

Informe resultados obtenidos tras la administración de NAP9 en cerdos sometidos a infarto agudo de miocardio

La super-oxigenación tras la reperfusión coronaria genera daños por reperfusión, en parte por la infiltración macrófagica que contribuye a la activación de enzimas proteolíticas, incluyendo las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs), efectores principales de la necrosis ventricular¹. De entre los distintos estímulos, la presencia de EMMPRIN (Extracellular Matrix Metalloproteinase INducer) ventricular es un factor indispensable para la su activación, que culmina con la necrosis final del cardiomiocito². Nosotros hemos descrito en un modelo murino de isquemia/reperfusión coronaria, la relevancia de EMMPRIN como diana frente al desarrollo del infarto agudo de miocardio¹, y más recientemente, el uso de nanopartículas conjugadas con un péptido de unión a EMMPRIN (AP9, figura 1), ha desvelado su potencial como herramienta terapéutica en prevención de la necrosis³. De forma previa a su estudio clínico, hemos evaluado la capacidad del uso de nanotecnología en un modelo porcino de isquemia/reperfusión coronaria sobre la progresión de la necrosis miocárdica.

Hemos realizado un estudio porcino con 15 hembras Yorkshire albinas, 5 sin infartar, y las restantes anestesiadas mediante administración intravenosa de propofol (2 ml/kg/h) y fentanilo (50 mg/kg/h), y sometidas 45 minutos de oclusión de la descendente anterior (DA) media mediante inflado de balón, tras lo que procedimos a inyectar 10 mg/kg NAP9, o NAPSC (figura 1A), las cuales contienen el péptido AP9 (NAP9), de unión específica a EMMPRIN³ o un péptido “scramble” (NAPSC), utilizado como control. Evaluamos la función miocárdica de forma previa y tras 7 días post-infarto mediante ecocardiografía, tras lo cual analizamos en el tejido la presencia de las nanopartículas (microscopía confocal), la integridad del miocardio (tinción histológica con eosina/hematoxilina), la extensión del área necrosada (Tinción con trifenil tetrazolium (TTC)), la expresión de EMMPRIN, MMP-9 y MMP-13, como marcadores de necrosis.

El efecto citotóxico de NAP9 se estudió en cerdos inyectados a las dosis de 0, 10 y 50 mg/kg, midiendo los niveles séricos de Aspartato Transaminasa (AST) y Alanina Transaminasa (ALT) como marcadores de daño hepático, Creatinina (CRE) como marcador renal y Creatinina quinasa-MB (CK-MB) como marcador de necrosis cardiaca, mostrando la ausencia total de citotoxicidad a la dosis de 10 mg/kg (figura 1B). La biodistribución de NAP9 se analizó mediante microscopía confocal en secciones de corazón, hígado, riñón, páncreas, bazo, pulmón, vejiga e intestino, tras 7 días de IR e inyectados con 10 mg/kg NAP9, observando la mayor captación de NAP9 en los corazones y los pulmones de los cerdos inyectados (figura 1C).

El efecto de NAP9 sobre la progresión del IAM se estudió mediante inyección de 10 mg/kg NAP9 o NAPSC tras 15 minutos de reperfusión de la DA, observando cómo la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI, estimada en modo B Simpson biplano y en modo M (Teichholz), con similares resultados) de los cerdos inyectados con NAP9, resultó significativamente superior a la de los animales control (NAP9 IR7 (51.7% ± 3.5) vs Control IR7 (45.2% ± 2.2), $p < 0.05$, figura 2A), mientras que la extensión del área necrosada expresada como porcentaje de la superficie total del ventrículo izquierdo (Control (28.05% ± 3.68) vs NAP9 (16.08% ± 4.96), $p < 0.0003$, figura 2B), la expresión de MMP-9 y MMP-13, indicativos de necrosis por degradación de la matriz extracelular (figura 2C) se redujeron en los cerdos tratados con NAP9.

La visualización de las nanopartículas inyectadas fué llevada a cabo en los animales sometidos a isquemia/reperfusión coronaria e inyectados con NAP9 o NAPSC mediante resonancia magnética nuclear en un equipo Philips 3Teslas, con secuencias específicas en T1 y T2, detectando un realce de gadolinio del ventrículo izquierdo en

los animales sometidos a la administración de NAP9 en las condiciones anteriormente citadas (figura 3).

