

Unidad Mixta de Investigación Cardiovascular Traslacional

Universidad Francisco de Vitoria

Hospital Universitario Ramón y Cajal

**NANOTECNOLOGÍA APLICADA AL CONTROL DE LA
REMODELACIÓN CARDIACA MEDIANTE LA REGULACIÓN
DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN MODELOS
ANIMALES DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN CORONARIA**

TESIS DOCTORAL

DIRECTOR

CARLOS ZARAGOZA SÁNCHEZ

DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA, MEDICINA Y CIENCIAS
BIOSANITARIAS

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

LAURA TESORO SANTOS

Madrid, 2022

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR PARA LA PRESENTACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

D. Carlos Zaragoza Sánchez, Doctor en Genética por la Universidad Complutense de Madrid y Profesor de la Facultad de Medicina de la Universidad Francisco de Vitoria, como director

AUTORIZA

La presentación de la presente memoria titulada “Nanotecnología aplicada al control de la remodelación cardíaca mediante la regulación de la respuesta inflamatoria en modelos animales de isquemia-reperfusión coronaria”, que presenta la Graduada en Biología y Máster en Genética y Biología Celular por la Universidad Autónoma de Madrid, Dña Laura Tesoro Santos para la obtención del grado de Doctora por la Universidad Francisco de Vitoria.

Fdo: Carlos Zaragoza

En Madrid, a 15 de Julio de 2022

DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA, MEDICINA Y CIENCIAS BIOSANITARIAS

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE VITORIA

Agradecimientos

Para empezar, quiero darle gracias infinitas a mi equipo del Hospital Ramón y Cajal:

Al Doctor Carlos Zaragoza, mi director de tesis, por haberme convertido en una verdadera científica. Te agradezco profundamente haberme hecho parte de este maravilloso grupo y la excelente dirección que has realizado de este trabajo. Gracias por tu tiempo y por todos los momentitos que se convirtieron en grandes y enriquecedoras charlas. Por darme todos los medios que has podido para hacer frente a este proyecto, y por ponerme los pies en la tierra cuando lo he necesitado. Gracias una vez más por todo el tiempo que has invertido en tejer e impulsar mi carrera investigadora. Me has ayudado a crecer como una auténtica profesional. Esta etapa se ha terminado como se termina todo, pero lo que me has enseñado permanecerá. Has sido un maestro inigualable.

A mis compañeros: Javo, Wigs, Cypo, Alchirini y B. Habéis hecho la parte más importante de esta tesis. Todos estos años me habéis dado una felicidad inmensa, que ya es por sí sola una altísima recompensa en esta travesía. Habéis sido una familia para mí desde el principio, alegrando mis días y acompañándome pacientemente en los malos. Me habéis sacado de quicio solo por hacerme reír y habéis sabido comprenderme y calmarme. “La tesis de todos” no hubiera sido posible sin el incesante trabajo, la ilusión y las ganas de cada uno de vosotros y eso es algo que os voy a agradecer siempre. Si he llegado hasta aquí es gracias al equipo que formamos. Ha sido un privilegio aprender de cada uno de vosotros y compartir tantos momentos que recuerde cuando los recuerde siempre me harán llorar de la risa –desde la menos tercer hasta el antipuerco conjuguido—. Soy vuestro número fan.

A Bea, por ser mi gran ayuda, siempre tan alegre y dispuesta. Gracias por dejarme aprender de tí y no perder nunca el entusiasmo.

A la Doctora Marta Saura, quiero agradecerle tu imprescindible participación en el desarrollo de esta tesis. Gracias por invitarme siempre a participar como una más en tu laboratorio de la Universidad de Alcalá y, tan generosamente, ofrecerme todos los medios que necesitaba para iniciar este proyecto desde cero. A cada paso, me he sentido tremendamente acompañada por ti y por el resto del grupo. Gracias al equipo al completo, que me ayudó a caminar: Paula, Sandra y Alberto, gracias por vuestra disponibilidad y apoyo en este trabajo, que es de todos vosotros también.

Gracias al grupo de Cirugía Experimental del IdiPAZ, por haberme dado facilidades y medios para sacar adelante todo este laborioso trabajo de experimentación animal. Me habéis enseñado muchísimo y habéis supervisado cada proyecto con absoluta dedicación. Gracias especialmente a Carlota por su cariñosa atención, a Sonsoles por su rigurosa supervisión, y a Isa y a Mar, gracias por ser tan buenas profesionales.

Este trabajo está especialmente dedicado a los brazos que me sostienen permanentemente: mi familia. Mis padres, mi hermana e Iñaki.

A mis padres, Adela y Juan, por alentarme desde el cariño, el apoyo incondicional y la paciencia. Por impulsarme siempre a hacer realidad mis sueños. Habéis sembrado en mí el espíritu de sacrificio, me habéis sabido motivar desde que era una niña y me habéis educado de la mejor manera posible: libre. A Ada, mi hermana pequeña, por ser una de las pocas personas que puede entenderme en todo el mundo, y desde ese rincón haberme dado el impulso que necesitaba a cada paso. Si hay alguien que me haya curado de todo habéis sido vosotros tres con vuestra energía y vuestro amor.

A Iñaki, tú eres el sol de mi vida. Gracias por instarme a alcanzar mis metas y brindarme todo tu apoyo desde las gradas.

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio de Investigación Cardiovascular Traslacional del Hospital Universitario Ramón y Cajal – Universidad Francisco de Vitoria con financiación del Ministerio de Ciencia e Innovación, la Agencia Estatal de Investigación y la Unión Europea.

Índice

Glosario de siglas, acrónimos y abreviaturas	1
Resumen	7
Summary	11
Introducción	15
LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES: EL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO.....	17
1. Definición y epidemiología	17
2. Factores de riesgo cardiovascular	18
3. Prevención de las ECV	18
4. Cardiopatía isquémica.....	19
5. Síndrome Coronario Agudo (SCA).....	19
5.1. Diagnóstico y biomarcadores en el SCA	20
6. Infarto Agudo de Miocardio (IAM).....	22
6.1. Fisiopatología del IAM.....	24
RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE AL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO	27
7. La respuesta inflamatoria	27
8. Efectores principales de la respuesta inflamatoria: monocitos y macrófagos	27
8.1. Clasificación de los macrófagos	30
9. Resolución de la respuesta inflamatoria: papel de la Interleuquina 10.....	32
9.1. Receptor de IL-10: estructura y expresión	33
9.2. Mecanismo de acción de IL-10	33
9.3. Papel del factor de transcripción NF- κ B.....	35
NUEVAS TERAPIAS EN EL TRATAMIENTO DEL IAM	36
10. Nanotecnología.....	36
10.1. Imagen molecular no invasiva en patología cardiovascular	37
11. Papel de NIL10 en el Infarto Agudo de Miocardio	38
Hipótesis	39
Objetivos	43
Material y métodos	47
1. GENERACIÓN DE LA NANOPARTÍCULA NIL10.....	49
2. MODELOS ANIMALES DE ISQUEMIA/REPERFUSIÓN CORONARIA	50
2.1. Modelo murino	50
2.2. Modelo porcino.....	53
3. DETERMINACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD CARDIACA MEDIANTE ECOCARDIOGRAFÍA	57
4. VISUALIZACIÓN DEL ÁREA DAÑADA POR RESONANCIA MAGNÉTICA CARDIACA EN RATÓN.....	58

5.	PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS TISULARES Y ANÁLISIS HISTOLÓGICO	59
5.1.	Estudios de biodistribución por inmunofluorescencia	59
5.2.	Análisis de la preservación de la estructura cardiaca en animales infartados	60
5.3.	Inmunohistoquímica del área necrótica cardiaca	60
5.4.	Análisis histopatológico por Evans blue/TTC	60
6.	ANÁLISIS DE POBLACIONES CELULARES MEDIANTE SUSPENSIÓN DE CÉLULAS INDIVIDUALES.....	62
6.1.	Marcaje de macrófagos miocárdicos	62
6.2.	Determinación de poblaciones de macrófagos por citometría de flujo.....	62
7.	CULTIVOS CELULARES.....	63
7.1.	Ensayos de especificidad de NIL10.....	64
7.2.	Ensayos de activación de macrófagos y estudio de la ruta de señalización IL-10R/STAT3 por inmunofluorescencia	64
8.	ESTUDIOS DE EXPRESIÓN PROTEICA	65
8.1.	Análisis de citoquinas y quimioquinas en plasma	65
8.2.	Extracción y cuantificación de proteína	65
8.3.	Detección de proteínas mediante inmunoblot (Western blot)	66
9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	67
	Resultados	69
1.	Diseño experimental	71
2.	Síntesis y caracterización físico-química de las nanopartículas NIL10 y NIL10SC.....	72
3.	Caracterización funcional de NIL10.....	73
4.	Viabilidad, citotoxicidad y biodistribución de NIL10 en animales de experimentación	75
5.	NIL10 presenta un efecto cardioprotector en animales sometidos a I/R miocárdica.....	77
6.	NIL10 previene la inflamación y la necrosis del tejido cardiaco tras la I/R	81
7.	NIL10 incide sobre la respuesta inflamatoria de manera sistémica	88
8.	Caracterización del efecto de NIL10 en la respuesta inmune local: la polarización de macrófagos	90
9.	Base molecular del efecto cardioprotector de NIL10	92
10.	El poder anti-inflamatorio de NIL10 a través de la ruta IL-10R/STAT3	94
	Discusión	97
1.	Infarto Agudo de Miocardio y terapias anti-inflamatorias	99
2.	STAT3 en la respuesta anti-inflamatoria	103
3.	Resumen gráfico	108

Conclusiones	109
Bibliografía	113
Anexo	127
1. Artículos científicos publicados en el contexto de la investigación.....	129
2. Comunicaciones orales presentadas en congresos internacionales asociadas al proyecto de investigación.....	131
3. Patentes presentadas	133

Índice de figuras

Figura 1. Principales causas de fallecimientos en Europa en los últimos 5 años	17
Figura 2. Fisiopatología de los SCA	20
Figura 3. Anatomía cardiaca general y detalle anatómico del IAM.....	23
Figura 4. Esquema del proceso inflamatorio y la diferenciación de los TRM o los monocitos en macrófagos.....	29
Figura 5. Progresiva polarización de macrófagos entre las fases pro-inflamatoria y resolutive de la respuesta inflamatoria desencadenada tras el IAM	31
Figura 6. Ruta de señalización IL-10/STAT3	34
Figura 7. Ruta de señalización canónica para la activación de NF- κ B.	36
Figura 8. Estructura de los componentes de NIL10 o NIL10SC.	38
Figura 9. Procedimiento de I/R cardiaca en ratón.....	51
Figura 10. Detalle procedimiento I/R en ratón	51
Figura 11. Evaluación de la función cardiaca durante el procedimiento de I/R cardiaca.....	52
Figura 12. Animal en mesa quirúrgica durante el procedimiento de I/R coronaria.....	54
Figura 13. Funcionamiento del balón de angioplastia durante el procedimiento de I/R.....	55
Figura 14. Evaluación de la función cardiaca del cerdo durante el procedimiento de I/R miocárdica.....	56
Figura 15. Cara anterior del corazón de cerdo.....	57
Figura 16. Infusión de Evans blue mediante acceso percutáneo femoral	61
Figura 17. Diseño experimental del trabajo de investigación.....	71
Figura 18. Fórmula estructural de los componentes de la nanopartícula NIL10 y NIL10SC.	73
Figura 19. Especificidad de NIL10 por su diana IL-10RA en células RAW 264.7.....	74
Figura 20. Dosis efectiva y biodistribución de las nanopartículas en ratón.....	76
Figura 21. Biodistribución de las nanopartículas NIL10 y NIL10SC en cerdo	77
Figura 22. El tratamiento con NIL10 induce cardioprotección en modelos animales de I/R tras 7 días de reperfusión	79
Figura 23. NIL10 se une de manera específica a la zona lesionada del corazón tras un IAM	80
Figura 24. NIL10 reduce la inflamación en el corazón de ratones sometidos a I/R	82
Figura 25. NIL10 reduce el tejido fibrótico en el corazón de ratones sometidos a I/R	83
Figura 26. NIL10 reduce la expresión de MMP-9 en el corazón de ratones sometidos al procedimiento de I/R tras 7 días de reperfusión.....	86
Figura 27. NIL10 induce cardioprotección en cerdos sometidos a I/R.	87
Figura 28. NIL10 reduce la inflamación y fibrosis en el corazón de cerdos sometidos al procedimiento de I/R tras 7 días de reperfusión.....	84
Figura 29. NIL10 induce la expresión de moléculas anti-inflamatorias	89

Figura 30. NIL10 induce la polarización de macrófagos hacia un fenotipo resolutivo (M2)	91
Figura 31. NIL10 induce la activación de la vía IL-10R-STAT3	93
Figura 32. NIL10 impide la translocación al núcleo de NF- κ B en macrófagos RAW 264.7	95
Figura 33. NIL10 impide la translocación al núcleo de NF- κ B vía STAT3 en RAW 264.7	96
Figura 34. Resumen gráfico del efecto de NIL10 en la polarización de macrófagos cardiacos.	105
Figura 35. Resumen gráfico del proyecto de investigación	108

Índice de tablas

Tabla 1. Tipos de IAM según Killip y Kimball	23
Tabla 2. Descripción de los péptidos conjugados en las nanopartículas NIL10 y NIL10SC	49
Tabla 3. Anticuerpos utilizados en las técnicas de inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, citometría de flujo y Western Blot.....	63
Tabla 4. Citoquinas detectadas y clasificadas en función de su naturaleza.....	65
Tabla 5. Datos físico-químicos de las nanopartículas.	72

Glosario de siglas, acrónimos y abreviaturas

ACTP: Angioplastia Coronaria Transluminal Percutánea
ACK: tampón de amonio-potasio (*Ammonium-Chloride-Potassium*)
ADN: ácido desoxirribonucleico
AINE: Anti-Inflamatorios No Esteroideos
AMI: *Acute Myocardial Infarction*
ATP: adenosín trifosfato (*Adenosine Triphosphate*)
BSA: albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*)
Ca²⁺: Calcio
CCR2: receptor de quimioquinas c-c tipo 2 (*C-C Chemokine Receptor type 2*)
CD14: Cluster de Diferenciación 14
CD16: Cluster de Diferenciación 16
CD68: Cluster de Diferenciación 68
CD80: Cluster de Diferenciación 80
CD172a: Cluster de Diferenciación 172a
CD200: Cluster de Diferenciación 200
CD206: receptor de manosa (*Cluster of Differentiation 206*)
COX: ciclooxigenasa
CRP: proteína c reactiva (*C-Reactive Protein*)
CSIF: factor de inhibición de la síntesis de citoquinas (*Cytokine Synthesis Inhibitory Factor*)
CVD: *Cardiovascular Diseases*
DA: arteria coronaria descendente anterior
DAB: diaminobencidina
DAMPs: patrones moleculares asociados al daño (*Damage Associated Molecular Patterns*)
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol (*4',6-Diamidino-2-Phenylindole*)
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DPX: resina acrílica con base de xileno
ECACC: colección europea de cultivos celulares (*European Collection of Cell Culture*)
ECG: electrocardiograma
ECV: enfermedades cardiovasculares
EDTA: ácido etilendiaminetetraacético (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)
EMMPRIN: proteína activadora de metaloproteinasas (*Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer*)
FACS: tampón 1% FBS en PBS 1x
FBS: suero bovino fetal (*Fetal Bovine Serum*)
FE: fosfatidiletanolamina
FC: Frecuencia Cardiaca
FEVI: Fracción de Eyección del Ventrículo Izquierdo
FITC: isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein Isothiocyanate*)
FRCV: factores de riesgo cardiovascular
FS: fracción de acortamiento del ventrículo izquierdo (*Fractional Shortening*)
GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GlycerAldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase*)
GC: Gasto Cardiaco
Gd-DTPA: gadolinio (*gadopentatic acid-ddiethylenetriaminepentacetate*)
GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*)
HE: Hematoxilina/Eosina
HLPC: cromatografía de líquidos de alto rendimiento (*High Performance Liquid Chromatography*)
IAM: Infarto Agudo de Miocardio
IC: Insuficiencia Cardiaca

