur. Heart J.* **26**, 1752–1758 (2005).
  106. Schlegel, P. *et al.* G protein-coupled receptor kinase 2 promotes cardiac hypertrophy. *PLoS One* **12**, e0182110 (2017).
  107. Raake, P. W. *et al.* G protein-coupled receptor kinase 2 ablation in cardiac myocytes before or after myocardial infarction prevents heart failure. *Circ. Res.* **103**, 413–422 (2008).
  108. Rengo, G. *et al.* Prognostic Value of Lymphocyte G Protein-Coupled Receptor Kinase-2 Protein Levels in Patients With Heart Failure. *Circ. Res.* **118**, 1116–1124 (2016).

109. Huang, S. *et al.* Proteasome inhibition 1 h following ischemia protects GRK2 and prevents malignant ventricular tachyarrhythmias and SCD in a model of myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **294**, H1298-303 (2008).
110. Cannavo, A., Liccardo, D. & Koch, W. J. Targeting cardiac  $\beta$ -adrenergic signaling via GRK2 inhibition for heart failure therapy. *Front. Physiol.* **4**, 264 (2013).
111. Sato, P. Y. *et al.* GRK2 compromises cardiomyocyte mitochondrial function by diminishing fatty acid-mediated oxygen consumption and increasing superoxide levels. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **89**, 360–364 (2015).
112. Bush, E. W. *et al.* Canonical transient receptor potential channels promote cardiomyocyte hypertrophy through activation of calcineurin signaling. *J. Biol. Chem.* **281**, 33487–33496 (2006).
113. Seo, K. *et al.* Combined TRPC3 and TRPC6 blockade by selective small-molecule or genetic deletion inhibits pathological cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 1551–1556 (2014).
114. Wu, X., Eder, P., Chang, B. & Molkenin, J. D. TRPC channels are necessary mediators of pathologic cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 7000–7005 (2010).
115. Makarewich, C. A. *et al.* Transient receptor potential channels contribute to pathological structural and functional remodeling after myocardial infarction. *Circ. Res.* **115**, 567–580 (2014).
116. Dragún, M., Gažová, A., Kyselovič, J., Hulman, M. & Máťuš, M. TRP Channels Expression Profile in Human End-Stage Heart Failure. *Medicina (Kaunas)*. **55**, 380 (2019).
117. Hayden, M. S. & Ghosh, S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* **18**, 2195–2224 (2004).
118. Hall, G., Hasday, J. D. & Rogers, T. B. Regulating the regulator: NF- $\kappa$ B signaling in heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **41**, 580–591 (2006).
119. Traenckner, E. B. *et al.* Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J.* **14**, 2876–2883 (1995).
120. Ghosh, S. & Karin, M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **109** Suppl, S81-96 (2002).
121. Wong, S. C., Fukuchi, M., Melnyk, P., Rodger, I. & Giaid, A. Induction of cyclooxygenase-2 and activation of nuclear factor-kappaB in myocardium of patients with congestive heart failure. *Circulation* **98**, 100–103 (1998).
122. Frantz, S. *et al.* Absence of NF-kappaB subunit p50 improves heart failure after myocardial infarction. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **20**, 1918–1920 (2006).
123. Zhang, X. Q. *et al.* Cardiomyocyte-specific p65 NF- $\kappa$ B deletion protects the injured heart by preservation of calcium handling. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **305**, H1089–H1097 (2013).
124. Thuny, F. *et al.* Post-Conditioning Reduces Infarct Size and Edema in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **59**, 2175–2181 (2012).
125. White, S. K. *et al.* Remote ischemic conditioning reduces myocardial infarct size and edema in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *JACC. Cardiovasc. Interv.* **8**, 178–188 (2015).
126. Bice, J. S., Keim, Y., Stasch, J.-P. & Baxter, G. F. NO-independent stimulation or activation of soluble guanylyl cyclase during early reperfusion limits infarct size. *Cardiovasc. Res.* **101**, 220–228 (2014).
127. Skyschally, A., Schulz, R. & Heusch, G. Cyclosporine A at Reperfusion Reduces Infarct Size in Pigs. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **24**, 85–87 (2010).
128. Cowie, M. R. & Fisher, M. SGLT2 inhibitors: mechanisms of cardiovascular benefit beyond glycaemic control. *Nat. Rev. Cardiol.* **17**, 761–772 (2020).
129. Yusuf, S., Pitt, B., Davis, C. E., Hood, W. B. & Cohn, J. N. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. *N.*

- Engl. J. Med.* **325**, 293–302 (1991).
130. Yusuf, S., Pitt, B., Davis, C. E., Hood, W. B. J. & Cohn, J. N. Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions. *N. Engl. J. Med.* **327**, 685–691 (1992).
  131. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet (London, England)* **353**, 2001–2007 (1999).
  132. McMurray, J. J. V *et al.* Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N. Engl. J. Med.* **371**, 993–1004 (2014).
  133. Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W. & Cong, J. The calpain system. *Physiol. Rev.* **83**, 731–801 (2003).
  134. Bhatt, A., Kaverina, I., Otey, C. & Huttenlocher, A. Regulation of focal complex composition and disassembly by the calcium-dependent protease calpain. *J. Cell Sci.* **115**, 3415–3425 (2002).
  135. Dewitt, S., Francis, R. J. & Hallett, M. B. Ca<sup>2+</sup> and calpain control membrane expansion during the rapid cell spreading of neutrophils. *J. Cell Sci.* **126**, 4627–4635 (2013).
  136. Inserte, J., Hernando, V. & Garcia-Dorado, D. Contribution of calpains to myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **96**, 23–31 (2012).
  137. Neuhof, C. & Neuhof, H. Calpain system and its involvement in myocardial ischemia and reperfusion injury. *World J. Cardiol.* **6**, 638–652 (2014).
  138. Letavernier, E. *et al.* Targeting the calpain/calpastatin system as a new strategy to prevent cardiovascular remodeling in angiotensin II-induced hypertension. *Circ. Res.* **102**, 720–728 (2008).
  139. Takahashi, M. *et al.* Possible involvement of calpain activation in pathogenesis of chronic heart failure after acute myocardial infarction. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **47**, 413–421 (2006).
  140. Ma, J. *et al.* Deficiency of Capn4 gene inhibits nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) protein signaling/inflammation and reduces remodeling after myocardial infarction. *J. Biol. Chem.* **287**, 27480–27489 (2012).
  141. Prado, F. P. *et al.* Early dystrophin loss is coincident with the transition of compensated cardiac hypertrophy to heart failure. *PLoS One* **12**, e0189469 (2017).
  142. Sorimachi, H., Hata, S. & Ono, Y. Calpain chronicle--an enzyme family under multidisciplinary characterization. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* **87**, 287–327 (2011).
  143. Inomata, M. *et al.* Comparison of low and high calcium requiring forms of the calcium-activated neutral protease (CANP) from rabbit skeletal muscle. *J. Biochem.* **95**, 1661–1670 (1984).
  144. Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y. & Sorimachi, H. Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes* **53 Suppl 1**, S12-8 (2004).
  145. Hosfield, C. M., Elce, J. S., Davies, P. L. & Jia, Z. Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca(2+)-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *EMBO J.* **18**, 6880–6889 (1999).
  146. Moldoveanu, T. *et al.* A Ca(2+) switch aligns the active site of calpain. *Cell* **108**, 649–660 (2002).
  147. Sorimachi, H., Hata, S. & Ono, Y. Calpain. in (eds. Lennarz, W. J. & Lane, M. D. B. T.-E. of B. C. (Second E.) 353–361 (Academic Press, 2013). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00058-X>
  148. Zimmerman, U. J., Boring, L., Pak, J. H., Mukerjee, N. & Wang, K. K. The calpain small subunit gene is essential: its inactivation results in embryonic lethality. *IUBMB Life* **50**, 63–68 (2000).
  149. Sheu, S. S., Sharma, V. K. & Banerjee, S. P. Measurement of cytosolic free calcium concentration in isolated rat ventricular myocytes with quin 2. *Circ. Res.* **55**, 830–834