El uso de nanotecnología aplicada al tratamiento y la prevención de los daños por reperfusión es una disciplina con resultados prometedores para la clínica^{4, 5}. En conclusión, el tratamiento de cerdos sometidos a isquemia/reperfusión coronaria con NAP9, reduce significativamente la extensión del infarto mejorando la funcionalidad ventricular, al menos, a través de la reducción de la necrosis asociada a la degradación de la matriz extracelular.

Bibliografía

1. Tarin C, Lavin B, Gomez M, et al. The extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN is a target of nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51: 387-95.
2. Schmidt R, Bültmann A, Ungerer M, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates matrix metalloproteinase activity in cardiovascular cells: implications in acute myocardial infarction. *Circulation.* 2006;113: 834-41.
3. Cuadrado I, Piedras MJ, Herruzo I, et al. EMMPRIN-Targeted Magnetic Nanoparticles for In Vivo Visualization and Regression of Acute Myocardial Infarction. *Theranostics.* 2016; 6: 545-57.
4. Yilmaz A. Visualising inflammation after myocardial infarction with the use of iron oxide nanoparticles. *Heart.* 2017;103: 1479-1480
5. Yilmaz A, Rösch S, Yildiz H, et al. First multiparametric cardiovascular magnetic resonance study using ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles in a patient with acute myocardial infarction: new vistas for the clinical application of ultrasmall superparamagnetic iron oxide. *Circulation.* 2012 Oct 9;126(15):1932-4

Figuras

A

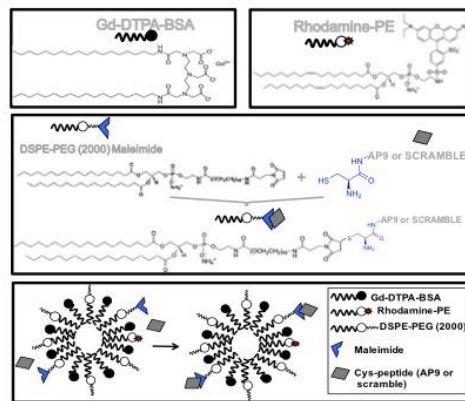
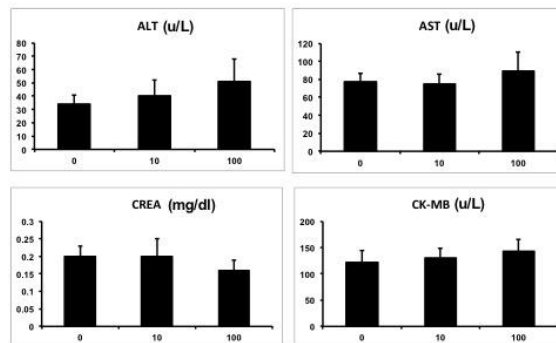


Figura 1

B



C

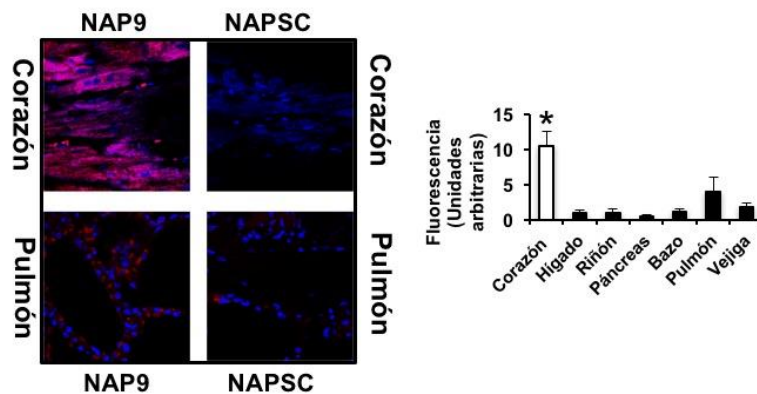
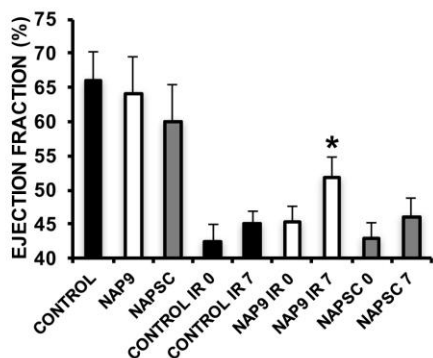