IFN: interferón
IFNR: receptor de interferón (*Interferon Receptor*)
IFN- γ : interferón gamma
I κ B: proteínas secuestradoras de NF- κ B (*NF- κ B inhibitor*)
IKK: quinasa I κ B (*IKappaB Kinase*)
IKK α : subunidad catalítica alfa de IKK
IKK β : subunidad catalítica beta de IKK
IL-10: interleuquina-10
IL-10R: receptor de la interleuquina-10 (*Interleukin-10 Receptor*)
IL-10RA: subunidad alfa del receptor de IL-10
IL-10RB: subunidad beta del receptor de IL-10
iNOS: sintasa de óxido nítrico inducible (*Inducible Nitric Oxide Synthase*)
IVS: grosor del tabique intraventricular diastólico (*Intraventricular Septum Thickness*)
I/R: Isquemia-Reperfusión
JAK1: janus tirosina quinasa (*Janus Kinase 1*)
LPS: lipopolisacárido bacteriano (*lipopolysaccharide*)
LTA: ácido lipoteicoico (*Lipoteichoic Acid*)
LVID: diámetro interno de sístole y diástole en el ventrículo izquierdo (*Left Ventricular Internal Diameter*)
LVPW: grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo en sístole y diástole (*Left Ventricular Posterior Wall*)
LyC6: complejo antigénico de linfocitos 6 (*Lymphocyte Antigen 6 Complex*)
MEC: matriz extracelular
MET: Microscopía Electrónica de Transmisión
MHC II: complejo mayor de histocompatibilidad 2 (*Major Histocompatibility Complex 2*)
MMPs: metaloproteinasas de matriz (*Matrix MetalloProteinases*)
M-CSF: factor estimulante de colonias de monocitos (*Macrophage Colony Stimulating Factor*)
NEMO: modulador esencial de NF- κ B (*NF-kappa-B Essential Modulator*)
NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (*Nuclear Factor Kappa light chain enhancer of activated B cells*)
NPs: nanopartículas
NLS: dominio de localización nuclear (*Nuclear Localization Sequence*)
oxLDL: lipoproteína de baja densidad oxidada (*Oxidized Low-Density Lipoprotein*)
P/S: penicilina/estreptomina
PBS: tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*)
PDI: índice de polidispersión
PE: ficoeritrina (*Phycoerythrin*)
PEG: polietilenglicol
PFA: paraformaldheído
PGN: peptidoglicano
PHR: peroxidasa de rábano
PRR: receptores de reconocimiento de patrones (*Pattern Recognition Receptors*)
PVDF: polifluoruro de vinilideno (*PolyVinylidene Fluoride*)
RHD: dominio de homología Rel (*Rel Homology Domain*)
RM: Resonancia Magnética
ROS: especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*)
RTG: Realce Tardío de Gadolinio
SCA: Síndrome Coronario Agudo
SCACEST: Síndrome Coronario Agudo Con Elevación del segmento ST
SCASEST: Síndrome Coronario Agudo Sin Elevación del segmento ST
SCORE: *Systemic Coronary Risk Estimation*
SDS: dodecilsulfato sódico (*Sodium Dodecyl Sulfate*)

SOCS: supresor de la señalización por citoquinas (*Suppressors Of Cytokine Signaling*)
STAT1: transductor de señal y activador de la transcripción 1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 1*)
STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*)
STAT5: transductor de señal y activador de la transcripción 5 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 5*)
TCI: Troponina Cardíaca I
TCT: Troponina Cardíaca T
TGF- β : factor de crecimiento transformante beta (*Transforming Growth Factor Beta*)
TLR: receptor tipo toll (*Toll-Like Receptor*)
TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa (*Tumor-Necrosis Factor Alpha*)
TM: Tricrómico de Masson
TRM: macrófagos residentes de tejido (*Tissue-Resident Macrophages*)
TTBS: tampón tris salino con Tween 20 (*Tween 20-Tris Buffered Saline*)
TTC: cloruro de trifeniltetrazolio
Tyk2: tirosina quinasa 2 (*Tyrosine Kinase 2*)
VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)
VI: Ventrículo Izquierdo

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares, incluyendo el infarto agudo de miocardio (IAM), constituyen la causa más frecuente de defunción en el mundo occidental. En todas ellas, la respuesta inflamatoria generada juega un papel fundamental en su desarrollo y progresión, hasta el punto en el que su sostenimiento temporal ocasiona daños irreversibles que, en el caso del IAM, son la causa principal de un remodelado cardíaco adverso, lo que se traduce en el agravamiento de la insuficiencia cardíaca (IC) posterior al infarto, y por ello un descenso significativo en la calidad de vida del paciente. Las células del sistema inmune, y en particular los macrófagos, son los organizadores clave de la regulación de las fases del proceso inflamatorio ya que desde su inicio participan en su duración e intensidad, siendo la actividad de los macrófagos pro-inflamatorios (M1) y su posterior polarización hacia un fenotipo anti-inflamatorio (M2), determinante en la resolución del proceso. La correcta transición desde M1 hacia M2 se asocia con la liberación de distintos mediadores entre los que se encuentran las citoquinas, siendo las de tipo anti-inflamatorio, y especialmente la interleuquina-10 (IL-10), la responsable de este proceso en el tejido cardíaco lesionado. En este contexto, los mecanismos que favorezcan el tránsito hacia un fenotipo resolutorio son cruciales para detener la extensión de la fase inflamatoria aguda y promover la sanación del tejido cardíaco de manera más efectiva. Partiendo de esta premisa, hipotetizamos que promover la aceleración de la polarización de macrófagos hacia un estado resolutorio, podría mejorar la funcionalidad cardíaca tras un IAM. Basándonos en la experiencia previa del grupo de investigación, hemos decidido utilizar una herramienta nanotecnológica con capacidad teragnóstica: dirigiendo el compuesto al punto de inflamación y de esta manera ejercer un efecto acelerador hacia la fase resolutoria de la inflamación, y además con la capacidad de poder visualizar el fenómeno de manera no invasiva mediante imagen molecular por resonancia magnética (RM), con la intención última de poder parametrizar y, por tanto, diagnosticar de manera precisa el desarrollo de la enfermedad. Teniendo en cuenta el efecto de IL-10 en la resolución inflamatoria, hemos generado una nanopartícula a partir de una estructura lipídica, conjugando un péptido agonista de IL-10 (IT9302), junto con gadolinio como agente de contraste de RM nuclear y rodamina, fluorocromo gracias al que podremos confirmar la especificidad de unión de la nanopartícula mediante fluorescencia, a la que hemos llamado NIL10. Como control, se utilizó la nanopartícula NIL10SC que presenta las mismas características, pero con la peculiaridad de estar conjugada con el mismo péptido en cuanto a composición, pero no así en orden de estructura primaria. La inyección intravenosa de 1 mg/kg de NIL10 en ratones sometidos a isquemia/reperfusión (I/R) miocárdica supuso una mejora significativa de la función cardíaca, evaluada a través de la medición de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI), tanto a los 3 como a los 7 días posteriores a la inducción del infarto, en comparación con los niveles encontrados en los

animales tratados con NIL10SC. Paralelamente, se evidenció un descenso significativo en el número de focos inflamatorios y la fibrosis de la región miocárdica infartada en los animales tratados con NIL10. Para de confirmar la especificidad del proceso, utilizamos ratones deficientes para el gen *IL-10* que atravesaron el mismo procedimiento de I/R, donde NIL10 indujo el mismo efecto a diferencia de lo que ocurrió en los animales deficientes para *IL-10R*, el gen que codifica para el receptor de IL-10, en los que el tratamiento con NIL10 no tuvo ningún efecto. Este conjunto de resultados, y de forma previa a su testado en humanos, nos indujo a escalar el posible efecto cardioprotector a un modelo porcino de I/R, en donde de forma análoga obtuvimos un claro efecto cardioprotector de NIL10 en respuesta al IAM, tanto a nivel funcional como histológico. Con el objeto de profundizar en la base molecular del efecto ejercido por NIL10, analizamos las poblaciones macrofágicas en la región necrótica de los ratones sometidos a I/R, consiguiendo hallar un marcado aumento de macrófagos de tipo M2 transcurridos 3 días de reperfusión en respuesta a NIL10, junto con una elevación significativa de los niveles plasmáticos de citoquinas anti-inflamatorias, incluyendo IL-10. A nivel molecular pudimos desvelar, al menos, la activación del receptor de IL-10 en presencia de NIL10, induciendo la inhibición de la translocación nuclear de NF- κ B dependiente de la vía de señalización de STAT3. Estos datos se correspondían, además, con la inhibición de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en los animales tratados con la nanopartícula NIL10. Los resultados obtenidos nos permiten concluir que NIL10 es un nuevo compuesto para su utilización en pacientes afectados por patologías inflamatorias como es el caso del IAM, proponiendo su utilización en el momento de la reperfusión miocárdica para lograr promover la fase resolutive del proceso inflamatorio y así aliviar la IC post-IAM.

Summary

Cardiovascular diseases (CVD), including acute myocardial infarction (AMI), are the leading cause of death in western countries. A feature in common is the inflammatory response that plays a key role in the onset and progression of the disease and may cause irreversible damage. Inflammation is the main cause of adverse cardiac remodelling in IAM and, consequently, during heart failure post-infarction patient's quality of life will depend on how long it takes inflammation resolution. Macrophages are the key organizers in regulating inflammation as they control the timing and the intensity of inflammation through macrophage polarization: a transition from M1-activated inflammatory to M2-type resolution macrophages. The correct transition from M1 to M2 macrophages is regulated by specific cytokine release, among which the anti-inflammatory interleukin-10 (IL-10), plays a crucial role in IAM. In this context, mechanisms that favour the transition to a resolving phenotype are decisive to halt the extension of the acute inflammatory phase and the healing of cardiac tissue in a more effective manner. We hypothesised that promoting the acceleration of macrophage polarization towards a resolving state could improve cardiac functionality after AMI. Based on our previous experience, we decided to use a nanotechnological tool with theragnostic capacity by first, synthesizing a nanoparticle capable of specifically travel at the inflammatory site with the goal of accelerating towards the resolute stage, and second, with the capacity to visualize inflammation by non-invasively molecular imaging through magnetic resonance imaging. In particular, we have generated a nanoparticle called NIL10, conjugating an IL-10 agonist peptide (IT9302), together with gadolinium conferring paramagnetic properties and rhodamine, a fluorochrome thanks to which we can confirm the specificity of nanoparticle binding. As a negative control, we created NIL10SC a nanoparticle in which a scrambled peptide was conjugated. Intravenous injection of 1 mg/kg NIL10 in mice subjected to myocardial ischaemia/reperfusion (I/R) led to a significant improvement of cardiac function, assessed by left calculating left ventricular ejection fraction (LVEF), both at 3 and 7 days after administration, together with a significant decrease in the extension and number of inflammatory foci and fibrosis, when compared to the levels found in animals treated with NIL10SC. To confirm the effect of NIL10, treatment with NIL10 in IL-10 null mice induced the same result, while in animals deficient for the IL10 receptor (IL-10R), NIL10 had no effect. Before testing in humans, we scaled up our research in a swine model of AMI in which a clear cardioprotective effect of NIL10, both functional and structural was also achieved in animals subjected to AMI. To further investigate the molecular mechanism of NIL10, we analysed the macrophage populations in the necrotic region of infarcted mice, finding a marked increase of M2-type macrophages 3 days after reperfusion in response to NIL10, together with a significant increase in the plasma levels of anti-inflammatory cytokines, including IL-10. At the molecular level we were able to unveil at

least, activation of the IL-10 receptor, inducing inhibition of nuclear translocation of NF- κ B dependent on the STAT3 signalling pathway, concomitant with inhibition of pro-inflammatory cytokine expression in animals treated with NIL10. In conclusion, data provide with NIL10: a new compound with the capacity to be used in patients with inflammatory pathologies such as AMI, and proposing using NIL10 at the time of myocardial reperfusion to promote the resolution stage of inflammatory in order to reduce the severity of post-infarction heart failure.

Introducción

LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES: EL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO

1. Definición y epidemiología

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) comprenden un conjunto de patologías de origen multifactorial que engloban trastornos que afectan tanto al corazón como al sistema vascular. Dentro de estas patologías se incluyen las cardiopatías de origen isquémico, congénitas y reumáticas, las enfermedades cerebrovasculares, las distintas formas de insuficiencia cardiaca (IC) –aguda, crónica y congestiva–, la trombosis venosa, o la enfermedad vascular periférica, entre otras.

A pesar del creciente aumento de casos de otras patologías como el cáncer, las ECV siguen siendo la primera causa de muerte global, llegando a afectar hasta a 18,6 millones de personas en 2019, cifra que representa un 32% de los fallecimientos totales¹. Solamente en Europa, las ECV son las responsables de 2,2 y 1,9 millones de muertes en mujeres y hombres respectivamente, lo que supone un 47% y 39% de las muertes totales. En concreto, la **cardiopatía isquémica**, es la responsable del 38% de los fallecimientos por ECV en mujeres, y del 44% en hombres, seguida de la enfermedad cerebrovascular, que afecta a un 26% y 21% de mujeres y hombres respectivamente².

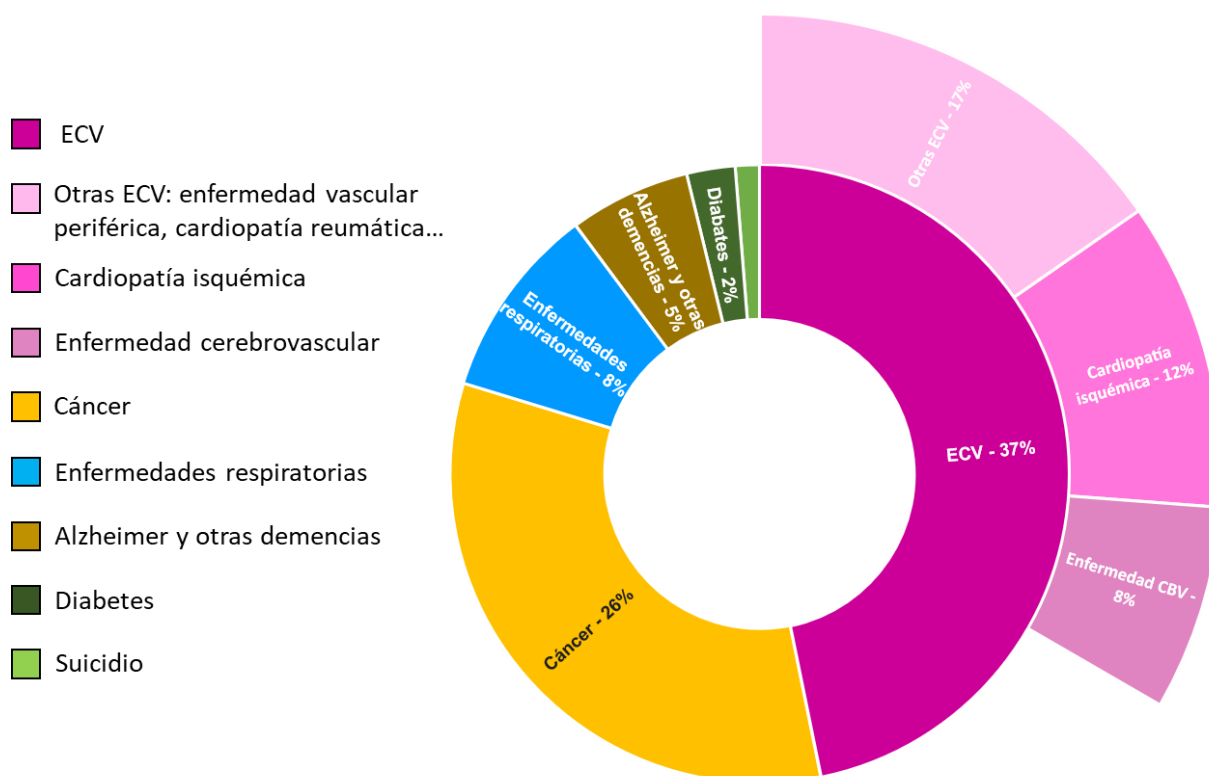


Figura 1. Principales causas de fallecimiento en Europa en los últimos 5 años. Gráfica basada en los datos de mortalidad total de la base de datos de la Organización Mundial de la Salud 2022³.