- (1984).
150. Maravall, M., Mainen, Z. F., Sabatini, B. L. & Svoboda, K. Estimating intracellular calcium concentrations and buffering without wavelength ratioing. *Biophys. J.* **78**, 2655–2667 (2000).
  151. Strobl, S. *et al.* The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 588–592 (2000).
  152. Reverter, D. *et al.* Structural basis for possible calcium-induced activation mechanisms of calpains. *Biol. Chem.* **382**, 753–766 (2001).
  153. Suzuki, K., Tsuji, S., Kubota, S., Kimura, Y. & Imahori, K. Limited autolysis of Ca<sup>2+</sup>-activated neutral protease (CANP) changes its sensitivity to Ca<sup>2+</sup> ions. *J. Biochem.* **90**, 275–278 (1981).
  154. Imajoh, S., Kawasaki, H. & Suzuki, K. Limited autolysis of calcium-activated neutral protease (CANP): reduction of the Ca<sup>2+</sup>-requirement is due to the NH<sub>2</sub>-terminal processing of the large subunit. *J. Biochem.* **100**, 633–642 (1986).
  155. Cong, J., Goll, D. E., Peterson, A. M. & Kapprell, H. P. The role of autolysis in activity of the Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinases (mu-calpain and m-calpain). *J. Biol. Chem.* **264**, 10096–10103 (1989).
  156. Nakagawa, K., Masumoto, H., Sorimachi, H. & Suzuki, K. Dissociation of m-calpain subunits occurs after autolysis of the N-terminus of the catalytic subunit, and is not required for activation. *J. Biochem.* **130**, 605–611 (2001).
  157. Molinari, M. & Carafoli, E. Calpain: a cytosolic proteinase active at the membranes. *J. Membr. Biol.* **156**, 1–8 (1997).
  158. Fernández-Montalván, A. *et al.* Mu-calpain binds to lipid bilayers via the exposed hydrophobic surface of its Ca<sup>2+</sup>-activated conformation. *Biol. Chem.* **387**, 617–627 (2006).
  159. Crawford, C., Brown, N. R. & Willis, A. C. Investigation of the structural basis of the interaction of calpain II with phospholipid and with carbohydrate. *Biochem. J.* **265**, 575–579 (1990).
  160. Tompa, P., Emori, Y., Sorimachi, H., Suzuki, K. & Friedrich, P. Domain III of calpain is a Ca<sup>2+</sup>-regulated phospholipid-binding domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 1333–1339 (2001).
  161. Arthur, J. S. & Crawford, C. Investigation of the interaction of m-calpain with phospholipids: calpain-phospholipid interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1293**, 201–206 (1996).
  162. Melcrová, A. *et al.* The complex nature of calcium cation interactions with phospholipid bilayers. *Sci. Rep.* **6**, 38035 (2016).
  163. Saido, T. C., Mizuno, K. & Suzuki, K. Proteolysis of protein kinase C by calpain: effect of acidic phospholipids. *Biomed. Biochim. Acta* **50**, 485–489 (1991).
  164. Saido, T. C., Shibata, M., Takenawa, T., Murofushi, H. & Suzuki, K. Positive regulation of mu-calpain action by polyphosphoinositides. *J. Biol. Chem.* **267**, 24585–24590 (1992).
  165. Inomata, M., Saito, Y., Kon, K. & Kawashima, S. Binding sites for calcium-activated neutral protease on erythrocyte membranes are not membrane phospholipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**, 625–632 (1990).
  166. Kuboki, M., Ishii, H. & Kazama, M. Characterization of Calpain I-Binding Proteins in Human Erythrocyte Plasma Membrane. *J. Biochem.* **107**, 776–780 (1990).
  167. Zalewska, T., Thompson, V. F. & Goll, D. E. Effect of phosphatidylinositol and inside-out erythrocyte vesicles on autolysis of μ- and m-calpain from bovine skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1693**, 125–133 (2004).
  168. Nuzzi, P. A., Senetar, M. A. & Huttenlocher, A. Asymmetric Localization of Calpain 2 during Neutrophil Chemotaxis. *Mol. Biol. Cell* **18**, 795–805 (2006).
  169. Shao, H. *et al.* Spatial localization of m-calpain to the plasma membrane by