Figura 1. A. Estructura de las nanopartículas que contienen AP9 (NAP9) o el péptido control (scramble) (NAPSC). **B.** Producción de Alanina Transaminasa (ALT), Aspartato Transaminasa (AST), Creatinina (CRE) y Creatinina Quinasa-MB (CK-MB), tras administrar 10 mg/kg NAP9. (N=5, media \pm desviación estándar). **C. Panel izquierdo.** Detección de NAP9 y NAPSC por microscopia confocal en secciones de corazón y pulmón tras 7 días de isquemia/reperfusión coronaria e inyección de 10 mg/kg NAP9 o NAPSC. **Panel derecho:** Distribución de NAP9 tras 7 días de isquemia/reperfusión coronaria e inyección de 10 mg/kg NAP9, en los tejidos que se indica (N=10, media \pm desviación estándar, * $p < 0.05$, corazón vs pulmón).

A

	Control	NAP9	NAPSC
Pre IR	66.3 ± 4.2	64.14 ± 5.5	60 ± 5.3
IR t0	42.54 ± 2.4	45.25 ± 2.6	43.2 ± 2.2
IR t7	45.2 ± 2.2	51.7 ± 3.5	46.05 ± 2.9

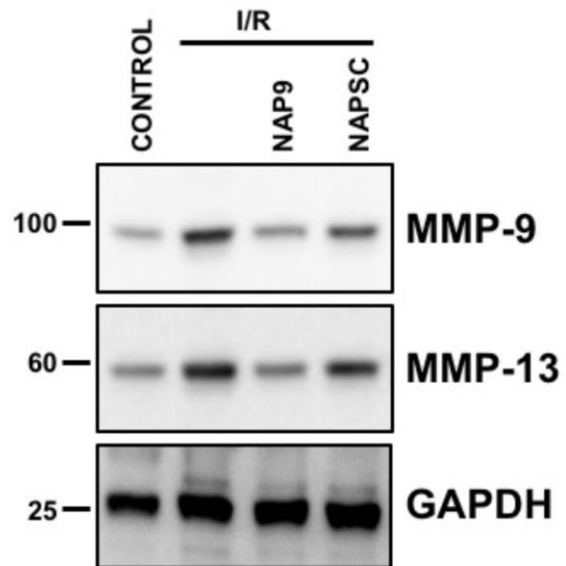
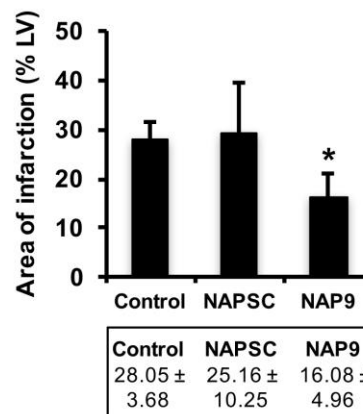
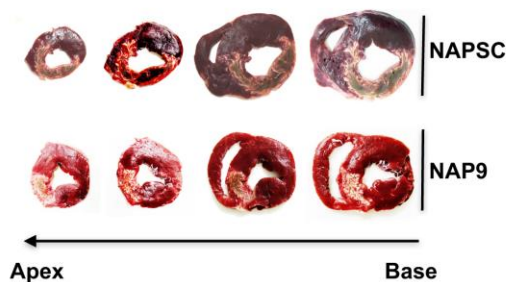
C**B**

Figura 2. A. Panel Superior. Fracción de eyección del ventrículo izquierdo de cerdos sin infartar o infartados e inyectados o no con 10 mg/kg NAP9 o NAPSC. (N=15, media ± desviación estándar, *p<0.05 NAP9 IR 7 vs CONTROL IR 7). **Panel Inferior.** Tabla de valores de la fracción de eyección previa al procedimiento, tras la IR (IR0) y tras 7 días de IR (IR7). **B. Panel izquierdo.** Secciones seriadas de 0.5 cm de los corazones de cerdos inyectados con NAP9 o NAPSC. Panel derecho. Tabla de valores del área infartada expresada como porcentaje respecto a la superficie total ventricular (N=15, media ± desviación estándar, *p<0.0003 NAP9 vs CONTROL). **C.** Detección de MMP-9 y MMP-13 en los corazones de cerdos inyectados con NAP9 o NAPSC tras 7 días de isquemia/reperfusión. GAPDH se ha utilizado como control (N=15)