El aumento de la esperanza de vida en la población actual cursa directamente con un incremento del riesgo a padecer enfermedades ligadas al envejecimiento y la edad, como es el caso de las ECV⁴, aunque paradójicamente, estas patologías también son las principales responsables de los fallecimientos prematuros en los países desarrollados, y particularmente en Europa, donde además dentro de este grupo de población menor de 70 años, afectan predominantemente al sexo masculino².

Aunque en las últimas décadas los países desarrollados, y especialmente en España, se ha producido un descenso de la mortalidad, la cardiopatía isquémica sigue siendo la primera causa de muerte⁵. Por el contrario, los datos de prevalencia en esta patología se han mantenido constantes en los últimos años, tendencia que explica por qué los pacientes no fallecen de manera inmediata en la mayoría de los casos, sino que “conviven” mucho tiempo con la enfermedad⁶, donde la calidad y la esperanza de vida son parámetros, en muchos casos, inversamente proporcionales.

2. Factores de riesgo cardiovascular

Los factores de riesgo cardiovascular (FRCV) son cualquier hábito o característica medible que aumenta las probabilidades de desarrollar alguna ECV. El riesgo cardiovascular se ve potenciado por la acumulación de factores de riesgo presentes en cada individuo y se pueden diferenciar en modificables y no modificables atendiendo a su naturaleza⁷.

Los FRCV modificables son el conjunto de factores sobre los que la persona puede intervenir y, por lo tanto, modificar. Estos son: la hipertensión arterial, la hipertrigliceridemia, el síndrome metabólico, la enfermedad renal, sobrepeso y obesidad, tabaquismo, sedentarismo, consumo de alcohol, alimentación no saludable y ansiedad o estrés. En cuanto a los FRCV no modificables encontramos: la edad, el sexo, la raza, la diabetes mellitus, y los antecedentes familiares, que se refieren a factores intrínsecos en el individuo, destacando el papel de la hipercolesterolemia familiar⁸.

3. Prevención de las ECV

El hecho de que las ECV ocupen el primer puesto en el total de causas de fallecimiento global, hace que la prevención de este tipo de patologías cobre una gran importancia. El desarrollo de estas enfermedades conlleva un extenso periodo asintomático, lo que conduce a que su primera manifestación fenotípica sea un evento mortal en más del 35% de los casos, como ocurre en el **infarto agudo de miocardio (IAM)**⁹. En general, la prevención de las ECV se centra en el control

de los FRCV y utiliza estudios de estimación precisa del riesgo a desarrollar ECV^{10,11}, permitiendo así identificarlos antes de que aparezcan los signos clínicos.

El **estudio Framingham** es una de las herramientas más ampliamente usadas para estimar el riesgo de padecer ECV^{12,13}, a pesar de sobreestimar el riesgo en casos de pacientes con bajo riesgo e infraestimarlos en los pacientes con alto riesgo¹⁴. La Sociedad Europea de Cardiología recomienda el uso del **sistema SCORE** (*Systemic Coronary Risk Estimation*)¹⁵, una escala que calcula el riesgo a 10 años de un primer episodio aterosclerótico mortal, tratándose de un sistema que representa de manera más fiel una población concreta, como es el caso de España. Sin embargo, e independientemente del estudio que se utilice como referencia, un número significativo de pacientes escapan a las estimaciones, lo que hace necesario la búsqueda de nuevos biomarcadores que sean capaces de ser utilizados tanto de manera individual como en combinación con otros factores de riesgo para obtener de esta forma una valoración mucho más precisa, y poder así evaluar de manera más fiel el riesgo cardiovascular del paciente.

4. Cardiopatía isquémica

La **cardiopatía isquémica o isquemia miocárdica** es el término empleado para definir los problemas en el corazón causados por la oclusión total o parcial de las arterias coronarias. Aunque de etiología variable, la aterosclerosis es la promotora principal a partir de la formación de una placa de ateroma, y/o un trombo plaquetario, en la mayor parte de los casos. Su manifestación fenotípica se caracteriza por un dolor anginoso torácico y opresivo tanto durante el desarrollo de actividad física o estrés, como en reposo, irradiándose hacia la mandíbula y la extremidad izquierda, en cuyo caso hablamos de angina de pecho inestable, normalmente indicativo de **síndrome coronario agudo (SCA)**¹⁶.

5. Síndrome Coronario Agudo (SCA)

El mecanismo fisiopatológico que desencadena la mayoría de los SCA consiste en la rotura o erosión de una placa de ateroma vulnerable o inestable. Las complicaciones trombóticas y la consiguiente embolización originan la oclusión del flujo sanguíneo coronario, que impide la perfusión miocárdica¹⁷. El espectro clínico de los SCA es bastante amplio y comprende eventos que se solapan, pero generan diferentes complicaciones como la angina inestable, **el IAM** o la muerte súbita cardíaca, de manera general.

El síntoma principal que inicia el proceso diagnóstico y terapéutico es el dolor torácico. Este síntoma, acompañado por un análisis de posibles anomalías eléctricas mediante electrocardiografía (ECG), permite diferenciar dos grupos de pacientes:

- Síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST (SCASEST): se caracteriza por la oclusión trombótica parcial de la arteria coronaria (Fig 2).
- Síndrome coronario agudo con elevación persistente del segmento ST (SCACEST): tiene lugar cuando se desarrolla una oclusión trombótica coronaria aguda total o subtotal. En la mayoría de los casos, estos pacientes sufrirán un **IAM** (Fig 2).

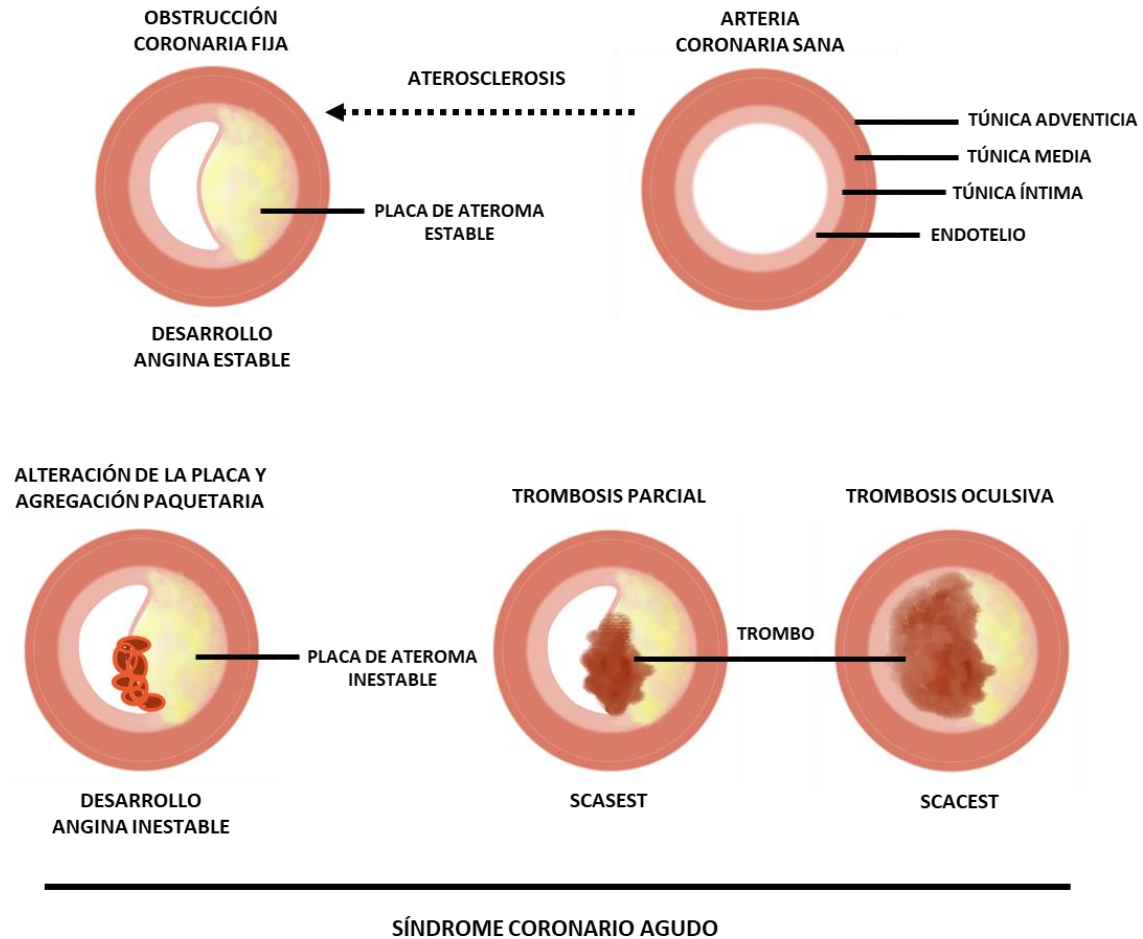


Figura 2. Fisiopatología de los SCA. La ruptura de la placa ateromatosa inestable o vulnerable puede llevar a un evento coronario agudo, siendo la influencia trombótica la responsable en última instancia de la severidad de la oclusión, y por lo tanto del tipo de SCA. Imagen modificada y reproducida de Kumar V, 2021¹⁸.

5.1. Diagnóstico y biomarcadores en el SCA

El segundo criterio clínico para la valoración de la patología y su consiguiente diagnóstico es el análisis de biomarcadores de **daño cardíaco** en plasma sanguíneo, entre los que podemos destacar:

- Las **troponinas** son interruptores moleculares de la contracción de los miocitos que regulan la interacción dependiente de calcio (Ca^{2+}) de la actina con la miosina, los principales componentes del sistema contráctil. Ante un daño cardíaco, las troponinas se liberan al torrente sanguíneo, pudiendo detectarse de manera muy temprana, con un pico máximo a las 12-18 horas y una fase de meseta que se mantiene hasta las 48 horas posteriores, permaneciendo elevadas durante 7-10 días. La detección de una elevada concentración tanto de la **troponina cardíaca T (TCT)** y la **troponina cardíaca I (TCI)** superior al percentil 99 de referencia, es utilizado, junto con el análisis electrocardiográfico, para emitir el diagnóstico y conocer la severidad del SCA¹⁹.
- La **creatinina quinasa (CK)** es una enzima que cataliza la formación de la creatinina fosforilada a partir de ATP²⁰. La isoforma miocárdica (**CK-MB2**), se libera en gran cantidad durante el IAM, ya que no puede ser totalmente transformada en su forma plasmática. La **CK-MB2** aparece por primera vez a las 4-6 horas del inicio de los síntomas, alcanzando su punto máximo a las 24 horas y volviendo a la normalidad transcurridas 48-72 horas desde el IAM. Ese patrón la convierte en un sensible y específico predictor de pronóstico²¹.
- La **proteína C reactiva (CRP)** es una molécula de unión a patrones que se expresan tras la muerte celular. Esta función de reconocimiento de señales de daño hace de esta proteína parte de la respuesta inmune desencadenada tras un IAM²². El análisis de la CRP ayuda a elaborar un diagnóstico temprano ya que puede ser detectada antes incluso de la aparición de otros síntomas como la angina de pecho, aumentando sus niveles en las primeras 6-8 horas hasta las 48 horas y pudiendo alcanzar valores que superan 30 veces su concentración sérica basal (10 mg/L)²³.

Además del ECG y el análisis plasmático de enzimas cardíacas descritas anteriormente, las **pruebas de imagen** son el instrumento clave en la elaboración de un correcto diagnóstico de la enfermedad cardíaca ya que aportan información decisiva sobre la funcionalidad miocárdica y, a pesar de prolongar el tiempo de diagnóstico, permiten hacer una caracterización rigurosa del daño miocárdico:

La **angiografía coronaria** es la herramienta usada en primer lugar, ya que permite detectar las alteraciones coronarias responsables del proceso isquémico, no obstante, el hecho de que sea un procedimiento invasivo, hace que esté asociado a inconvenientes como la posibilidad de originar un evento adverso en el paciente²⁴. Cada vez es más frecuente el uso de otros abordajes en combinación con la angiografía, siendo las técnicas de imagen no invasiva una pieza fundamental en la elaboración del diagnóstico del IAM, y en la medicina cardiovascular en general.

La **ecocardiografía** consiste en visualizar por ultrasonidos la estructura cardíaca, permitiendo analizar la funcionalidad auricular, ventricular, valvular y hemodinámica en tiempo real. Este procedimiento tiene la ventaja de poder realizarse en cualquier espacio sin necesidad de alterar el estado del paciente, siendo una prueba diagnóstica no invasiva. En conjunto, su gran disponibilidad y la ausencia de radiación hacen de esta técnica un elemento destacado en el diagnóstico del IAM. Sin embargo, la variabilidad inter-observador y la dependencia del ángulo escogido por la entrecruzada disposición de las fibras cardíacas, son sus principales limitaciones²⁵.

La **resonancia magnética (RM)** es la técnica de imagen no invasiva más fiable para el estudio del IAM ya que dota de precisión y resolución el estudio de la estructura y funcionalidad del miocardio, con la ventaja de tener una elevada reproducibilidad a diferencia de otras técnicas como la ecografía²⁶. La RM permite evaluar la perfusión miocárdica con ayuda de agentes de contraste, como el gadolinio, posibilitando localizar el área isquémica con gran fidelidad a la vez que informa, a través de la cuantificación del aumento del espacio extracelular, de la fibrosis post-infarto²⁷. Esta técnica se basa en una avanzada tecnología que utiliza un campo magnético y ondas de radiofrecuencia para obtener imágenes. Mediante la excitación y detección del cambio de dirección del eje de rotación de los protones que se encuentran en el agua –componente principal de los tejidos vivos–, compone una señal detectable que puede ser utilizada para generar una imagen. Dentro de los parámetros analizados en la RM, el realce tardío de gadolinio (RTG) ha supuesto la aportación más relevante en el estudio del IAM ya que habilita a la detección y estudio de la región necrosada, siendo las regiones viables las que captan contraste de manera tardía a diferencia de las dañadas, las cuales tienen un patrón de hiperrealce temprano²⁸. La intensidad recogida por la RM se corresponde con la tasa de relajación magnética de los protones de agua, donde encontramos dos principales procesos: el longitudinal ($T1$) y el transversal ($T2$)²⁹.

6. Infarto Agudo de Miocardio (IAM)

La cantidad y duración del trombo en el momento de la rotura de la placa aterosclerótica, entre otros elementos, juega un papel crucial en la presentación clínica de los SCA. En el caso del **IAM** está asociado a una trombosis oclusiva que afecta a gran parte del miocardio y que se dilata en el tiempo, donde como consecuencia a la oclusión prolongada del vaso, el desequilibrio entre la demanda y el aporte de oxígeno en el tejido miocárdico, supone la necrosis de las células cardíacas^{6,30}. Normalmente, el mecanismo desencadenante surge por la trombosis coronaria que, producida por una brusca alteración de una placa ateromatosa vulnerable, es más

susceptible a sufrir procesos erosivos. De esta forma, la erosión de la placa de ateroma produce que parte del material subendotelial quede expuesto a la luz del vaso, sirviendo de señal de adhesión y agregación plaquetaria, desencadenando finalmente la formación de un trombo mayor y, por tanto, la oclusión total de la arteria^{31,32}. El patrón de infarto depende del vaso afectado, aunque normalmente, la mayor parte de los IAM se dan en una sola arteria coronaria y son transmurales. En este trabajo ahondaremos en el estudio del **IAM SCACEST** producido en la arteria coronaria descendente anterior (DA), y que por lo tanto afecta mayoritariamente al ventrículo izquierdo (VI), siendo la manifestación de mayor severidad para el paciente (Fig 3). Las alteraciones visibles por electrocardiografía en este tipo de IAM incluyen también modificaciones como la aparición de la onda Q patológica –indicativo del infarto transmural–, inversión de la onda T y la manifestación de un comportamiento arritmogénico.