- phosphoinositide biphosphate binding during epidermal growth factor receptor-mediated activation. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 5481–5496 (2006).
170. Hewitt, K. E., Lesiuk, H. J., Tauskela, J. S., Morley, P. & Durkin, J. P. Selective coupling of mu-calpain activation with the NMDA receptor is independent of translocation and autolysis in primary cortical neurons. *J. Neurosci. Res.* **54**, 223–232 (1998).
  171. Aversa, M. *et al.* Interaction between Calpain-1 and HSP90: New Insights into the Regulation of Localization and Activity of the Protease. *PLoS One* **10**, e0116738 (2015).
  172. Liu, X., Rainey, J. J., Harriman, J. F. & Schnellmann, R. G. Calpains mediate acute renal cell death: role of autolysis and translocation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **281**, F728–38 (2001).
  173. Murphy, R. M. *et al.* Activation of skeletal muscle calpain-3 by eccentric exercise in humans does not result in its translocation to the nucleus or cytosol. *J. Appl. Physiol.* **111**, 1448–1458 (2011).
  174. Sheng, J.-J., Chang, H. & Yu, Z.-B. Nuclear Translocation of Calpain-2 Mediates Apoptosis of Hypertrophied Cardiomyocytes in Transverse Aortic Constriction Rat. *J. Cell. Physiol.* **230**, 2743–2754 (2015).
  175. Wang, L.-H., Lin, Y.-M., Lin, C.-Y., Chern, Y. & Wang, G.-S. Neurodegeneration induces a developmental RNA processing program by calpain-mediated MBNL2 degradation. *bioRxiv* 2020.07.24.219121 (2020). doi:10.1101/2020.07.24.219121
  176. Mellgren, R. L., Nettey, M. S., Mericle, M. T., Renno, W. & Lane, R. D. An improved purification procedure for calpastatin, the inhibitor protein specific for the intracellular calcium-dependent proteinases, calpains. *Prep. Biochem.* **18**, 183–197 (1988).
  177. Wendt, A., Thompson, V. F. & Goll, D. E. Interaction of calpastatin with calpain: a review. *Biol. Chem.* **385**, 465–472 (2004).
  178. Lee, W. J. *et al.* Molecular diversity in amino-terminal domains of human calpastatin by exon skipping. *J. Biol. Chem.* **267**, 8437–8442 (1992).
  179. Takano, J., Watanabe, M., Hitomi, K. & Maki, M. Four Types of Calpastatin Isoforms with Distinct Amino-Terminal Sequences Are Specified by Alternative First Exons and Differentially Expressed in Mouse Tissues<sup>1</sup>. *J. Biochem.* **128**, 83–92 (2000).
  180. Hao, L. Y. *et al.* Calpastatin domain L is involved in the regulation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in guinea pig cardiac myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**, 756–761 (2000).
  181. Emori, Y., Kawasaki, H., Imajoh, S., Minami, Y. & Suzuki, K. All four repeating domains of the endogenous inhibitor for calcium-dependent protease independently retain inhibitory activity. Expression of the cDNA fragments in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **263**, 2364–2370 (1988).
  182. Hanna, R. A., Garcia-Diaz, B. E. & Davies, P. L. Calpastatin simultaneously binds four calpains with different kinetic constants. *FEBS Lett.* **581**, 2894–2898 (2007).
  183. Takano, E., Ma, H., Yang, H. Q., Maki, M. & Hatanaka, M. Preference of calcium-dependent interactions between calmodulin-like domains of calpain and calpastatin subdomains. *FEBS Lett.* **362**, 93–97 (1995).
  184. Hanna, R. A., Campbell, R. L. & Davies, P. L. Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin. *Nature* **456**, 409–412 (2008).
  185. Moldoveanu, T., Gehring, K. & Green, D. R. Concerted multi-pronged attack by calpastatin to occlude the catalytic cleft of heterodimeric calpains. *Nature* **456**, 404–408 (2008).
  186. De Tullio, R., Aversa, M., Salamino, F., Pontremoli, S. & Melloni, E. Differential degradation of calpastatin by mu- and m-calpain in Ca<sup>2+</sup>-enriched human neuroblastoma LAN-5 cells. *FEBS Lett.* **475**, 17–21 (2000).
  187. Adachi, Y. *et al.* Phosphorylation and subcellular distribution of calpastatin in human hematopoietic system cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 3968–3972 (1991).
  188. Salamino, F. *et al.* Modulation of calpastatin specificity in rat tissues by reversible

- phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 1326–1332 (1994).
189. Shiraha, H., Glading, A., Chou, J., Jia, Z. & Wells, A. Activation of m-calpain (calpain II) by epidermal growth factor is limited by protein kinase A phosphorylation of m-calpain. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2716–2727 (2002).
  190. Smith, S. D., Jia, Z., Huynh, K. K., Wells, A. & Elce, J. S. Glutamate substitutions at a PKA consensus site are consistent with inactivation of calpain by phosphorylation. *FEBS Lett.* **542**, 115–118 (2003).
  191. Glading, A. *et al.* Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 2499–2512 (2004).
  192. Leloup, L. *et al.* m-Calpain activation is regulated by its membrane localization and by its binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **285**, 33549–33566 (2010).
  193. Glading, A., Uberall, F., Keyse, S. M., Lauffenburger, D. A. & Wells, A. Membrane proximal ERK signaling is required for M-calpain activation downstream of epidermal growth factor receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **276**, 23341–23348 (2001).
  194. Randriamboavonjy, V., Kyselova, A. & Fleming, I. Redox Regulation of Calpains: Consequences on Vascular Function. *Antioxid. Redox Signal.* **30**, 1011–1026 (2019).
  195. Zima, A. V & Blatter, L. A. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc. Res.* **71**, 310–321 (2006).
  196. Michetti, M., Salamino, F., Melloni, E. & Pontremoli, S. Reversible Inactivation of Calpain Isoforms by Nitric Oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **207**, 1009–1014 (1995).
  197. Guttman, R. P. & Johnson, G. V. Oxidative stress inhibits calpain activity in situ. *J. Biol. Chem.* **273**, 13331–13338 (1998).
  198. Temm-Grove, C. J., Wert, D., Thompson, V. F., Allen, R. E. & Goll, D. E. Microinjection of calpastatin inhibits fusion in myoblasts. *Exp. Cell Res.* **247**, 293–303 (1999).
  199. Glading, A., Lauffenburger, D. A. & Wells, A. Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. *Trends Cell Biol.* **12**, 46–54 (2002).
  200. Lebart, M.-C. & Benyamin, Y. Calpain involvement in the remodeling of cytoskeletal anchorage complexes. *FEBS J.* **273**, 3415–3426 (2006).
  201. Mendoza, P. A. *et al.* Calpain2 mediates Rab5-driven focal adhesion disassembly and cell migration. *Cell Adh. Migr.* **12**, 185–194 (2018).
  202. Barta, J. *et al.* Calpain-1-sensitive myofibrillar proteins of the human myocardium. *Mol. Cell. Biochem.* **278**, 1–8 (2005).
  203. Solomon, V. & Goldberg, A. L. Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts. *J. Biol. Chem.* **271**, 26690–26697 (1996).
  204. Cressman, C. M., Mohan, P. S., Nixon, R. A. & Shea, T. B. Proteolysis of protein kinase C: mM and microM calcium-requiring calpains have different abilities to generate, and degrade the free catalytic subunit, protein kinase M. *FEBS Lett.* **367**, 223–227 (1995).
  205. Shioda, N., Moriguchi, S., Shirasaki, Y. & Fukunaga, K. Generation of constitutively active calcineurin by calpain contributes to delayed neuronal death following mouse brain ischemia. *J. Neurochem.* **98**, 310–320 (2006).
  206. Goñi-Oliver, P., Lucas, J. J., Avila, J. & Hernández, F. N-terminal cleavage of GSK-3 by calpain: a new form of GSK-3 regulation. *J. Biol. Chem.* **282**, 22406–22413 (2007).
  207. Choi, Y. H. *et al.* Regulation of cyclin D1 by calpain protease. *J. Biol. Chem.* **272**, 28479–28484 (1997).
  208. Zhang, Y., Liu, N. M., Wang, Y., Youn, J. Y. & Cai, H. Endothelial cell calpain as a critical modulator of angiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis.* **1863**, 1326–1335 (2017).