Figura 3

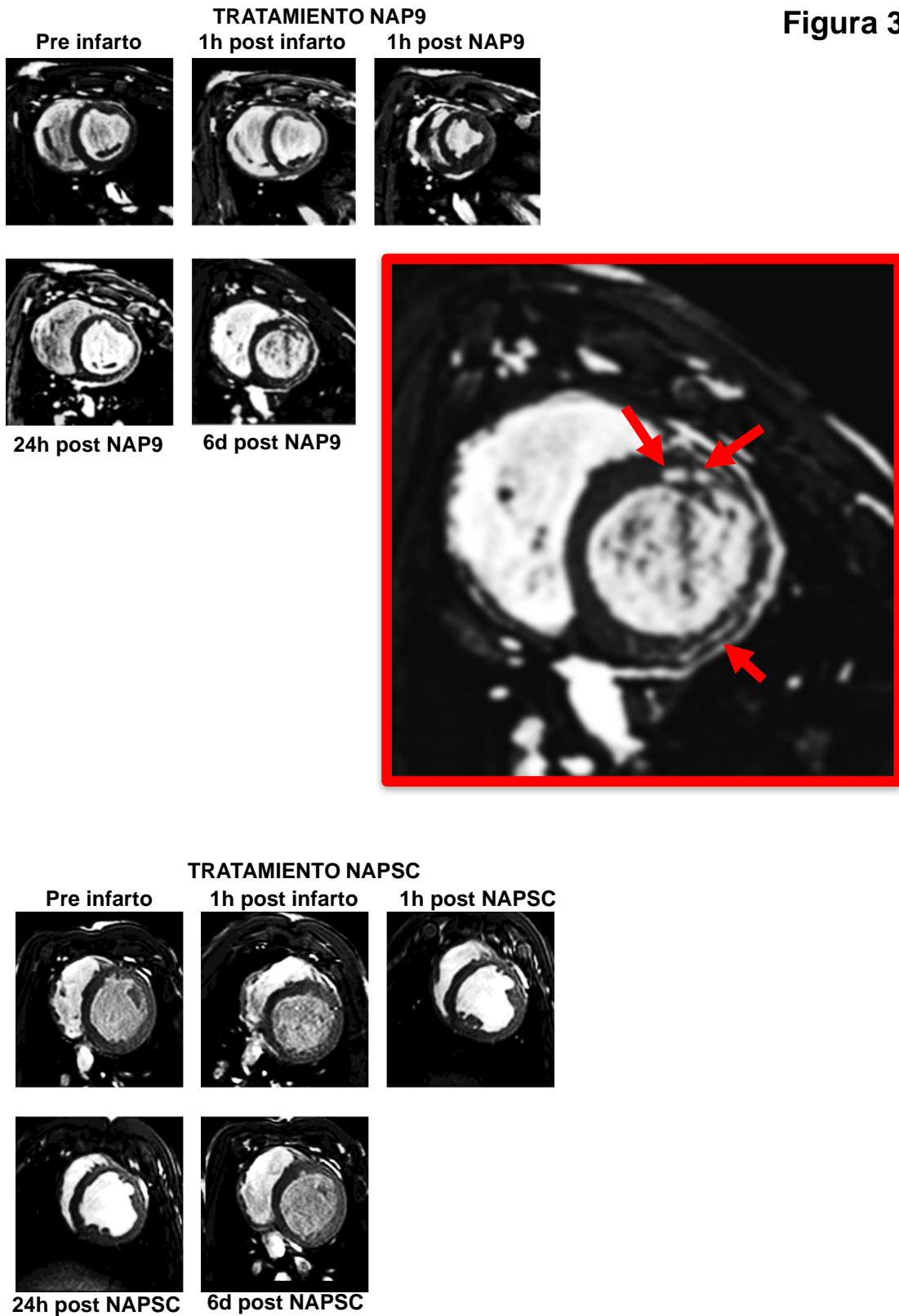


Figura 3. Resonancia magnética de cerdos infartados sometidos a la inyección de 10 mg/kg NAP9 o NAPSC, observando el realce de gadolinio en el eje corto parasternal de los cerdos tratados con NAP9 en la pared del ventrículo izquierdo, como se observa en la magnificación (cuadro rojo), tras los 6 días posteriores al tratamiento..