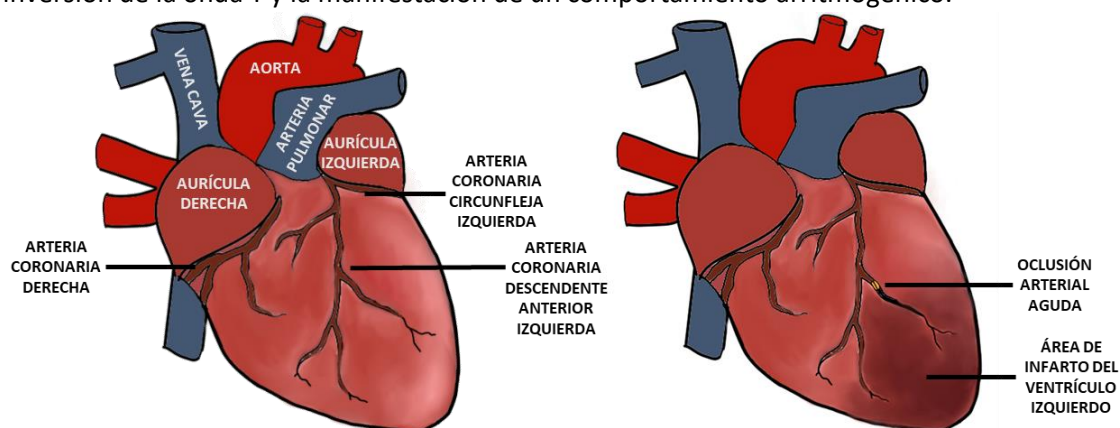


Figura 3. Anatomía cardíaca general y detalle anatómico del IAM.

El IAM se puede clasificar atendiendo a su gravedad según la clasificación que Killip y Kimball realizaron en 1967³³, en la que describieron la evolución de 250 pacientes de IAM de menor a mayor severidad:

Tipos de IAM según Killip y Kimball	
Clase I	Angina inestable sin signos iniciales de IC en el paciente causado por aterotrombosis coronaria, la cual se debe inicialmente a la rotura o erosión de la placa de ateroma. En este punto, la interrupción del flujo sanguíneo puede agravarse debido a la trombosis intraluminal y a la hemorragia generada por la rotura de la superficie del vaso ³⁴ .
Clase II	El paciente presenta IC moderada, con presión venosa yugular elevada, estertores pulmonares, ruido cardíaco S3 de galope y dolor torácico.
Clase III	Paciente con IC grave y edema agudo de pulmón.
Clase IV	Paciente con shock cardiogénico, elevada hipotensión arterial y signos de vasoconstricción periférica.

Tabla 1. Tipos de IAM según Killip y Kimball³³.

6.1. Fisiopatología del IAM

6.1.1. Fase temprana: 0 – 5 horas post-IAM

El inicio de la oclusión coronaria repercute negativamente en la perfusión miocárdica, reduciendo de esta forma el aporte de oxígeno y nutrientes al tejido, y ocasionando un desequilibrio metabólico denominado **fase de isquemia**. Dicho cambio metabólico hacia la respiración anaeróbica promovido por la hipoxia del tejido, restringe la energía disponible para la contracción y relajación de las células cardíacas, produciendo cambios moleculares y estructurales³⁵. Histológicamente, tras los primeros minutos de isquemia, es visible la denominada “contractura”³⁶ caracterizada por un acortamiento de las células cardíacas y la consecuente rigidez sostenida del miocardio, donde, además, la concentración de Ca^{2+} intracelular –clave para la despolarización miocárdica–, se desestabiliza considerablemente. El fenómeno de acortamiento miofibrilar moderado se restringe a la zona isquémica sin producir daños estructurales profundos, aunque ocasiona defectos en el citoesqueleto. Su manifestación en el miocardio es visible desde los primeros 15 minutos de isquemia hasta pasadas unas horas³⁷.

Tras la confirmación de IAM SCACEST se debe realizar la terapia de reperfusión. Esta consiste en la disolución del coágulo oclusivo mediante trombólisis o reapertura del flujo de la arteria mediante procedimientos invasivos como la angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP). De esta forma, se restaura el flujo en la zona isquémica con el fin de evitar la extensión de la muerte celular, aunque de manera frecuente, es precisamente en esta **fase de reperfusión** en la que la necrosis se dispara, un fenómeno conocido como **daño por reperfusión**³⁸. Molecularmente, la reactivación de la cadena transportadora de electrones genera especies reactivas de oxígeno (ROS) que producen cambios en la permeabilidad mitocondrial, contribuyendo a la sobrecarga intracelular de Ca^{2+} , más tarde la peroxidación de lípidos y daños irreversibles en el ADN³⁹. A nivel celular, los cardiomiocitos, incapaces de retomar la homeostasis iónica sufren un acortamiento masivo de los sarcómeros y su completa desorganización, debido principalmente al incremento de Ca^{2+} y a la restauración de los niveles basales de ATP –dependiente de la duración de la isquemia–, y que conjuntamente activan fuertemente la maquinaria de contracción⁴⁰. Este fenómeno de “hipercontractura” ocasiona un aumento de la rigidez de la pared ventricular y posterior necrosis durante los primeros minutos de revascularización del tejido. En este punto, los cardiomiocitos sufren la desestabilización de la membrana celular que lleva a su rotura y a la liberación de enzimas citosólicas, que a su vez altera las condiciones del tejido adyacente, incrementando la progresión de la necrosis en el

tejido miocárdico afectado, un evento que en mayor o menor medida dependerá también de la calidad de la revascularización del área afectada⁴¹. La liberación de enzimas, la destrucción de la matriz extracelular (MEC) –una red estructural tridimensional de proteínas estructurales y minerales– y la necrosis de las células embebidas en esta MEC, conducen conjuntamente a la liberación en cadena de señales de daño que pondrán en marcha el despliegue de la respuesta inflamatoria a través del reclutamiento de células del sistema inmune, responsables en última instancia del remodelado del tejido dañado, como detallaremos en el siguiente bloque.

6.1.2. Fase pro-inflamatoria: 6 horas – 4 días post-IAM

En respuesta a este fenómeno de daño irreversible y desencadenado debido a la muerte celular se inicia la fase **inflamatoria aguda**. Dicha fase se induce a través de la liberación de señales de muerte e inflamación, como citoquinas, ROS y patrones moleculares asociados al daño (DAMPs)^{42,43} que sirven de ligandos para receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), disparando el reclutamiento de células inmunes a la zona de la lesión y aumentando de esta forma la respuesta pro-inflamatoria, con el fin de eliminar en última instancia el tejido necrótico.

Cabe señalar que la extensión del **área infartada** depende tanto de la extensión del **área de riesgo** como de la duración del periodo de isquemia. El término **área de riesgo** hace referencia al tejido que ha sido privado de flujo sanguíneo, y que puede terminar viéndose afectado como consecuencia de la emisión tisular de señales inflamatorias y de muerte. La actividad del sistema inmune está ampliamente ligada con la extensión de la zona de infarto, lo que condicionará la funcionalidad cardíaca de manera permanente⁴⁴.

6.1.3. Fase resolutive: tras 7 días post-IAM

En esta fase se reestablece la función y estructura tisular a partir de la supresión y contención de la respuesta inmune inicial, con el fin último de revertir los daños ocasionados por la lesión. En el tejido miocárdico, este proceso se promueve con la deposición de tejido conjuntivo o **cicatrización**, evitando así la ruptura del músculo cardíaco. Esta orquestada transición tiene lugar gracias a células residentes del tejido (cardiomiocitos, células endoteliales y fibroblastos) así como de células inmunes (neutrófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos), y se debe especialmente a la **polarización de macrófagos** y la interacción de estos con los componentes de la MEC, como detallaremos en el siguiente bloque. El tiempo invertido en el proceso de reparación post-infarto es dependiente de la extensión del daño miocárdico ocasionado por el proceso isquémico, aunque en general no es inferior a 3 semanas, y va a ser decisivo en la recuperación del VI⁴⁵.

6.1.4. Remodelado cardíaco

El remodelado cardíaco se define como el conjunto de cambios anatómicos, geométricos, histológicos y moleculares que se dan tras un daño miocárdico. La extensión final del área afectada en el VI es proporcional al desarrollo de la disfunción contráctil en el tejido infartado⁴⁶. La parte necrótica del VI se debilita propiciando la distensión de la pared ventricular y su adelgazamiento, y el fracaso en la eficiencia del bombeo genera adaptaciones que afectan a los cardiomiocitos, los fibroblastos, el endotelio y a la MEC en forma de fibrosis, hipertrofia, dilatación de la cámara y desorganización de los cardiomiocitos. Todos estos cambios estructurales generados en primera instancia con el objetivo de suplir las necesidades hemodinámicas del corazón, terminan por provocar alteraciones patológicas: aumentando la presión de la pared ventricular y condicionando la perfusión miocárdica, lo que deteriora aún más la función cardíaca en un ciclo continuo de complicaciones⁴⁷.

A largo plazo, estas alteraciones estructurales y funcionales que afectan tanto a los segmentos miocárdicos dañados como a los no dañados, enardecen la disfunción cardíaca⁴⁸. Esta condición hace que se activen mecanismos compensatorios para mantener el gasto cardíaco (GC) –volumen de sangre eyectado por minuto–, asegurando una perfusión tisular adecuada y, en consecuencia, el mantenimiento de la perfusión sistémica. Dicho remodelado ventricular adverso post-IAM será insostenible en el futuro y condicionará la vida del paciente permanentemente en forma de IC, una patología que no se desarrolla inmediatamente, pero sí es de las más letales a largo plazo, lo que refuerza aún más la extrema **necesidad de investigar sobre terapias dirigidas a promover la fase resolutive post-IAM** como punto clave para reducir la IC posterior, objetivo principal de la presente tesis doctoral.

A nivel molecular, son varios los elementos que intervienen en el remodelado cardíaco entre los que destaca el papel de las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs). Esta familia de 25 endopeptidasas zinc-dependientes se encargan del mantenimiento y equilibrio de la síntesis-degradación de la MEC mediante la escisión de sus componentes, como el colágeno, la fibronectina y la laminina⁴⁹. Tras un periodo de isquemia miocárdica, el tejido necrótico sufre un proceso de renovación, en gran medida gracias a estas enzimas, que inducen la degradación tisular a lo largo del tiempo durante los primeros días tras el evento isquémico. Su actividad está directamente controlada por elementos moleculares de regulación, pero también de manera indirecta, a través de células inmunes que coordinan la sanación de la región infartada, como los macrófagos⁵⁰. La determinante implicación de las MMPs en las distintas fases de reparación

del VI post-IAM hace que las terapias dirigidas a inhibir su activación prolongada supongan un abordaje destacado, como ya hemos demostrado en nuestro laboratorio⁵¹.

RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE AL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO

7. La respuesta inflamatoria

El proceso inflamatorio elimina las células muertas del miocardio e induce después la reparación del tejido dañado, con el objetivo de devolver la homeostasis tisular. A pesar de ello, los beneficios de la reacción inflamatoria dependen de su intensidad, siendo su exacerbación la causante de la extensión del daño tisular hacia el tejido sano⁵², lo que tras un IAM conducirá a un remodelado cardíaco adverso.

La vía principal por la que el sistema inmunitario innato se enfrenta a las infecciones y a la lesión tisular es estimulando la **inflamación aguda**, que en conjunto es la respuesta inicial en la que se produce un aumento del flujo sanguíneo y de la permeabilidad vascular, favoreciendo la acumulación de leucocitos, proteínas plasmáticas y lípidos derivados de la sangre en el tejido extravascular dañado⁵³.

El inicio de la inflamación, en el contexto del IAM, comienza con las señales quimiotácticas y de muerte secretadas por los cardiomiocitos. El tejido cardíaco dañado recluta así neutrófilos en primer lugar, y más tarde **macrófagos**, resultado de la migración y posterior infiltración de monocitos pro-inflamatorios o derivados de macrófagos residentes de tejido (TRM)⁵⁴. Los cambios generados por la activación de la respuesta inmune son inducidos esencialmente por las citoquinas, moléculas señalizadoras secretadas por las células del microambiente y en buena parte derivadas de células centinelas residentes en el tejido, entre las que se encuentran los TRM. Todo ello da lugar al aumento del conjunto de macrófagos, llegando a convertirse en la población dominante en los tres estadios de la respuesta inflamatoria, por lo que parece lógico pensar que constituyan una diana terapéutica en el IAM, como desarrollamos a continuación.

8. Efectores principales de la respuesta inflamatoria: monocitos y macrófagos

Los monocitos y los macrófagos poseen características clave entre las que cabe destacar la plasticidad fenotípica, una gran heterogeneidad y el hecho de ser uno de los componentes mayoritarios del tejido cardíaco: esto hace que desempeñen un papel central en la regulación de la respuesta inflamatoria, tanto en el inicio como en el final de esta⁴⁵.

En cuanto a su origen, las células del linaje monocito-macrófago surgen de células progenitoras mieloides comprometidas en la médula ósea, dirigidos por el factor estimulante de colonias de monocitos o macrófagos (M-CSF)⁵⁵ en adultos. Concretamente, los **monocitos**, uno de los dos precursores macrofágicos, sufren 3 divisiones para llegar a su completa diferenciación: primero en monoblastos, transitando hacia promonocitos hasta llegar a ser monocitos maduros que se liberan a la circulación periférica^{56,57}. Tras su liberación pueden llegar a permanecer activos solo hasta 7 días, lo que, en comparación con los macrófagos, que pueden llegar a poblar un tejido durante meses, les hace parecer células de vida media corta. Por otra parte, los **macrófagos**, son células que se distribuyen ampliamente por todos los órganos y tejidos, y cuya función principal es el mantenimiento de la homeostasis tisular. Los macrófagos ejercen su actividad como uno de los componentes celulares del sistema inmune innato, constituyendo la primera línea de defensa contra agentes patógenos, actuando, junto a los neutrófilos, como células especializadas con capacidad fagocítica⁵⁸. Estas células son capaces de generar una especialización de poblaciones dependientes del tejido y su microambiente en cada momento⁵⁹, como veremos en los siguientes apartados.

Tras la ocurrencia de un evento inflamatorio como el IAM, se producen dos ondas de infiltración monocitaria: la primera es impulsada por estímulos pro-inflamatorios y metabólicos generados en el tejido dañado, que conjuntamente provocan un reclutamiento y migración de monocitos periféricos de un fenotipo pro-inflamatorio a su vez⁶⁰, diferenciándose después en macrófagos o células dendríticas en el tejido lesionado⁶¹. Estos monocitos con capacidad migratoria se denominan **monocitos clásicos o pro-inflamatorios** y se caracterizan por expresar marcadores de membrana específicos como el complejo antigénico de linfocitos 6 (Ly6C) en el caso del ratón, o el llamado cluster de diferenciación 14 (CD14) en humanos, de manera muy pronunciada, y en menor medida el cluster de diferenciación 16 (CD16) (Fig 4). En este sentido, el receptor de quimioquinas c-c tipo 2 (CCR2) es asimismo un marcador de monocitos pro-inflamatorios propio de ambas especies. Esta subpoblación de monocitos se encarga de amplificar la señal tras su extravasación, alcanzando un pico máximo de infiltración tras el tercer día post-IAM y siendo su prolongada infiltración indicativa de un peor pronóstico⁶² debido a la liberación continua y sostenida del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), óxido nítrico (NO) y proteasas desde el inicio⁶³. La segunda oleada de infiltración es menos intensa y permite el cese de la inflamación y, por lo tanto, la recuperación tisular.