209. Pariat, M. *et al.* Proteolysis by calpains: a possible contribution to degradation of p53. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2806–2815 (1997).
210. Chen, M. *et al.* Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J. Biol. Chem.* **276**, 30724–30728 (2001).
211. Yousefi, S. *et al.* Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat. Cell Biol.* **8**, 1124–1132 (2006).
212. Gafni, J., Cong, X., Chen, S. F., Gibson, B. W. & Ellerby, L. M. Calpain-1 cleaves and activates caspase-7. *J. Biol. Chem.* **284**, 25441–25449 (2009).
213. Mikosik, A. *et al.* Roles of calpain-calpastatin system (CCS) in human T cell activation. *Oncotarget* **7**, 76479–76495 (2016).
214. Välimäki, E. *et al.* Calpain Activity Is Essential for ATP-Driven Unconventional Vesicle-Mediated Protein Secretion and Inflammasome Activation in Human Macrophages. *J. Immunol.* **197**, 3315–3325 (2016).
215. Zhang, Y. *et al.* A Membrane Potential- and Calpain-Dependent Reversal of Caspase-1 Inhibition Regulates Canonical NLRP3 Inflammasome. *Cell Rep.* **24**, 2356–2369.e5 (2018).
216. Davis, M. A. *et al.* Calpain drives pyroptotic vimentin cleavage, intermediate filament loss, and cell rupture that mediates immunostimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 5061 LP – 5070 (2019).
217. Baudry, M. Calpain-1 and Calpain-2 in the Brain: Dr. Jekyll and Mr Hyde? *Curr. Neuropharmacol.* **17**, 823–829 (2019).
218. Ono, Y., Ojima, K., Shinkai-Ouchi, F., Hata, S. & Sorimachi, H. An eccentric calpain, CAPN3/p94/calpain-3. *Biochimie* **122**, 169–187 (2016).
219. Mahajan, V. B. *et al.* Calpain-5 mutations cause autoimmune uveitis, retinal neovascularization, and photoreceptor degeneration. *PLoS Genet.* **8**, e1003001 (2012).
220. Hata, S. *et al.* Calpain 8/nCL-2 and calpain 9/nCL-4 constitute an active protease complex, G-calpain, involved in gastric mucosal defense. *PLoS Genet.* **6**, e1001040 (2010).
221. Pánico, P., Salazar, A. M., Burns, A. L. & Ostrosky-Wegman, P. Role of calpain-10 in the development of diabetes mellitus and its complications. *Arch. Med. Res.* **45**, 103–115 (2014).
222. Zatz, M. & Starling, A. Calpains and Disease. *N. Engl. J. Med.* **352**, 2413–2423 (2005).
223. Hernando, V. *et al.* Calpain translocation and activation as pharmacological targets during myocardial ischemia/reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **49**, 271–279 (2010).
224. Inserte, J., Barba, I., Hernando, V. & Garcia-Dorado, D. Delayed recovery of intracellular acidosis during reperfusion prevents calpain activation and determines protection in postconditioned myocardium. *Cardiovasc. Res.* **81**, 116–122 (2009).
225. Armstrong, S. C., Latham, C. A., Shivell, C. L. & Ganote, C. E. Ischemic loss of sarcolemmal dystrophin and spectrin: correlation with myocardial injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **33**, 1165–1179 (2001).
226. Inserte, J. *et al.* Ischemic preconditioning attenuates calpain-mediated degradation of structural proteins through a protein kinase A-dependent mechanism\*. *Cardiovasc. Res.* **64**, 105–114 (2004).
227. Davies, P. J. *et al.* Filamin-actin interaction. Dissociation of binding from gelation by Ca<sup>2+</sup>-activated proteolysis. *J. Biol. Chem.* **253**, 4036–4042 (1978).
228. Nelson, W. J. & Traub, P. Proteolysis of vimentin and desmin by the Ca<sup>2+</sup>-activated proteinase specific for these intermediate filament proteins. *Mol. Cell. Biol.* **3**, 1146–1156 (1983).
229. Franco, S. J. *et al.* Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat. Cell Biol.* **6**, 977–983 (2004).
230. Cortesio, C. L., Boateng, L. R., Piazza, T. M., Bennin, D. A. & Huttenlocher, A. Calpain-mediated proteolysis of paxillin negatively regulates focal adhesion dynamics and cell