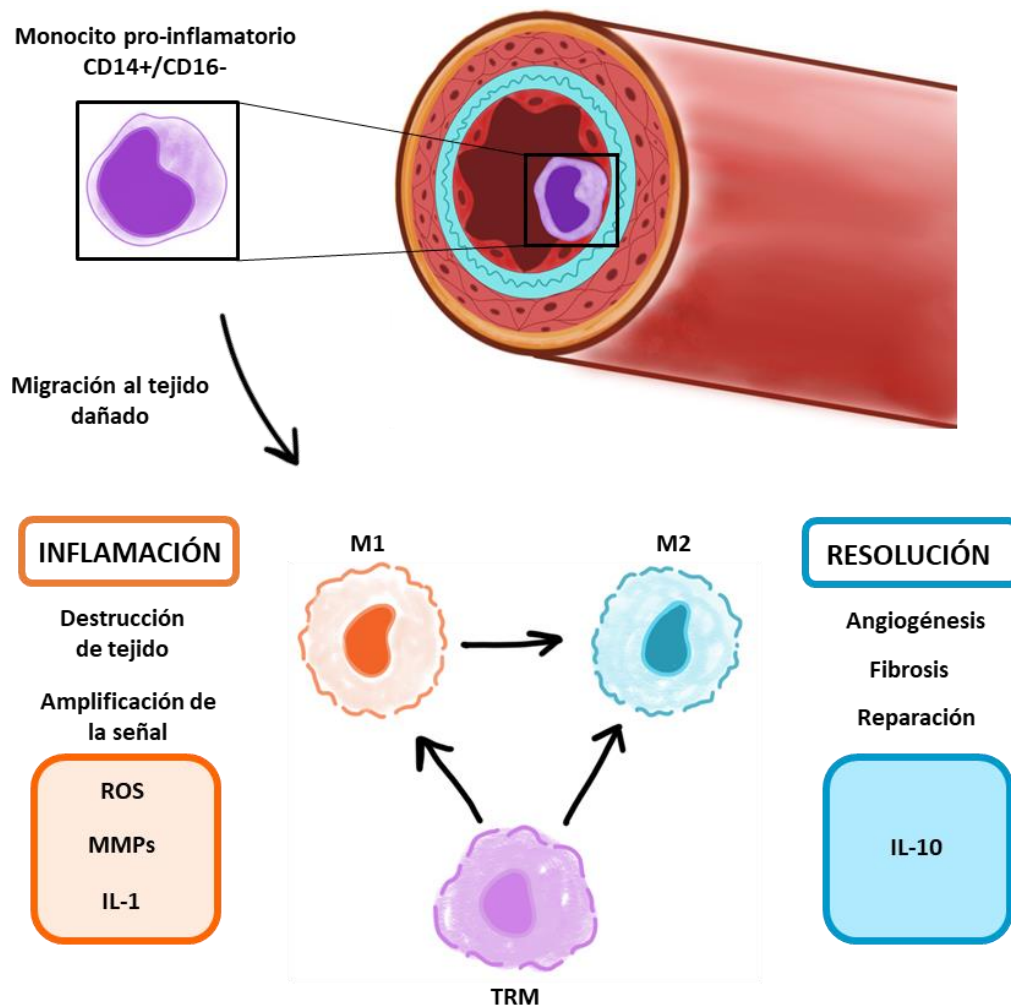


Figura 4. Esquema del proceso inflamatorio y la diferenciación de los TRM o los monocitos a macrófagos.

Por su parte, **los monocitos centinelas o no clásicos** son una subpoblación monocitaria que se mantiene en la circulación vascular, y cuya función no parece estar relacionada con la producción de macrófagos⁴⁵. En la especie de ratón, se caracterizan por expresar de manera muy baja Ly6C, mientras que en humanos estas células expresan un número elevado de CD16 y pobremente CD14. El hecho de que se infiltren en menor medida es, en gran parte, por la desaparición de CCR2 en ambas especies.

Junto con los monocitos, los TRM son uno de los dos precursores macrofágicos (Fig 4). Muchos tejidos están poblados de TRM, que se definen como células derivadas de la proliferación de macrófagos embrionarios locales, precursores del saco vitelino o del hígado fetal que debido a su capacidad de renovación son capaces de permanecer en tejidos adultos, asumiendo fenotipos especializados dependiendo del órgano. Así, las células de Kupffer que recubren las sinusoides

en el hígado, los macrófagos alveolares en el pulmón, las células microgliales en el encéfalo y los macrófagos cardíacos⁶⁴, son claros ejemplos de TRM.

El sistema cardiovascular está estrechamente conectado con el sistema inmune, incluyendo como hemos descrito previamente, a los monocitos circulantes y los TRM, estos últimos desempeñando un papel fundamental en la resolución del proceso inflamatorio crónico post-IAM⁶⁵ ya que participan pobremente en la inflamación aguda, a diferencia de los monocitos. Los TRM son la fuente de macrófagos carentes de CCR2⁶⁶ que se mantienen independientemente de la entrada de monocitos periféricos y que en condiciones basales funcionan para promover el desarrollo coronario, la regeneración cardíaca y facilitar la conducción eléctrica dentro del nodo aurículoventricular⁶⁷⁻⁶⁹.

8.1. Clasificación de los macrófagos

Los macrófagos de tejido son capaces de adquirir distintos fenotipos según capacidades observadas *in vitro*, que atienden a diferentes estímulos⁷⁰⁻⁷². Tras la primera oleada de infiltración monocitaria, el despliegue de la respuesta pro-inflamatoria genera que tanto los TRM como los monocitos recientemente infiltrados se diferencien en un tipo concreto de macrófagos: los **macrófagos activados por la vía clásica, pro-inflamatorios o M1**. Dicha subpoblación celular se encarga de la fagocitosis de la MEC y las células necrosadas, además de la producción de mediadores que amplifican la reacción inflamatoria a partir de la liberación de señales pro-inflamatorias, incluyendo las citoquinas. La permanente infiltración de monocitos pro-inflamatorios y, por la tanto, la presencia prolongada de los M1 elonga la fase inflamatoria, exacerbando la remodelación adversa en el corazón tras un IAM⁷³. La consecución del siguiente estadio, que pone fin a la fase inicial de la inflamación, se produce fundamentalmente por la **polarización de macrófagos** (Fig 5), un proceso de reemplazamiento de macrófagos M1 por los **macrófagos activados por la vía alternativa o también denominados resolutivos, anti-inflamatorios o M2**. Así, estas células, contribuirán al cese de la inflamación debido en mayor medida a la producción de la interleuquina 10 (IL-10), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) que en suma promueve la angiogénesis y la producción de colágeno, factores determinantes en la remodelación del tejido tras el cese de la inflamación y su reparación posterior (Fig 4). Este cambio fenotípico en los macrófagos se produce a nivel local y permite que los pocos monocitos que se infiltran durante esta etapa, deriven a macrófagos M2, proceso favorecido por las señales cada vez más intensas del microambiente anti-inflamatorio⁴⁵.

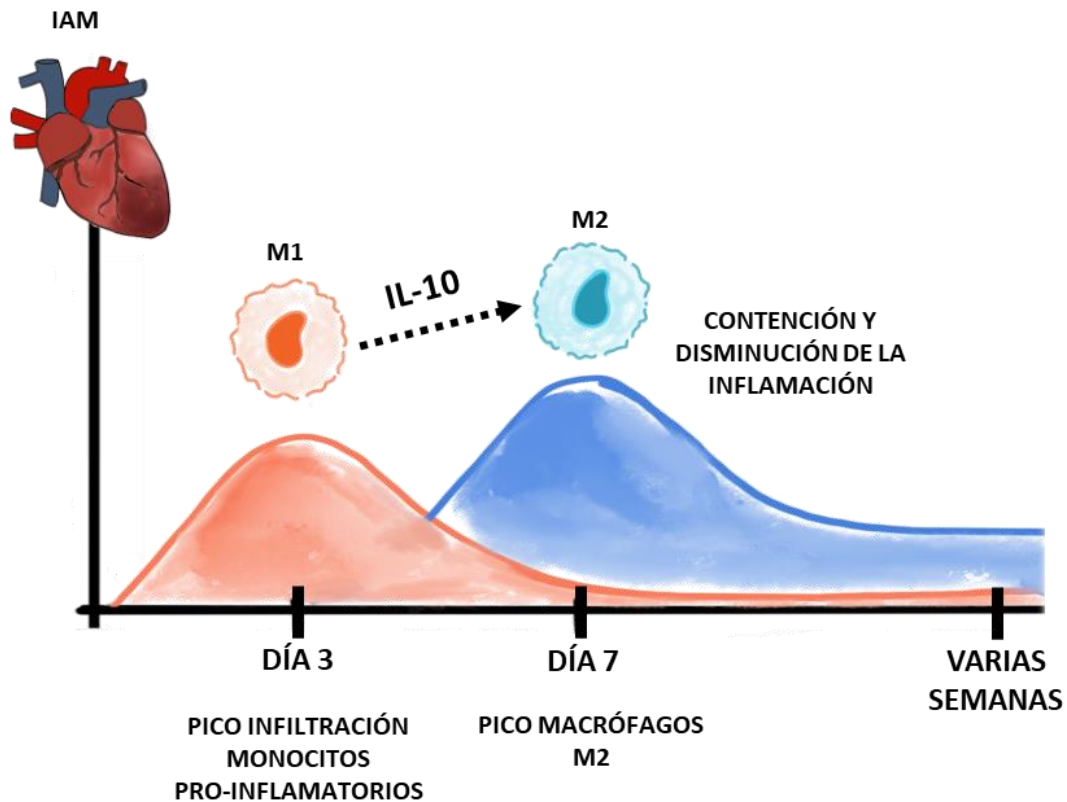


Figura 5. Progresiva polarización de macrófagos entre las fases pro-inflamatoria y resolutive de la respuesta inflamatoria desencadenada tras el IAM. La gráfica describe la evolución de las dos subpoblaciones de macrófagos implicadas en la respuesta inmune a lo largo del tiempo en el área cardíaca afectada tras el IAM. Imagen adaptada de Hulsmans, M., & Nahrendorf, M⁷⁴.

De forma general podemos describir los estados de activación macrofágica atendiendo a una clasificación que, aun siendo una simplificación por la extensión de la plasticidad en estas células⁵⁹, nos ayuda a conocer el papel de cada tipo de célula inmune en el contexto del IAM:

- **Activación clásica:** está inducida por el lipopolisacárido bacteriano (LPS) y el interferón-gamma (IFN- γ), que estimula la síntesis del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la producción de citoquinas pro-inflamatorias, la expresión de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y ROS, además de generar un aumento en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad 2 (MHC II) y el cluster de diferenciación 68 (CD68), permitiendo un aumento en la capacidad de presentación de antígenos y actividad microbicida.
- **Activación alternativa:** está inducida por las citoquinas IL-4 e IL-13, que estimulan un fenotipo de macrófago asociado a la reparación tisular y a la supresión de la inflamación a través de la estimulación de la proliferación de fibroblastos, la generación de tejido conectivo y la angiogénesis. Estos macrófagos experimentan un aumento en la expresión del receptor de manosa (CD206), dectina-1 y arginasa, entre otros marcadores.

- **Activación innata:** está inducida por ligandos de receptores “Toll-Like” (TLR) como LPS, ácido lipoteicoico (LTA) y peptidoglicano (PGN), que promueve la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias.
- **Desactivación:** está inducida por IL-10, TGF- β , por la inhibición de los receptores de membrana del cluster de diferenciación 200 (CD200) o el cluster de diferenciación 172a (CD172a). Este fenotipo se asocia con la producción de citoquinas anti-inflamatorias y la reducción de expresión de MHC II.

La progresión o resolución del proceso inflamatorio en el contexto del IAM está condicionada esencialmente por las señales secretadas por los macrófagos de uno u otro tipo. Aunque conscientes de lo simplista de la clasificación, en este trabajo catalogaremos los macrófagos en dos grupos, que, aunque reflejen estados extremos y se encuentren separados de manera difusa, atienden a un patrón de expresión común en el tejido cardíaco: los **macrófagos pro-inflamatorios o M1** y los **macrófagos resolutivos o M2** mencionados anteriormente. Ambas fases de la respuesta inflamatoria, y, en consecuencia, ambas poblaciones celulares son imprescindibles para una correcta sanación del miocardio afectado⁶³.

9. Resolución de la respuesta inflamatoria: papel de la Interleuquina 10

IL-10, descrita inicialmente como “el factor de inhibición de la síntesis de citoquinas” (CSIF)⁷⁵, es una citoquina multifuncional que regula tanto la inmunidad innata como la adaptativa, y es secretada tanto por células Th2, como por células B, monocitos, macrófagos y células dentríticas^{76,77}, aunque la respuesta que genera parece estar restringida solo a algunas células del sistema inmune. Estructuralmente es una proteína homodimérica⁷⁸⁻⁸⁰ cuya función principal, en el contexto del IAM, es esencial en la polarización de macrófagos a un estado resolutivo o M2 en el corazón lesionado.

IL-10 pertenece a la familia de citoquinas de tipo II, junto con otras como IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28 e IL-29, además de los interferones (IFN)⁸¹ ya que la posición de la cisteína se encuentra altamente conservada en la secuencia aminoacídica de su receptor. Se trata de una citoquina potencialmente anti-inflamatoria debido a su habilidad para inhibir la actividad de los monocitos y macrófagos mediante la inhibición de la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias, la producción de NO y la expresión de MHC II, además de la regulación de otras moléculas como IL-12 y el cluster de diferenciación 80 (CD80)⁸²⁻⁸⁵. La relevancia de IL-10 se explica también observando su grado de conservación entre especies tan dispares como los roedores o los humanos, donde IL-10 comparte una homología del 73%⁸⁶, hasta el punto de que la forma humana de IL-10 es incluso capaz de activar células del receptor murino^{76,87}.

9.1. Receptor de IL-10: estructura y expresión

El receptor de la interleuquina 10 (IL-10R) es un hetero-tetrámero formado por dos subunidades (Fig 6), miembros de la familia del receptor de interferón (IFNR). La subunidad 1 o alfa del receptor de IL-10 (IL-10RA) es una proteína de unos 90-120 kDa, formada por un dominio extracelular de unión al ligando de 227 aminoácidos, un dominio en hélice transmembrana de 21 aminoácidos y un dominio intracelular de 322 aminoácidos con una elevada afinidad por su ligando IL-10. Esta subunidad se expresa en gran parte de las células hematopoyéticas, aunque generalmente a niveles muy bajos, por debajo de 100 unidades por célula^{88,89}, siendo la activación de monocitos y macrófagos la única asociada con un incremento en la expresión de IL10-RA⁷⁶. La subunidad 2 o beta del receptor de IL-10 (IL-10RB) está compuesta por la misma estructura en 3 dominios, a pesar de tener una región intracelular de tan solo 83 aminoácidos⁹⁰, contribuye en baja medida a la afinidad de unión del complejo IL-10—IL-10R, pero interviene como mediador en la transducción de la señal, lo que hace de esta subunidad un elemento determinante en la regulación de la señalización intracelular⁹¹, y cuya función principal consiste en el reclutamiento de la quinasa Janus (JAK) y la tirosin-quinasa 2 (Tyk2)^{92,93}. Al contrario que IL-10RA, la subunidad IL-10RB se expresa constitutivamente en todas las células⁹⁰ y no se ha descrito ninguna regulación de esta asociada a la activación de células inmunes⁷⁶. Cabe destacar que mientras que IL10RA es sensible sólo a IL-10, IL10RB sirve de receptor para citoquinas pertenecientes a la misma familia, como es el caso de IL-22, IL-26, INF- γ ⁹⁴.

9.2. Mecanismo de acción de IL-10

Multitud de estudios han demostrado con anterioridad el papel que IL-10 juega en las ECV, principalmente inhibiendo la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 e IL-6⁹⁵. IL-10 se considera una potente citoquina anti-inflamatoria implicada en la supresión de distintos mediadores pro-inflamatorios a gran escala⁹⁶, siendo la principal responsable de la polarización de macrófagos. De entre los distintos mecanismos descritos en relación con su efecto en la respuesta inmunitaria, la vía IL-10-STAT3 es la mejor caracterizada⁹⁷: la interacción de IL-10 con IL-10RA forma un complejo que permite la unión de IL-10RB, formando un heterotetrámero funcional que permite el inicio de la señalización intracelular⁹¹. Una vez que el complejo está ensamblado, se promueve la activación de la janus tirosina quinasa 1 (Jak1) y la tirosina quinasa 2 (Tyk2), asociadas a las subunidades IL-10RA e IL-10RB respectivamente, de forma que tras un proceso de autofosforilación, se induce la fosforilación de residuos específicos en las tirosinas Y446 e Y496 del dominio intracelular de IL-10RA, mecanismo que permite el reclutamiento y activación del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) y

STAT1 en macrófagos, mientras que en las demás células el proceso es STAT5 dependiente^{89,93,98}. Jak1 y Tyk2 fosforilan a su vez STAT3, permitiendo su homodimerización y translocación al núcleo, donde regulará la transcripción de genes implicados en anti-inflamación (Fig 6), incluyendo *IL-10*, *TGFβ1* o *CD206*⁹⁹ además de la activación de los denominados supresores de la señalización por citoquinas (SOCS)¹⁰⁰, que ejercen sus funciones anti-inflamatorias en parte inhibiendo la ruta del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κB)¹⁰¹.

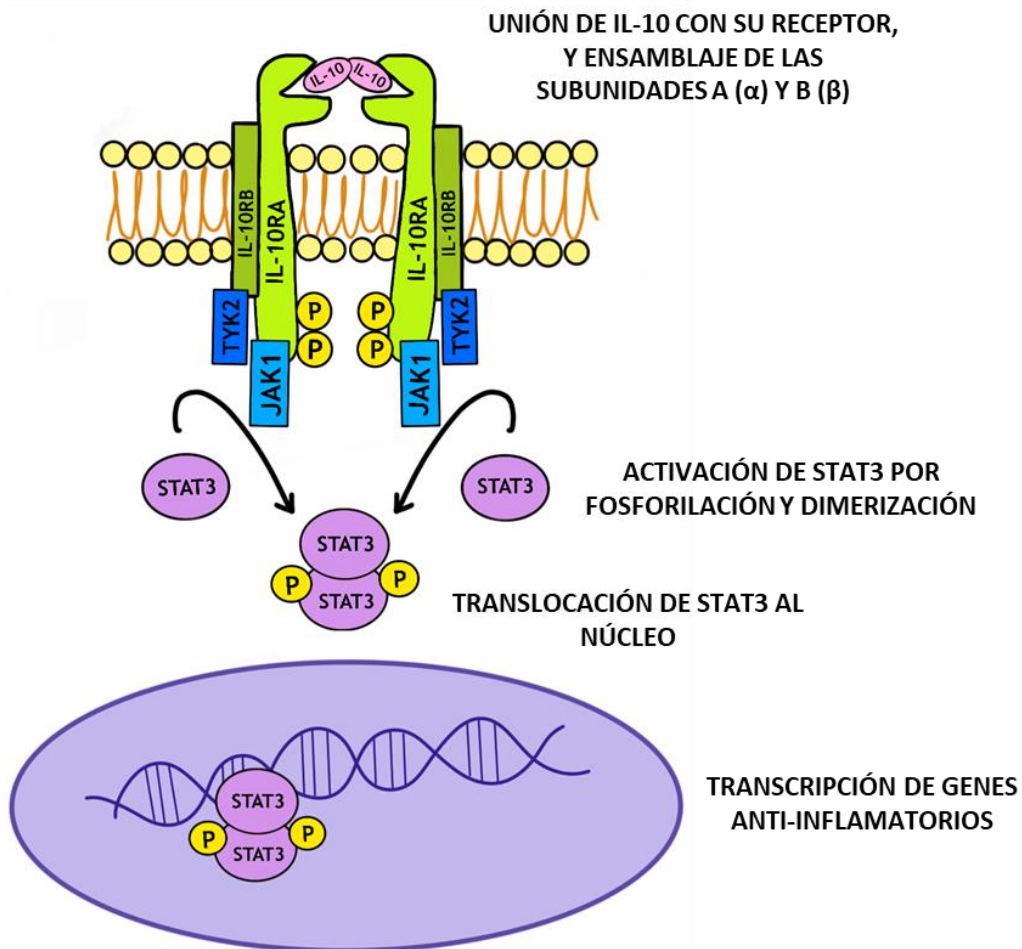


Figura 6. Ruta de señalización IL-10/STAT3. IL-10 se une a la subunidad IL-10RA, comprometiéndose a su vez a la subunidad IL10RB. Esta activación del receptor completo, activa a su vez la fosforilación de STAT3 gracias a la acción de las quinasas Jak1 y Tyk2. La activación de STAT3 permite su entrada en el núcleo y el consiguiente disparo de la transcripción de genes implicados en la resolución de la respuesta inflamatoria. Imagen adaptada de Shouval, D. S. et al. 2014¹⁰².

9.3. Papel del factor de transcripción NF- κ B

La familia NF- κ B comprende un conjunto de factores de transcripción que actúan como reguladores de la respuesta inmune innata y adaptativa, y participan en procesos de inflamación, proliferación celular, respuesta a estrés y apoptosis¹⁰³. Esta familia está integrada por 5 formas, que a su vez se subdividen en 2 clases basadas en cuanto a su estructura: la clase I formada por las subunidades NF- κ B1 (p105/p50) y NF- κ B2 (p100/p52), y la clase II formada por las subunidades RelA (p65), RelB y RelC. Su activación o inhibición está regulada por su propia dimerización en diferentes combinaciones, siendo capaz cada subunidad de formar un dímero con cualquiera de las anteriores gracias al dominio de homología Rel (RHD) que comparten todas ellas¹⁰⁴. En condiciones fisiológicas, NF- κ B se mantiene secuestrado en el citoplasma celular en su forma inactiva o latente, formando un complejo con las denominadas proteínas inhibidoras de NF- κ B (I κ B), entre las que se encuentra I κ B- α , I κ B- β , I κ B- γ , I κ BNS, I κ B- ϵ y I κ B- ζ ¹⁰⁵.

Existen varias rutas de señalización por las que NF- κ B es activado. Dos de las mejor descritas son la vía canónica o clásica de activación de NF- κ B (Fig 7) y la vía no-canónica, resultado de la exposición celular a citoquinas inflamatorias (TNF- α , IL-1) o en respuesta a LPS, respectivamente. Como consecuencia común en ambas cascadas, la quinasa I κ B (IKK), que se compone de subunidades de quinasas catalíticas (IKK α , IKK β) además de la proteína molde no enzimática (NEMO o IKK γ), se activa y fosforila a la proteína secuestradora I κ B, induciendo a su vez su poliubiquitinación y degradación proteasómica. Así, las subunidades de NF- κ B quedan activas, desenmascarando su dominio de localización nuclear (NLS), para translocarse al núcleo y activar la transcripción de genes pro-inflamatorios¹⁰⁶. En la ruta de señalización canónica, la unión de LPS al receptor TLR conduce al reclutamiento de proteínas andamio en la parte intracelular del receptor que reclutan al complejo IKK, propiciando así la activación de NF- κ B.

NF- κ B y STAT3 actúan como importantes factores de transcripción vinculados al proceso inflamatorio, interaccionando entre sí a diferentes niveles. STAT3 es capaz de regular la respuesta inmune innata, inhibiendo la activación de NF- κ B por TLR¹⁰⁷. Por lo tanto, cabe esperar que los efectos de IL-10 y NF- κ B sean contrarios, siendo uno el regulador necesario del otro ya que parten de estímulos opuestos¹⁰⁸.

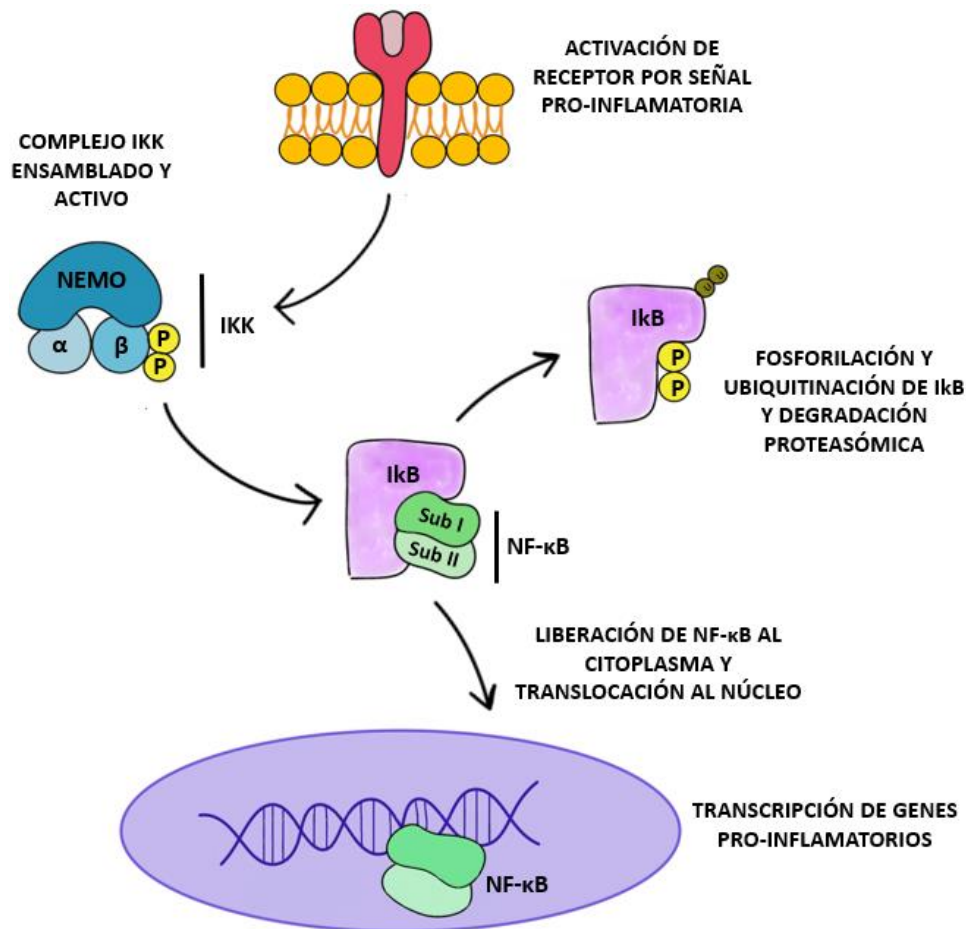


Figura 7. Ruta de señalización canónica para la activación de NF-κB. Las señales pro-inflamatorias son reconocidas por receptores, cuya activación conduce al reclutamiento y activación de un complejo IKK que se compone de subunidades catalíticas IKKα y/o IKKβ, y NEMO. El complejo IKK fosforila a continuación a IκB, lo que lleva a su degradación vía proteasoma. NF-κB se transloca a continuación al núcleo para activar genes involucrados en la amplificación de la inflamación.

NUEVAS TERAPIAS EN EL TRATAMIENTO DEL IAM

10. Nanotecnología

La nanociencia se define como el estudio de estructuras y moléculas a escala nanométrica –de entre 1 y 100 nm–, mientras que la tecnología que la aplica es lo que se denomina nanotecnología¹⁰⁹. Cada vez más contribuciones resaltan la gran capacidad del uso de esta tecnología en la biomedicina ya que posee innumerables características que permiten facilitar el diagnóstico y el tratamiento de distintas patologías¹¹⁰. Sin embargo, en patología cardiovascular, la nanotecnología es un área pobremente explotada a pesar de ser uno de los tratamientos no solo accesorios sino alternativos a tratamientos invasivos, como es el caso de la cirugía. Los tratamientos tradicionales basados en fármacos limitan la forma de

administración de los mismos e inciden en otros tejidos diferentes de la diana principal, generando en muchas ocasiones efectos secundarios adversos. Este problema podría verse solventado con el uso de formulaciones nanotecnológicas, como las nanopartículas (NPs). El uso de NPs es un abordaje indudablemente exitoso, ya que aportan una alta biocompatibilidad y precisión a cualquier tratamiento¹¹¹ permitiendo liberar fármacos a tejidos diana concretos promoviendo así un incremento en su eficiencia y disminuyendo la dosis necesaria, siendo además la vehiculización de fármacos en forma de NPs una forma de proteger los mismos de procesos degradativos. Otra de las grandes ventajas de las NPs, concretamente en el contexto de patología cardiovascular, es su pequeño tamaño. Esta propiedad les confiere libertad para circular por todo el árbol vascular, una de las principales limitaciones que presentan los tratamientos basados en anticuerpos, siendo, además, formulaciones no tan estables y sujetas a procesos de rechazo¹¹². La baja toxicidad del tratamiento con NPs y la ausencia de rechazo hacen que este tipo de abordajes estén cada vez más presentes en la medicina moderna siendo actualmente más de 24 terapias basadas en NPs ya aprobadas para su uso clínico¹¹³ en el campo de la oncología, enfermedades infecciosas y enfermedades cardiovasculares^{114,115}.

10.1. Imagen molecular no invasiva en patología cardiovascular

Las técnicas de imagen molecular en medicina, especialmente la RM acoplada a nanotecnología, han permitido el avance en el entendimiento y progresión de las ECV, incluyendo el IAM¹¹⁶. La imagen molecular se presenta como una modalidad especialmente prometedora ya que permite la visualización de los tejidos con una elevada resolución, así como detectar distintos tipos celulares y proteínas específicas de órganos concretos gracias al uso de nanosondas^{117,118}. El hecho de conjugar diferentes elementos como el desarrollo de equipamiento ultra-resolutivo y sensible, junto con la generación de NPs¹¹⁹ permite no solo visualizar elementos determinados sino modular la actividad de proteínas de interés de manera específica. Esto es posible gracias a la existencia de NPs conjugadas con reactivos de contraste y moléculas de unión a tipos celulares específicos e incluso con capacidad de activación o inhibición de proteínas concretas como ha sido posible en nuestro laboratorio recientemente: descubrimos que el tratamiento con NPs permitía la visualización e inhibición de la proteína activadora de MMPs (EMMPRIN) en el VI de animales sometidos a un procedimiento de IAM¹¹⁸.

Entre las diferentes formulaciones estructurales de NPs, la estructura de la micela permite conjugar en su esqueleto no sólo agentes de contraste como gadolinio, sino otros elementos capaces de unirse de manera específica a una molécula diana, como péptidos específicos e incluso permite incluir elementos precisos para su detección, como en nuestro caso ha sido la

conjugación con fluorocromos para poder visualizar la unión de la nanopartícula mediante técnicas de fluorescencia. Así, gracias a esta nueva disciplina, nuestro grupo de investigación ha realizado contribuciones significativas en el tratamiento del IAM o la aterosclerosis¹⁰⁹, al igual que otros grupos mediante la visualización no invasiva de macrófagos, colágeno, lipoproteína de baja densidad oxidada (ox-LDL) e incluso MMPs^{122,123}.

11. Papel de NIL10 en el Infarto Agudo de Miocardio

Gracias a la experiencia previa de nuestro grupo de investigación, en este trabajo hemos utilizado la nanotecnología como un instrumento que permite la vehiculización de varios componentes en una misma estructura lipídica, sintetizada en forma de nanopartícula, a la que hemos denominado NIL10. Como ya se ha descrito anteriormente, la extensión en el tiempo de la inflamación es la responsable principal del remodelado cardiaco adverso. NIL10 fue utilizada para activar efectivamente la vía de señalización de IL-10 en los macrófagos del corazón necrosado y resolver así el proceso inflamatorio en el momento justo, con la peculiaridad adicional de poder proceder mediante imagen molecular no invasiva a su visualización mediante RM. Esta última característica nos permitió evaluar y medir de forma precisa el área de infarto en virtud de su extensión presente en el miocardio gracias a la conjugación de gadolinio. NIL10 posee varias cualidades; por un lado, es el resultado de la conjugación precisa de un péptido sintético análogo a IL-10 –IT9302– con una homología completa por la porción carboxilo terminal de la IL-10 humana, la sección funcional¹²⁴, lo cual dota a NIL10 de propiedades anti-inflamatorias y terapéuticas descritas con anterioridad en diversas patologías, con tan solo 12 aminoácidos^{125,126}. En segundo lugar, añade la posibilidad de comprobar su localización tisular al incorporar de forma adicional el fluorocromo rodamina (Fig 8). Todo ello, permite que NIL10 no sea solo una herramienta de tratamiento, con capacidad para unirse a IL-10R y estimular la polarización de macrófagos, sino también de diagnóstico, área descrita como **teragnosis**.

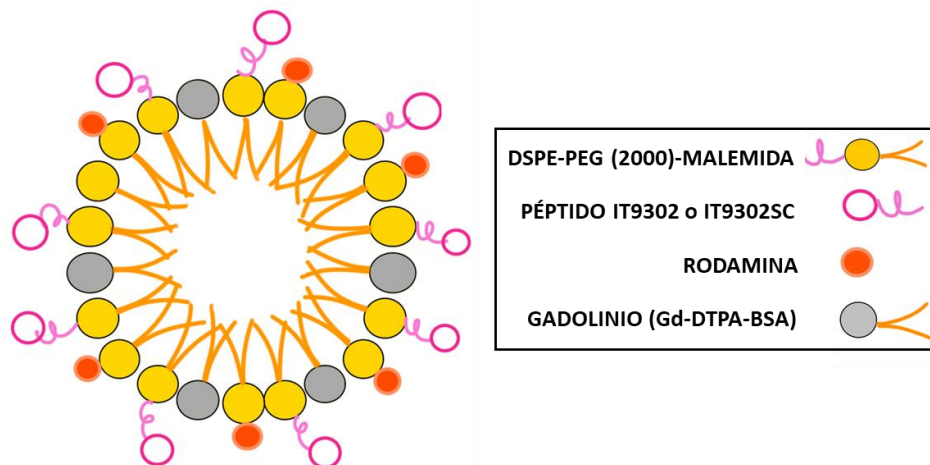


Figura 8. Estructura de los componentes de NIL10 o NIL10SC.