- migration. *J. Biol. Chem.* **286**, 9998–10006 (2011).
231. Li, Z. P., Burke, E. P., Frank, J. S., Bennett, V. & Philipson, K. D. The cardiac Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger binds to the cytoskeletal protein ankyrin. *J. Biol. Chem.* **268**, 11489–11491 (1993).
232. Mohler, P. J. *et al.* Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* **421**, 634–639 (2003).
233. Inserte, J., Garcia-Dorado, D., Hernando, V. & Soler-Soler, J. Calpain-mediated impairment of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity during early reperfusion contributes to cell death after myocardial ischemia. *Circ. Res.* **97**, 465–473 (2005).
234. Müller, A. L., Freed, D. & Dhalla, N. S. Activation of proteases and changes in Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase subunits in hearts subjected to ischemia-reperfusion. *J. Appl. Physiol.* **114**, 351–360 (2013).
235. French, J. P. *et al.* Ischemia-reperfusion-induced calpain activation and SERCA2a degradation are attenuated by exercise training and calpain inhibition. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **290**, H128–36 (2006).
236. Pedrozo, Z. *et al.* Calpains and proteasomes mediate degradation of ryanodine receptors in a model of cardiac ischemic reperfusion. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1802**, 356–362 (2010).
237. Maekawa, A. *et al.* Overexpression of calpastatin by gene transfer prevents troponin I degradation and ameliorates contractile dysfunction in rat hearts subjected to ischemia/reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **35**, 1277–1284 (2003).
238. Zhang, Z., Biesiadecki, B. J. & Jin, J.-P. Selective deletion of the NH<sub>2</sub>-terminal variable region of cardiac troponin T in ischemia reperfusion by myofibril-associated mu-calpain cleavage. *Biochemistry* **45**, 11681–11694 (2006).
239. Blunt, B. C., Creek, A. T., Henderson, D. C. & Hofmann, P. A. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activation of HSP25/27 protects desmin from calpain proteolysis in rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H1518–25 (2007).
240. Govindan, S. *et al.* Cardiac myosin binding protein-C is a potential diagnostic biomarker for myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **52**, 154–164 (2012).
241. Barefield, D. Y. *et al.* Ablation of the calpain-targeted site in cardiac myosin binding protein-C is cardioprotective during ischemia-reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **129**, 236–246 (2019).
242. Murphy, R. M. *et al.* Ca<sup>2+</sup>-dependent proteolysis of junctophilin-1 and junctophilin-2 in skeletal and cardiac muscle. *J. Physiol.* **591**, 719–729 (2013).
243. Guo, A. *et al.* Molecular Determinants of Calpain-dependent Cleavage of Junctophilin-2 Protein in Cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* **290**, 17946–17955 (2015).
244. Shintani-Ishida, K. & Yoshida, K.-I. Mitochondrial m-calpain opens the mitochondrial permeability transition pore in ischemia-reperfusion. *Int. J. Cardiol.* **197**, 26–32 (2015).
245. Cao, T. *et al.* Increased calpain-1 in mitochondria induces dilated heart failure in mice: role of mitochondrial superoxide anion. *Basic Res. Cardiol.* **114**, 17 (2019).
246. Zhang, Y. *et al.* Melatonin attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via improving mitochondrial fusion/mitophagy and activating the AMPK-OPA1 signaling pathways. *J. Pineal Res.* **66**, e12542 (2019).
247. Chen, Q., Thompson, J., Hu, Y., Dean, J. & Lesnfsky, E. J. Inhibition of the ubiquitous calpains protects complex I activity and enables improved mitophagy in the heart following ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **317**, C910–C921 (2019).
248. Kang, M.-Y. *et al.* Receptor-independent cardiac protein kinase Calpha activation by calpain-mediated truncation of regulatory domains. *Circ. Res.* **107**, 903–912 (2010).
249. Potz, B. A. *et al.* Calpain inhibition modulates glycogen synthase kinase 3 $\beta$  pathways in ischemic myocardium: A proteomic and mechanistic analysis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **153**, 342–357 (2017).
250. Aluja, D., Rodriguez-Lopez, A., Ruiz-Meana, M. & Inserte, J. Targeting calpains in

- myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cond. Med.* **3**, 160–170 (2020).
251. Yang, D. *et al.* Increased expression of calpain and elevated activity of calcineurin in the myocardium of patients with congestive heart failure. *Int. J. Mol. Med.* **26**, 159–164 (2010).
252. Ye, T. *et al.* Over-expression of calpastatin inhibits calpain activation and attenuates post-infarction myocardial remodeling. *PLoS One* **10**, e0120178 (2015).
253. Wan, F. *et al.* Calpastatin overexpression impairs postinfarct scar healing in mice by compromising reparative immune cell recruitment and activation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **309**, H1883–93 (2015).
254. Taneike, M. *et al.* Calpain protects the heart from hemodynamic stress. *J. Biol. Chem.* **286**, 32170–32177 (2011).
255. Han, Y., Weinman, S., Boldogh, I., Walker, R. K. & Brasier, A. R. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -inducible I $\kappa$ B $\alpha$  proteolysis mediated by cytosolic m-calpain. A mechanism parallel to the ubiquitin-proteasome pathway for nuclear factor- $\kappa$ B activation. *J. Biol. Chem.* **274**, 787–794 (1999).
256. Freund, C. *et al.* Requirement of nuclear factor- $\kappa$ B in angiotensin II- and isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in vivo. *Circulation* **111**, 2319–2325 (2005).
257. Burkard, N. *et al.* Targeted proteolysis sustains calcineurin activation. *Circulation* **111**, 1045–1053 (2005).
258. Wilkins, B. J. *et al.* Targeted disruption of NFATc3, but not NFATc4, reveals an intrinsic defect in calcineurin-mediated cardiac hypertrophic growth. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 7603–7613 (2002).
259. Reynolds, J. O. *et al.* Junctophilin-2 is necessary for T-tubule maturation during mouse heart development. *Cardiovasc. Res.* **100**, 44–53 (2013).
260. Sheng, W. *et al.* T-Tubule Remodeling During Transition From Hypertrophy to Heart Failure. *Circ. Res.* **107**, 520–531 (2010).
261. Minamisawa, S. *et al.* Junctophilin type 2 is associated with caveolin-3 and is down-regulated in the hypertrophic and dilated cardiomyopathies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**, 852–856 (2004).
262. Wu, C.-Y. C. *et al.* Calpain-dependent cleavage of junctophilin-2 and T-tubule remodeling in a mouse model of reversible heart failure. *J. Am. Heart Assoc.* **3**, e000527 (2014).
263. Guo, A. *et al.* Overexpression of junctophilin-2 does not enhance baseline function but attenuates heart failure development after cardiac stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 12240–12245 (2014).
264. Reynolds, J. O. *et al.* Junctophilin-2 gene therapy rescues heart failure by normalizing RyR2-mediated Ca<sup>2+</sup> release. *Int. J. Cardiol.* **225**, 371–380 (2016).
265. Matsumura, Y., Kusuoka, H., Inoue, M., Hori, M. & Kamada, T. Protective effect of the protease inhibitor leupeptin against myocardial stunning. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **22**, 135–142 (1993).
266. Yoshida, K., Sorimachi, Y., Fujiwara, M. & Hironaka, K. Calpain is implicated in rat myocardial injury after ischemia or reperfusion. *Jpn. Circ. J.* **59**, 40–48 (1995).
267. Arthur, G. D. & Belcastro, A. N. A calcium stimulated cysteine protease involved in isoproterenol induced cardiac hypertrophy. *Mol. Cell. Biochem.* **176**, 241–248 (1997).
268. Tissier, S. *et al.* Calpain inhibitors improve myocardial dysfunction and inflammation induced by endotoxin in rats. *Shock* **21**, 352–357 (2004).
269. Singh, R. B. & Dhalla, N. S. Ischemia-reperfusion-induced changes in sarcolemmal Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase are due to the activation of calpain in the heart. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **88**, 388–397 (2010).
270. Mehdi, S. Cell-penetrating inhibitors of calpain. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 150–153 (1991).
271. Mehdi, S., Angelastro, M. R., Wiseman, J. S. & Bey, P. Inhibition of the proteolysis of rat