Hipótesis

En respuesta a un evento isquémico, el corazón responde tratando de asegurar el correcto aporte de oxígeno y nutrientes al resto del organismo, remodelando su estructura. Tras la ocurrencia del Infarto Agudo de Miocardio, el área necrosada deja de ser contráctil y para ello, el corazón se alivia incrementando el gasto cardiaco y la presión de la propia bomba. Un correcto remodelado cardiaco será crucial para reducir la magnitud de la insuficiencia del corazón post-infarto, y en este proceso la plasticidad macrofágica juega un papel determinante. Una respuesta inflamatoria sostenida en el tiempo tiene como consecuencia el remodelado adverso del corazón, generando así un agravamiento a medio y largo plazo en esta patología. El cese del proceso inflamatorio agudo en el momento justo y su acelerada resolución podría minimizar, por tanto, un remodelado adverso.

Por todo ello, y considerando los datos previos generados en nuestro laboratorio, mediante el uso de dos modelos animales de isquemia-reperfusión cardiaca y gracias a la imagen molecular no invasiva, nuestra **hipótesis** se centra en que actuar favoreciendo la polarización de macrófagos pro-inflamatorios hacia un estado resolutivo podría fomentar, y además permitiría visualizar de manera no invasiva, un remodelado cardiaco gracias al cual, los parámetros fisiológicos en el corazón puedan mejorar, contribuyendo así a minimizar los efectos adversos tras un Infarto Agudo de Miocardio, y mejorando en definitiva la calidad de vida del paciente.

Objetivos

Objetivo primario

La presente tesis doctoral pretende estudiar el efecto cardioprotector de la modulación del sistema inmune en un modelo murino y porcino de isquemia/reperfusión coronaria promoviendo la polarización de macrófagos a través del uso de nuevas herramientas tecnológicas basadas en la generación de nanopartículas conjugadas con péptidos agonistas de IL-10 cuya diana son los macrófagos pro-inflamatorios del tejido cardiaco. Para ello pretendemos llevar a cabo distintos abordajes, desglosados en los siguientes objetivos secundarios.

Objetivos secundarios

1. Caracterizar la citotoxicidad y biodistribución de nanopartículas conjugadas con un análogo de IL-10 (NIL10) *in vitro* e *in vivo*.
2. Analizar la función cardiaca y el daño miocárdico en respuesta a la administración de la nanopartícula NIL10, o nanopartículas conjugadas con péptidos "scramble" como control (NIL10SC), mediante un estudio ecocardiográfico e histológico en un modelo murino de Infarto Agudo de Miocardio.
3. Evaluar el efecto de la administración de NIL10 en animales deficientes para el gen *IL-10*, los cuales exhiben un remodelado adverso en respuesta al infarto agudo de miocardio.
4. Comprobar el efecto del tratamiento con NIL10 en la función cardiaca de animales deficientes para el gen *IL-10R* sometidos a isquemia-reperfusión miocárdica.
5. Evaluar la capacidad de NIL10 en la aceleración de la fase resolutive de la respuesta inflamatoria en un modelo porcino de Infarto Agudo de Miocardio, con el objetivo principal de considerar este abordaje molecular en un futuro ensayo clínico para la prevención de la IC post-infarto.
6. Visualizar la nanopartícula NIL10 mediante imagen molecular no invasiva a través de resonancia magnética nuclear.
7. Caracterizar la base molecular de acción de la nanopartícula NIL10.

Material y métodos

1. GENERACIÓN DE LA NANOPARTÍCULA NIL10

La generación y caracterización de las NPs se realizó en los laboratorios del Departamento de Química de la Facultad de Farmacia en la Universidad Complutense de Madrid.

Las NPs se sintetizaron por el método de hidratación de películas lipídicas. Concretamente, se preparó una película compuesta por Gd-DTPA-bis (GdDTPA-BSA), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina -N- [metoxi (polietilenglicol) – 2000] (DSPE-PEG2000), DSPE-PEG2000-maleimida, y rodamina anclada a fosfatidiletanolamina (FE), en una proporción molar 50:39:1:10, disuelta en una mezcla de cloroformo/metanol (4:1 v/v) por evaporación rotatoria. La película lipídica se hidrató con 10 mL de 10 mM tampón HEPES a un pH de 6,7 y 150 mM de NaCl y posteriormente se incubó en rotación a 60°C durante 1 hora. Tanto el péptido IT9302 como el péptido de secuencia aminoacídica alterada o *scramble* (IT9302SC) se modificaron añadiendo un residuo terminal de cisteína para que se unieran a la fracción de maleimida en una proporción molar de 1:40 (micela: péptido). Los péptidos no acoplados se separaron con concentradores de centrifuga de 100 kDa. El número de moléculas peptídicas que se conjugaron en cada micela se calculó mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HLPC), estimando en 4 ± 2 y 5 ± 1 el número de péptidos presentes en NIL10 y NIL10SC, respectivamente (Tabla 2).

Una vez generadas, se calcularon las propiedades físico-químicas de las NPs, incluyendo el tamaño de las NPs determinado como las medidas de los diámetros hidrodinámicos, el índice de polidispersión (PDI) y el potencial zeta mediante un equipo de difracción de láser (Zetasizer DLS, Malvern Panalytical, Malvern, Reino Unido). La morfología de las NPs se determinó mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) y el estudio de sus relajatividades tanto longitudinal como transversal se realizaron utilizando secuencias de recuperación de inversión con 15 tiempos de inversión y a partir de imágenes de eco de espín con diferentes tiempos de eco, respectivamente. En ambos casos, se generó una serie de imágenes con diferente ponderación T1 y T2. Los valores r_1 y r_2 se estimaron a partir de la pendiente de las tasas de relajación longitudinal y transversal frente al gadolinio (Gd-DTPA) o la nanopartícula.

Nanopartícula	Péptido	Secuencia
NIL10	IT9302	CAYMTMKIRN
NIL10SC	IT9302SC	CANYRMITKM

Tabla 2. Descripción de los péptidos conjugados en las nanopartículas NIL10 y NIL10SC.

2. MODELOS ANIMALES DE ISQUEMIA/REPERFUSIÓN CORONARIA

Todos los procedimientos quirúrgicos fueron realizados en el departamento de Cirugía Experimental del Hospital Universitario La Paz (HULP) siguiendo las directrices del Órgano Encargado del Bienestar Animal del HULP y el Órgano Habilitado de la Universidad Autónoma de Madrid en consonancia con la Directiva Europea de animales experimentales (63/2010 EU) y la legislación española (RD 53/2013). PROEX 138/17, PROEX 052.4/22.

2.1. Modelo murino

Un total de 88 ratones macho de genotipo salvaje de la cepa C57/BL6, 20 ratones deficientes para el gen *IL-10* y 20 ratones deficientes para el gen *IL-10R* de entre 25 y 30 g de peso se utilizaron para los distintos experimentos. En todos los casos, sometimos a los animales a anestesia inhalatoria mediante el uso del anestésico sevoflurano al 3 - 3,5% (AbbVie, Illinois, EE.UU.) y oxígeno a un flujo de 0,8 litros/minuto. A todos ellos, les administramos buprenorfina 0,05mg/kg subcutáneamente de manera preoperatoria y transcurridas 24 horas tras la intervención, como tratamiento analgésico, y en función de la valoración diaria del animal, les administramos una tercera dosis. Como mecanismo de profilaxis antibiótica inyectamos 60-70 mg/kg de ceftriaxona, mantenido durante 5 días post toracotomía. Tras la fijación del animal a la mesa de cirugía y el mantenimiento de su temperatura corporal por medio de una manta eléctrica, procedimos a la depilación y desinfección del tórax. Una vez inducida la anestesia, realizamos la intubación del animal con el fin de mantener una adecuada ventilación mecánica por presión de 30 ciclos/min, 225 μ L ciclos/vol durante todo el procedimiento, utilizando el ventilador Harvard HSE Mouse Ventilator MiniVent Type 845 (Harvard Bioscience, Holliston, MA, EE. UU.). Para realizar una correcta intubación, realizamos una pequeña sección en la piel del cuello localizando de esta manera la tráquea para la correcta visualización de la entrada de una cánula metálica de 1mm de diámetro junto con un adaptador en Y, en su interior (Fig 9A-B). A continuación, accedimos al corazón seccionando los músculos intercostales del cuarto espacio intercostal izquierdo y ampliamos la ventana quirúrgica manteniendo el acceso con la ayuda de retractores a ambos lados de la abertura. De esta forma, localizamos y accedimos con facilidad a la DA, que ocluimos mediante sutura 9/0 y la interposición de un tubo de 1 mm de sección con el fin de ejercer la suficiente presión en la DA, que nos permitiera bloquear el flujo y facilitar, además, la reperusión tras 30 minutos de isquemia, liberando fácilmente la lazada y minimizando así el daño en el tejido cardíaco (Fig 10).

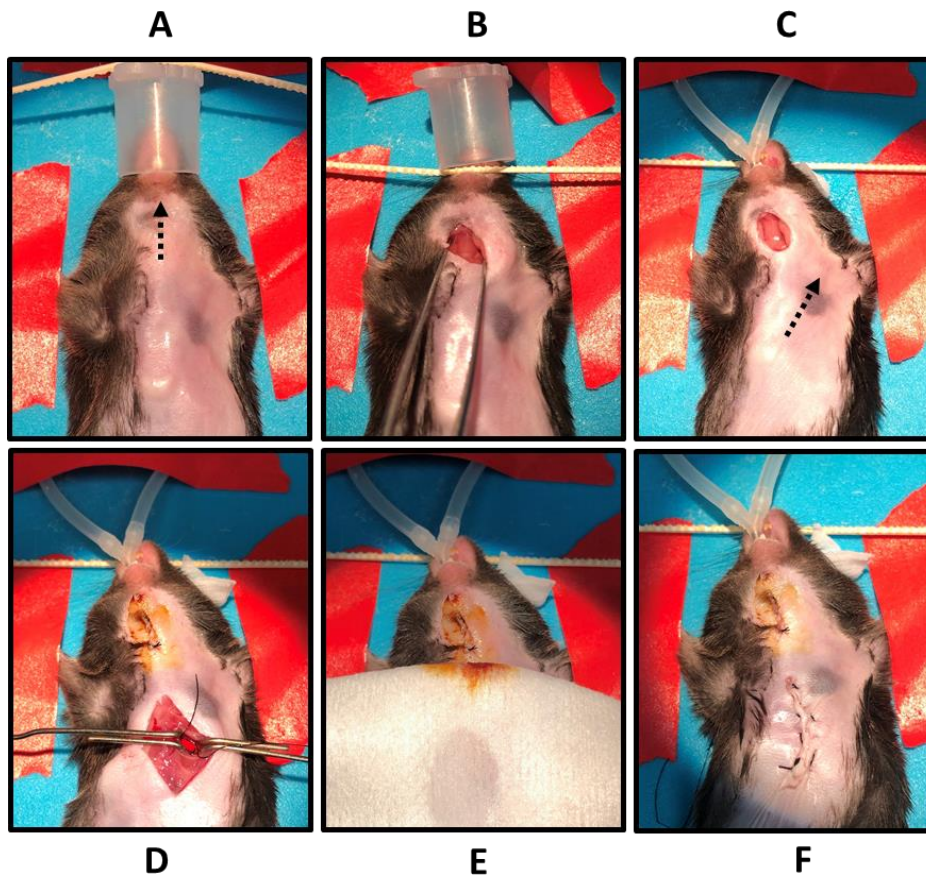


Figura 9. Procedimiento de I/R cardiaca en ratón. A. Localización de la zona de incisión previa a la intubación traqueal con el animal anestesiado y fijado. B. Visualización de la tráquea con ayuda de unas pinzas de punta redonda y la sujeción de los dientes del animal. C. Intubación mediante cánula y localización de la zona de la siguiente incisión. D. Abertura del cuarto espacio intercostal y ligadura de la DA con ayuda de sutura y tubo de 1 mm de grosor. E. Mantenimiento de la humedad torácica durante el periodo de isquemia de 30 minutos. F. Final del procedimiento, tras la sutura de la musculatura y la piel, antes de la recuperación de la consciencia del animal.

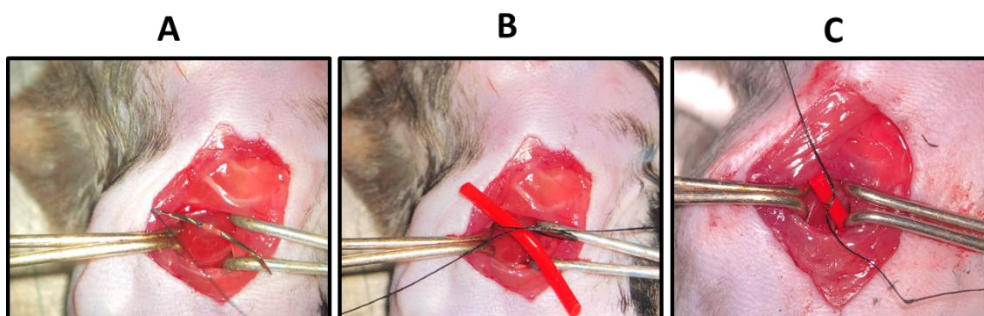


Figura 10. Detalle procedimiento I/R en ratón. A. Localización de la DA y sutura de esta con parte de pericardio y epicardio. B. Oclusión de DA mediante sutura y lazada simple con tubo de plástico de 1mm de diámetro. C. Periodo de isquemia.

Mantuvimos hidratada la cavidad torácica durante todo el procedimiento con suero fisiológico a 37 grados impregnado en gasas estériles (Fig 9E). Transcurrido un tiempo de isquemia de 30 minutos, cerramos la cavidad torácica suturando las costillas mediante sutura de seda 5/0 y posteriormente la piel del animal con sutura de seda de 4/0, mediante sutura continua. A continuación, extubamos al animal, oxigenándolo en un lecho a 37°C hasta la recuperación de la consciencia. Una vez finalizado el procedimiento, confirmamos la inducción de IAM mediante ECG, visualizando la elevación del segmento ST (Fig 11A) y posteriormente mediante ecografía.

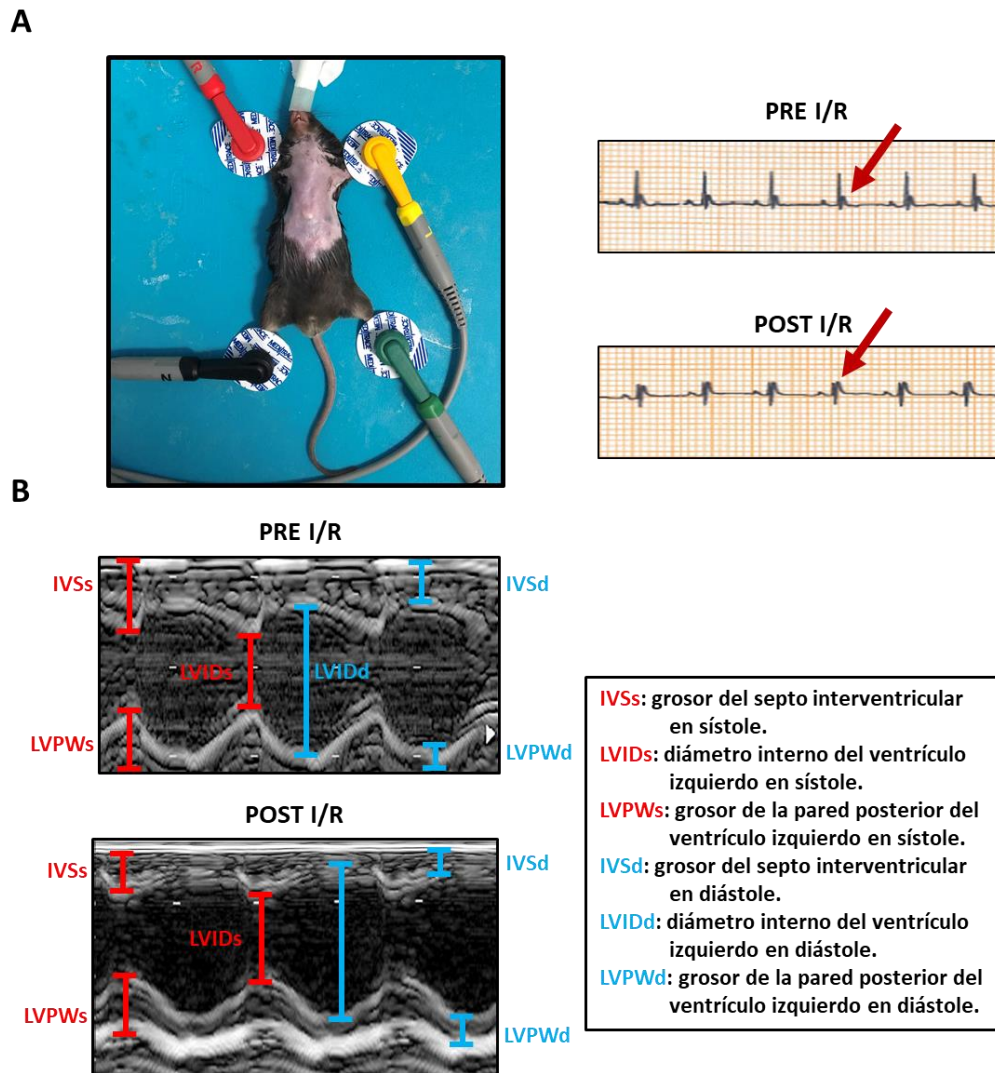


Figura 11. Evaluación de la función cardíaca del ratón durante el procedimiento de I/R cardíaca. A. Posición anatómica de electrodos para realizar el electrocardiograma en ratón. A la derecha se muestra el trazado electrocardiográfico en la derivación DII del animal antes (PRE) y después de la cirugía (POST) donde es posible visualizar segmento ST (flecha roja) y su elevación tras el procedimiento. **B.** Modo M ecocardiográfico donde se muestran los diferentes parámetros evaluados en el animal de experimentación en los mismos momentos del procedimiento, observando el descenso del grosor del septo interventricular tras el IAM.