- erythrocyte membrane proteins by a synthetic inhibitor of calpain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 1117–1123 (1988).
272. Mani, S. K. *et al.* Calpain inhibition preserves myocardial structure and function following myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **297**, H1744-51 (2009).
273. Gilchrist, J. S. C., Cook, T., Abrenica, B., Rashidkhani, B. & Pierce, G. N. Extensive autolytic fragmentation of membranous versus cytosolic calpain following myocardial ischemia-reperfusion. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **88**, 584–594 (2010).
274. Lubisch, W. *et al.* Benzoylalanine-derived ketoamides carrying vinylbenzyl amino residues: discovery of potent water-soluble calpain inhibitors with oral bioavailability. *J. Med. Chem.* **46**, 2404–2412 (2003).
275. Neuhof, C. *et al.* A novel water-soluble and cell-permeable calpain inhibitor protects myocardial and mitochondrial function in postischemic reperfusion. *Biol. Chem.* **384**, 1597–1603 (2003).
276. Neuhof, C. *et al.* Reduction of myocardial infarction by calpain inhibitors A-705239 and A-705253 in isolated perfused rabbit hearts. *Biol. Chem.* **385**, 1077–1082 (2004).
277. Khalil, P. N. *et al.* Calpain inhibition reduces infarct size and improves global hemodynamics and left ventricular contractility in a porcine myocardial ischemia/reperfusion model. *Eur. J. Pharmacol.* **528**, 124–131 (2005).
278. Jantos, K. *et al.* Discovery of ABT-957: 1-Benzyl-5-oxopyrrolidine-2-carboxamides as selective calpain inhibitors with enhanced metabolic stability. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **29**, 1968–1973 (2019).
279. Lon, H.-K. *et al.* Pharmacokinetics, Safety, Tolerability, and Pharmacodynamics of Alicapistat, a Selective Inhibitor of Human Calpains 1 and 2 for the Treatment of Alzheimer Disease: An Overview of Phase 1 Studies. *Clin. Pharmacol. drug Dev.* **8**, 290–303 (2019).
280. Luo, T. *et al.* PD150606 protects against ischemia/reperfusion injury by preventing  $\mu$ -calpain-induced mitochondrial apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.* **586**, 1–9 (2015).
281. Shinkai-Ouchi, F. *et al.* Predictions of Cleavability of Calpain Proteolysis by Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis Using Newly Determined Cleavage Sites and Catalytic Efficiencies of an Oligopeptide Array. *Mol. Cell. Proteomics* **15**, 1262–1280 (2016).
282. Wang, Y. *et al.* Calpain-1 and calpain-2 play opposite roles in retinal ganglion cell degeneration induced by retinal ischemia/reperfusion injury. *Neurobiol. Dis.* **93**, 121–128 (2016).
283. Ozaki, T., Yamashita, T. & Ishiguro, S. Ca<sup>2+</sup>-induced release of mitochondrial m-calpain from outer membrane with binding of calpain small subunit and Grp75. *Arch. Biochem. Biophys.* **507**, 254–261 (2011).
284. Ozaki, T. *et al.* Intravitreal injection or topical eye-drop application of a  $\mu$ -calpain C2L domain peptide protects against photoreceptor cell death in Royal College of Surgeons' rats, a model of retinitis pigmentosa. *Biochim. Biophys. Acta* **1822**, 1783–1795 (2012).
285. Chen, Q. *et al.* Activation of mitochondrial  $\mu$ -calpain increases AIF cleavage in cardiac mitochondria during ischemia-reperfusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **415**, 533–538 (2011).
286. Shirasaki, Y., Miyashita, H., Yamaguchi, M., Inoue, J. & Nakamura, M. Exploration of orally available calpain inhibitors: peptidyl alpha-ketoamides containing an amphiphile at P3 site. *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 4473–4484 (2005).
287. Shirasaki, Y., Yamaguchi, M. & Miyashita, H. Retinal penetration of calpain inhibitors in rats after oral administration. *J. Ocul. Pharmacol. Ther. Off. J. Assoc. Ocul. Pharmacol. Ther.* **22**, 417–424 (2006).
288. Shimazawa, M. *et al.* A novel calpain inhibitor, SNJ-1945, reduces murine retinal cell death &em>in vitro&em> and &em>in vivo&em>. *J. Pharmacol.*

- Exp. Ther.* jpet.109.156612 (2009). doi:10.1124/jpet.109.156612
289. Shanab, A. Y. *et al.* Metabolic stress response implicated in diabetic retinopathy: the role of calpain, and the therapeutic impact of calpain inhibitor. *Neurobiol. Dis.* **48**, 556–567 (2012).
  290. Trager, N. *et al.* Effects of a novel orally administered calpain inhibitor SNJ-1945 on immunomodulation and neurodegeneration in a murine model of multiple sclerosis. *J. Neurochem.* **130**, 268–279 (2014).
  291. Smith, A. W. *et al.* Calpain inhibition reduces structural and functional impairment of retinal ganglion cells in experimental optic neuritis. *J. Neurochem.* **139**, 270–284 (2016).
  292. Koumura, A. *et al.* A novel calpain inhibitor, ((1S)-1((((1S)-1-benzyl-3-cyclopropylamino-2,3-di-oxopropyl)amino)carbonyl)-3-methylbutyl) carbamic acid 5-methoxy-3-oxapentyl ester, protects neuronal cells from cerebral ischemia-induced damage in mice. *Neuroscience* **157**, 309–318 (2008).
  293. Takeshita, D. *et al.* A new calpain inhibitor protects left ventricular dysfunction induced by mild ischemia-reperfusion in in situ rat hearts. *J. Physiol. Sci.* **63**, 113–123 (2013).
  294. Penela, P., Murga, C., Ribas, C., Lafarga, V. & Mayor Jr, F. The complex G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) interactome unveils new physiopathological targets. *Br. J. Pharmacol.* **160**, 821–832 (2010).
  295. Inserte, J. *et al.* Activation of cGMP/protein kinase G pathway in postconditioned myocardium depends on reduced oxidative stress and preserved endothelial nitric oxide synthase coupling. *J. Am. Heart Assoc.* **2**, e005975 (2013).
  296. Al-Rasheed, N. M. *et al.* Vitamin D attenuates pro-inflammatory TNF- $\alpha$  cytokine expression by inhibiting NF- $\kappa$ B/p65 signaling in hypertrophied rat hearts. *J. Physiol. Biochem.* **71**, 289–299 (2015).
  297. Bohl, S. *et al.* Refined approach for quantification of in vivo ischemia-reperfusion injury in the mouse heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **297**, H2054-8 (2009).
  298. Murga, C., Penela, P., Zafra, F. & Mayor, F. J. The subcellular and cellular distribution of G protein-coupled receptor kinase 2 in rat brain. *Neuroscience* **87**, 631–637 (1998).
  299. García-Higuera, I. *et al.* Association of the regulatory beta-adrenergic receptor kinase with rat liver microsomal membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, 1348–1355 (1994).
  300. Rusinkevich, V. *et al.* Temporal dynamics of immune response following prolonged myocardial ischemia/reperfusion with and without cyclosporine A. *Acta Pharmacol. Sin.* **40**, 1168–1183 (2019).
  301. Cannavo, A. *et al.* GRK2 as a therapeutic target for heart failure. *Expert Opin. Ther. Targets* **22**, 75–83 (2018).
  302. Lucas, E. *et al.* Downregulation of G protein-coupled receptor kinase 2 levels enhances cardiac insulin sensitivity and switches on cardioprotective gene expression patterns. *Biochim. Biophys. Acta* **1842**, 2448–2456 (2014).
  303. Penela, P. Chapter Three - Ubiquitination and Protein Turnover of G-Protein-Coupled Receptor Kinases in GPCR Signaling and Cellular Regulation. in *Ubiquitination and Transmembrane Signaling* (ed. Shenoy, S. K. B. T.-P. in M. B. and T. S.) **141**, 85–140 (Academic Press, 2016).
  304. Zha, Z. *et al.* A Non-Canonical Function of G $\beta$  as a Subunit of E3 Ligase in Targeting GRK2 Ubiquitylation. *Mol. Cell* **58**, 794–803 (2015).
  305. Karni-Schmidt, O., Lokshin, M. & Prives, C. The Roles of MDM2 and MDMX in Cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **11**, 617–644 (2016).
  306. Islam, K. N. & Koch, W. J. Involvement of nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway in regulation of cardiac G protein-coupled receptor kinase 5 (GRK5) expression. *J. Biol. Chem.* **287**, 12771–12778 (2012).
  307. Mori, J. *et al.* Agonist-induced hypertrophy and diastolic dysfunction are associated with selective reduction in glucose oxidation: a metabolic contribution to heart failure

- with normal ejection fraction. *Circ. Heart Fail.* **5**, 493–503 (2012).
308. Sun, D., Zhang, F., Ma, T., Zhang, Y. & Liang, Z. Atorvastatin alleviates left ventricular remodeling in isoproterenol-induced chronic heart failure in rats by regulating the RhoA/Rho kinase signaling pathway. *Pharmacol. Rep.* **72**, 903–911 (2020).
309. Jia, K. *et al.* Senolytic Agent Navitoclax Inhibits Angiotensin II-Induced Heart Failure in Mice. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **76**, 452–460 (2020).
310. Grimm, D. *et al.* Development of heart failure following isoproterenol administration in the rat: role of the renin-angiotensin system. *Cardiovasc. Res.* **37**, 91–100 (1998).
311. Richards, D. A. *et al.* Distinct Phenotypes Induced by Three Degrees of Transverse Aortic Constriction in Mice. *Sci. Rep.* **9**, 5844 (2019).
312. Michael, L. H. *et al.* Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am. J. Physiol.* **269**, H2147-54 (1995).
313. Boluyt, M. O. *et al.* Heart failure after long-term supra-ventricular aortic constriction in rats\*. *Am. J. Hypertens.* **18**, 202–212 (2005).
314. Wang, Y. *et al.* Targeting Calpain for Heart Failure Therapy: Implications From Multiple Murine Models. *JACC. Basic to Transl. Sci.* **3**, 503–517 (2018).
315. Bhuiyan, M. S., Shioda, N. & Fukunaga, K. Chronic beta-AR activation-induced calpain activation and impaired eNOS-Akt signaling mediates cardiac injury in ovariectomized female rats. *Expert Opin. Ther. Targets* **13**, 275–286 (2009).
316. Sandmann, S., Yu, M. & Unger, T. Transcriptional and translational regulation of calpain in the rat heart after myocardial infarction--effects of AT(1) and AT(2) receptor antagonists and ACE inhibitor. *Br. J. Pharmacol.* **132**, 767–777 (2001).
317. Galvez, A. S. *et al.* Cardiomyocyte degeneration with calpain deficiency reveals a critical role in protein homeostasis. *Circ. Res.* **100**, 1071–1078 (2007).
318. Li, X. *et al.* Cleavage of I $\kappa$ B $\alpha$  by calpain induces myocardial NF- $\kappa$ B activation, TNF- $\alpha$  expression, and cardiac dysfunction in septic mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **306**, H833-43 (2014).
319. Deng, L., Huang, B., Qin, D., Ganguly, K. & El-Sherif, N. Calcineurin inhibition ameliorates structural, contractile, and electrophysiologic consequences of postinfarction remodeling. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **12**, 1055–1061 (2001).
320. Hamid, T. *et al.* Cardiomyocyte NF- $\kappa$ B p65 promotes adverse remodeling, apoptosis, and endoplasmic reticulum stress in heart failure. *Cardiovasc. Res.* **89**, 129–138 (2011).
321. Boston, D. R. *et al.* Effects of angiotensin II on intracellular calcium and contracture in metabolically inhibited cardiomyocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **285**, 716–723 (1998).
322. Shen, J. Isoprenaline enhances local Ca<sup>2+</sup> release in cardiac myocytes. *Acta Pharmacol. Sin.* **27**, 927–932 (2006).
323. Lu, Y.-M. *et al.* CaMKII $\delta$ B mediates aberrant NCX1 expression and the imbalance of NCX1/SERCA in transverse aortic constriction-induced failing heart. *PLoS One* **6**, e24724 (2011).
324. Schirone, L. *et al.* A Review of the Molecular Mechanisms Underlying the Development and Progression of Cardiac Remodeling. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 3920195 (2017).
325. Yoshikawa, Y. *et al.* Calpain inhibitor-1 protects the rat heart from ischemia-reperfusion injury: analysis by mechanical work and energetics. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **288**, H1690-8 (2005).
326. Kudo-Sakamoto, Y. *et al.* Calpain-dependent cleavage of N-cadherin is involved in the progression of post-myocardial infarction remodeling. *J. Biol. Chem.* **289**, 19408–19419 (2014).
327. Ibanez, B. *et al.* 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Socie. *Eur. Heart J.* **39**, 119–177 (2018).
328. Eckle, T. *et al.* Systematic evaluation of a novel model for cardiac ischemic

- preconditioning in mice. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **291**, H2533–H2540 (2006).
329. Sanchis, D., Llovera, M., Ballester, M. & Comella, J. X. An alternative view of apoptosis in heart development and disease. *Cardiovasc. Res.* **77**, 448–451 (2008).
330. Inserte, J. *et al.* Studies on the role of apoptosis after transient myocardial ischemia: genetic deletion of the executioner caspases-3 and -7 does not limit infarct size and ventricular remodeling. *Basic Res. Cardiol.* **111**, 18 (2016).
331. Kim, M.-J. *et al.* Calpain-dependent cleavage of cain/cabin1 activates calcineurin to mediate calcium-triggered cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 9870–9875 (2002).
332. Heineke, J. & Molkenin, J. D. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 589–600 (2006).
333. Abe, M., Oda, N. & Sato, Y. Cell-associated activation of latent transforming growth factor-beta by calpain. *J. Cell. Physiol.* **174**, 186–193 (1998).
334. Lokuta, M. A., Nuzzi, P. A. & Huttenlocher, A. Calpain regulates neutrophil chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 4006–4011 (2003).
335. Patterson, C., Portbury, A. L., Schisler, J. C. & Willis, M. S. Tear me down: role of calpain in the development of cardiac ventricular hypertrophy. *Circ. Res.* **109**, 453–462 (2011).
336. Letavernier, E. *et al.* The role of calpains in myocardial remodelling and heart failure. *Cardiovasc. Res.* **96**, 38–45 (2012).
337. Saleem, N., Prasad, A. & Goswami, S. K. Apocynin prevents isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in rat. *Mol. Cell. Biochem.* **445**, 79–88 (2018).
338. Han, F. *et al.* Inhibition of dystrophin breakdown and endothelial nitric-oxide synthase uncoupling accounts for cytoprotection by 3-[2-[4-(3-chloro-2-methylphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-5,6-dimethoxy-1-(4-imidazolylmethyl)-1H-indazole dihydrochloride 3.5 hydrate (DY-976). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **332**, 421–428 (2010).
339. Hullmann, J., Traynham, C. J., Coleman, R. C. & Koch, W. J. The expanding GRK interactome: Implications in cardiovascular disease and potential for therapeutic development. *Pharmacol. Res.* **110**, 52–64 (2016).
340. Mayor, F. *et al.* G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) as an integrative signalling node in the regulation of cardiovascular function and metabolic homeostasis. *Cell. Signal.* **41**, 25–32 (2018).
341. Ungerer, M., Böhm, M., Elce, J. S., Erdmann, E. & Lohse, M. J. Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* **87**, 454–463 (1993).
342. Penela, P., Ruiz-Gómez, A., Castaño, J. G. & Mayor, F. J. Degradation of the G protein-coupled receptor kinase 2 by the proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* **273**, 35238–35244 (1998).
343. Salcedo, A., Mayor, F. J. & Penela, P. Mdm2 is involved in the ubiquitination and degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *EMBO J.* **25**, 4752–4762 (2006).
344. Inuzuka, H. *et al.* Phosphorylation by casein kinase I promotes the turnover of the Mdm2 oncoprotein via the SCF(beta-TRCP) ubiquitin ligase. *Cancer Cell* **18**, 147–159 (2010).
345. Gélis, C., Mavon, A. & Vicendo, P. The Contribution of Calpains in the Down-regulation of Mdm2 and p53 Proteolysis in Reconstructed Human Epidermis in Response to Solar Irradiation. *Photochem. Photobiol.* **81**, 975–983 (2005).
346. Jean-Charles, P.-Y. *et al.* Mdm2 regulates cardiac contractility by inhibiting GRK2-mediated desensitization of  $\beta$ -adrenergic receptor signaling. *JCI insight* **2**, (2017).
347. Toth, A., Nickson, P., Qin, L. L. & Erhardt, P. Differential regulation of cardiomyocyte survival and hypertrophy by MDM2, an E3 ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* **281**, 3679–3689 (2006).
348. Lombardi, M. S. *et al.* Oxidative stress decreases G protein-coupled receptor kinase 2 in lymphocytes via a calpain-dependent mechanism. *Mol. Pharmacol.* **62**, 379–388

- (2002).
349. Kawano, S. *et al.* Blockade of NF-kappaB ameliorates myocardial hypertrophy in response to chronic infusion of angiotensin II. *Cardiovasc. Res.* **67**, 689–698 (2005).
  350. Gupta, S. *et al.* Prevention of cardiac hypertrophy and heart failure by silencing of NF-kappaB. *J. Mol. Biol.* **375**, 637–649 (2008).
  351. Sorriento, D. *et al.* Integrating GRK2 and NFkappaB in the Pathophysiology of Cardiac Hypertrophy. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **8**, 493–502 (2015).
  352. Oka, T. *et al.* Amelioration of retinal degeneration and proteolysis in acute ocular hypertensive rats by calpain inhibitor ((1S)-1-(((1S)-1-benzyl-3-cyclopropylamino-2,3-di-oxopropyl)amino)carbonyl)-3-methylbutyl)carbamic acid 5-methoxy-3-oxapentyl ester. *Neuroscience* **141**, 2139–2145 (2006).
  353. Suzuki, R., Oka, T., Tamada, Y., Shearer, T. R. & Azuma, M. Degeneration and dysfunction of retinal neurons in acute ocular hypertensive rats: involvement of calpains. *J. Ocul. Pharmacol. Ther. Off. J. Assoc. Ocul. Pharmacol. Ther.* **30**, 419–428 (2014).
  354. Toba, S. *et al.* Post-natal treatment by a blood-brain-barrier permeable calpain inhibitor, SNJ1945 rescued defective function in lissencephaly. *Sci. Rep.* **3**, 1224 (2013).
  355. Bains, M. *et al.* Pharmacological analysis of the cortical neuronal cytoskeletal protective efficacy of the calpain inhibitor SNJ-1945 in a mouse traumatic brain injury model. *J. Neurochem.* **125**, 125–132 (2013).
  356. Roczowski, A. *et al.* Myocardial MMP-2 contributes to SERCA2a proteolysis during cardiac ischaemia–reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **116**, 1021–1031 (2020).
  357. Ali, M. A. M., Stepanko, A., Fan, X., Holt, A. & Schulz, R. Calpain inhibitors exhibit matrix metalloproteinase-2 inhibitory activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **423**, 1–5 (2012).
  358. Turk, V. *et al.* Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1824**, 68–88 (2012).
  359. Liu, C.-L. *et al.* Cysteine protease cathepsins in cardiovascular disease: from basic research to clinical trials. *Nat. Rev. Cardiol.* **15**, 351–370 (2018).
  360. Cheng, X. W. *et al.* Superoxide-Dependent Cathepsin Activation Is Associated with Hypertensive Myocardial Remodeling and Represents a Target for Angiotensin II Type 1 Receptor Blocker Treatment. *Am. J. Pathol.* **173**, 358–369 (2008).
  361. Siklos, M., BenAissa, M. & Thatcher, G. R. J. Cysteine proteases as therapeutic targets: does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. *Acta Pharm. Sin. B* **5**, 506–519 (2015).
  362. Ji, J., Su, L. & Liu, Z. Critical role of calpain in inflammation. *Biomed. reports* **5**, 647–652 (2016).
  363. Roberts, R. E. & Hallett, M. B. Neutrophil Cell Shape Change: Mechanism and Signalling during Cell Spreading and Phagocytosis. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1383 (2019).











Laboratori Malalties Cardiovasculars.  
Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR)

Departament de Medicina