Transcurridos 3 días del procedimiento quirúrgico, recogimos 500 µL de sangre periférica mediante punción del plexo venoso a nivel submandibular tras 3 y 7 días post-IAM, separando a continuación las diferentes fases de la sangre mediante centrifugación a 400 G durante 10 min. Una vez procesado, el plasma obtenido se almacenó a -20°C para su posterior utilización.

En un grupo de animales, realizamos el procedimiento de eutanasia mediante sobredosis de anestesia y dislocación cervical a los 3 días del procedimiento de I/R miocárdica, y en otro grupo, a los 7 días, extrayendo muestras de las regiones infartada (I) y sana (S) del corazón para su análisis proteico en un grupo de animales, o bien el corazón completo para su análisis por citometría de flujo o histológico.

2.2. Modelo porcino

Utilizamos un total de 34 cerdos de la raza Large White de entre 35-40 kg para realizar los ensayos de I/R miocárdica. Para ello, inyectamos a los animales con un cocktail de ketamina (20 mg/kg), xilacina (2 mg/kg) y midazolam (0,5 mg/kg) de manera intramuscular como método de inducción de anestesia para trasladar al animal a la mesa de quirófano. Para el mantenimiento anestésico tomamos una vía venosa periférica en la oreja del animal, perfundiendo de manera intravenosa ketamina (3 mg/kg/h), xilacina (0,45 mg/kg/h) y midazolam (0,4 mg/kg/h), mantenida en todo momento hasta los 15 minutos posteriores a la isquemia miocárdica. Una vez sedado, procedimos a su intubación orotraqueal y posterior ventilación mecánica invasiva en modo SIMV (PEEP 5 cm H₂O, FR 20, PSV 5, FiO₂ 28%), quedando preservada así la respiración espontánea. Guiados por ecografía, canalizamos la arteria femoral con un introductor 6F-7F (Fig 12) administrando un bolo de heparina no fraccionada (300 UI/kg) para prevenir la formación de trombos, junto con una infusión continua de amiodarona 260-300 mg/h, para evitar episodios arritmogénicos hasta la estabilización del animal tras el final del procedimiento.

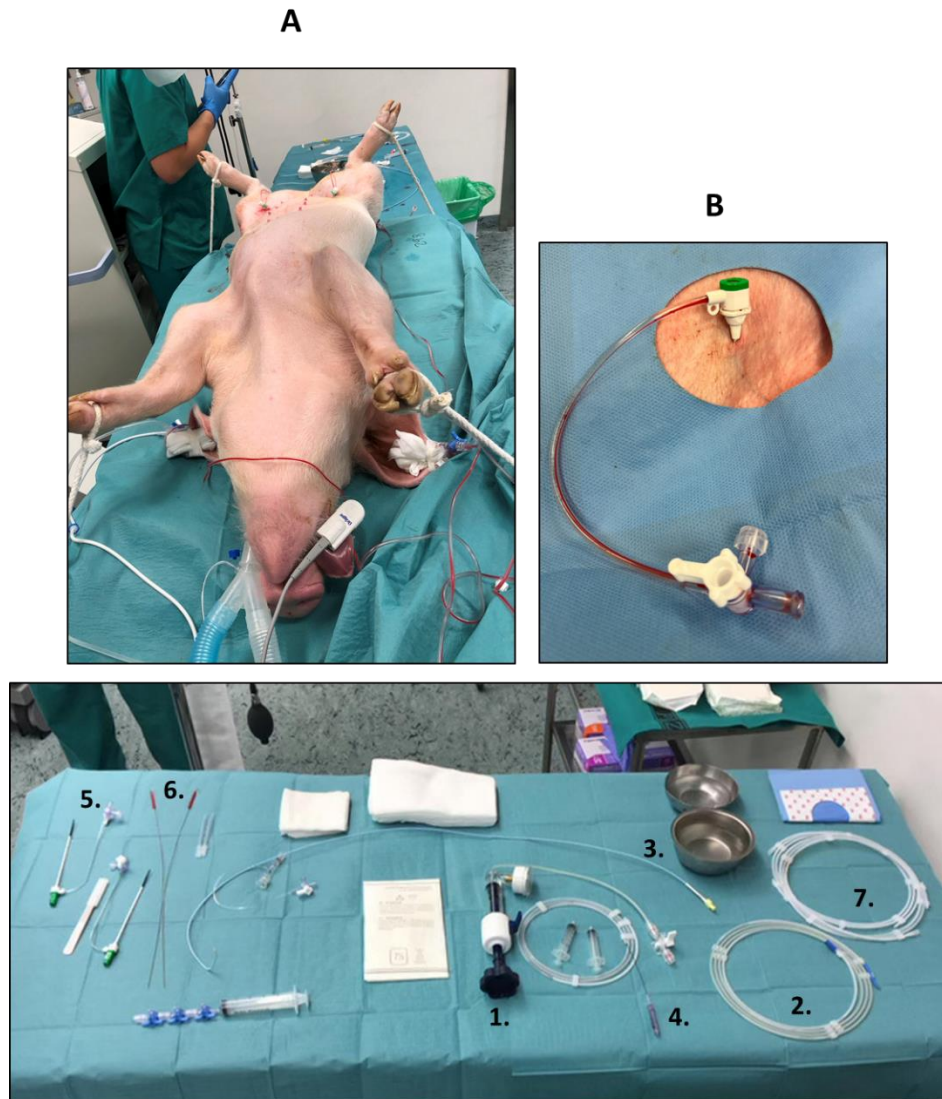


Figura 12. Animal en mesa quirúrgica monitorizado durante el procedimiento de I/R coronaria. A. Detalle intubación, control de la saturación de oxígeno mediante pulsioxímetro colocado en la lengua y dos vías venosas a nivel de la vena marginal de la oreja para la infusión de fármacos. **B.** Introdutor en acceso vascular femoral previo a la inserción del catéter guía en condiciones de esterilidad. La imagen inferior muestra la mesa quirúrgica preparada para la cirugía donde se describe el material utilizado en la intervención: 1. Manómetro. 2. Guía de catéter 0,35. 3. Catéter JL3 6F. 4. Balón de angioplastia. 5. Introdutor femoral 6F. 6. Dilatador del introductor. 7. Guía de angioplastia 0,14.

Una vez posicionado el introductor, junto con la medicación, sondamos la DA con un catéter guía de 5-6 F posicionando una guía de angioplastia distal en la arteria coronaria y el balón de angioplastia –de 2,5-3,5 mm de diámetro y ≤ 15 mm respectivamente– que progresamos y colocamos inmediatamente distal a la primera rama diagonal.

Una vez verificado el correcto posicionamiento del balón mediante angiografía e inyección de agente de contraste, procedimos al inflado del balón a una presión variable de 4 a 6 atmósferas, en función del peso del animal (Fig 13B-C-D), observando consiguientemente que el paso de contraste no fuera distal al extremo del balón inflado y se conservara la permeabilidad de la primera diagonal.

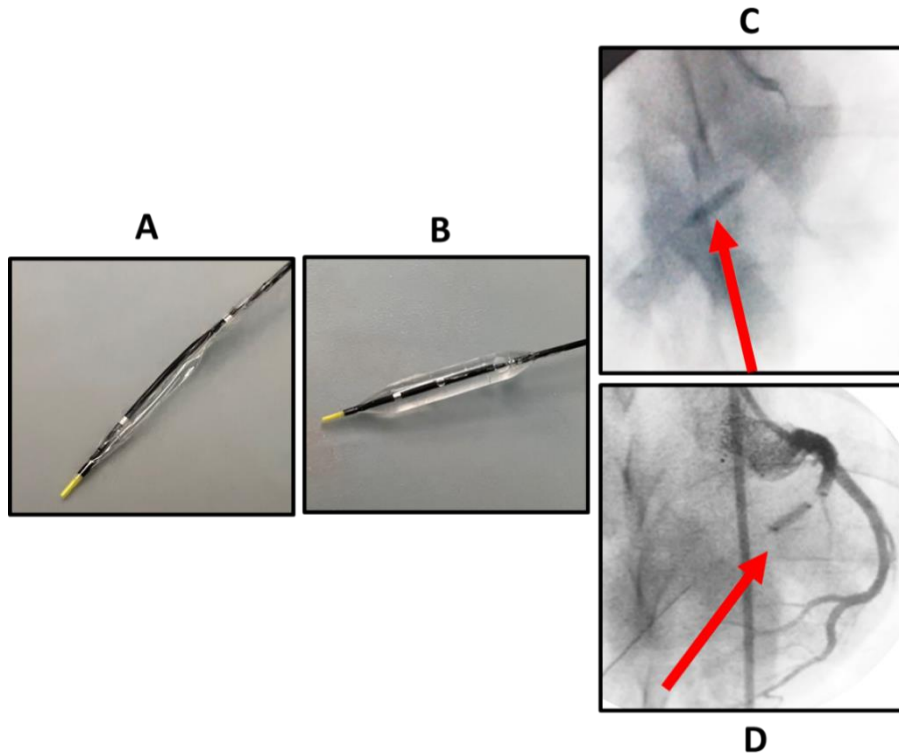


Figura 13. Funcionamiento del balón de angioplastia durante el procedimiento de I/R en cerdo. A. Balón de angioplastia desinflado. **B.** Balón de angioplastia inflado. **C.** Imagen de angiografía en la que se observa el posicionamiento del balón (flecha roja) sin inyección de agente de contraste. **D.** Imagen de angiografía en la que se observa el árbol coronario del animal de experimentación gracias a la infusión de agente de contraste y el balón inflado (flecha roja) a la altura de la segunda diagonal de la DA, obstruyendo el flujo sanguíneo coronario.

De forma previa a la isquemia miocárdica, iniciamos un procedimiento de “precondicionamiento cardiaco”, que consistió en el inflado y desinflado del balón dentro de la DA de manera transitoria en fases de 1, 3 y 5 minutos. En los casos en los que se produjo fibrilación auricular, realizamos choques eléctricos no sincronizados de 200 Julios mediante el uso de un desfibrilador bifásico. La estrategia de preconditionamiento cardiaco se basa en evidencias anteriormente descritas como una terapia sin controversia sobre su capacidad para limitar el tamaño de infarto y así eliminar un factor de confusión relevante en su posterior evaluación¹²⁷. En conjunto con ello, es una estrategia que mitiga el estrés fisiológico que supone la cirugía, aumenta la supervivencia del procedimiento y limita el sufrimiento del animal.

La eficacia del procedimiento, al igual que en el caso murino, la validamos mediante el estudio combinado electrocardiográfico y ecocardiográfico, de manera previa y posterior a este (Fig 14).

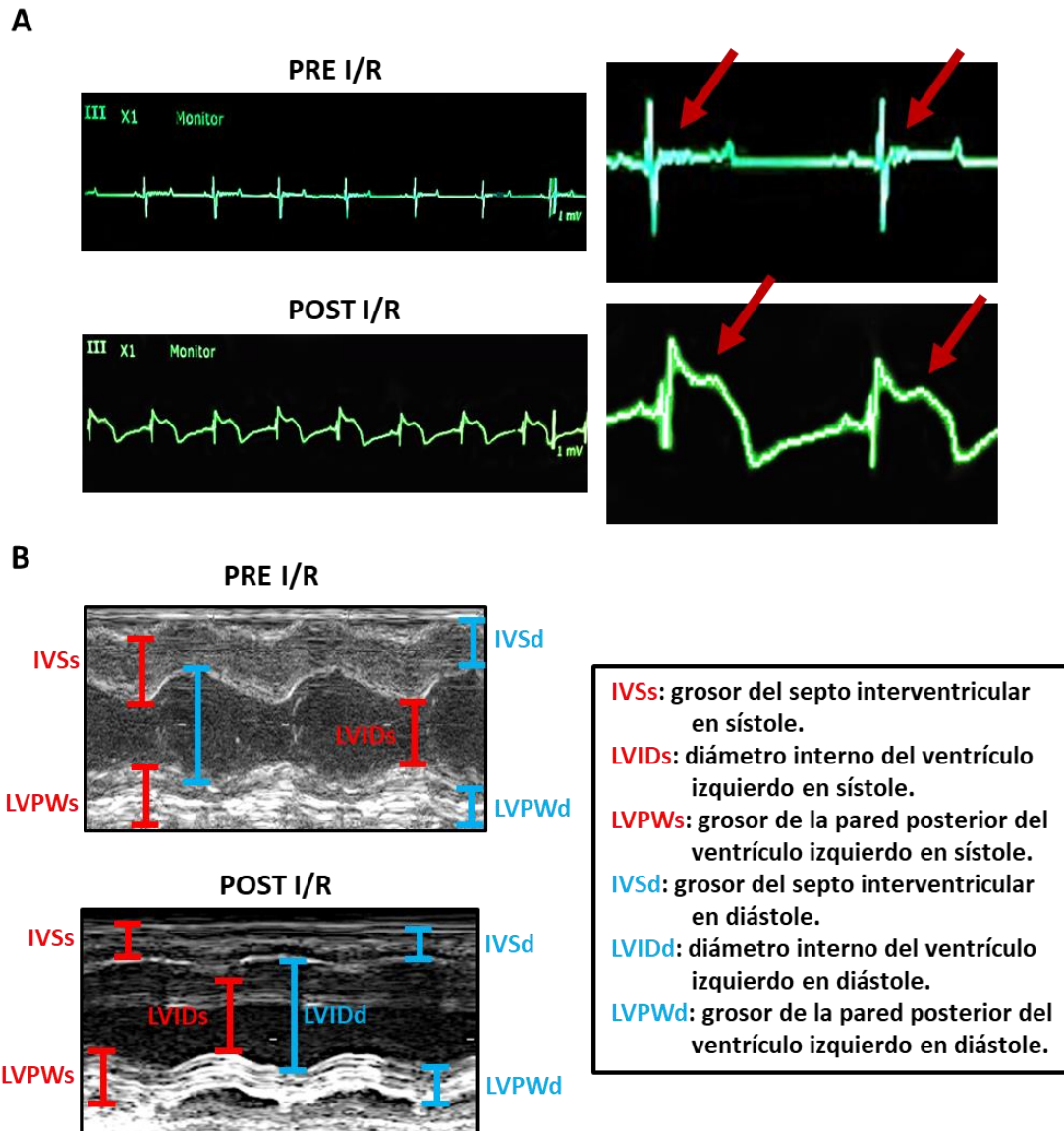


Figura 14. Evaluación de la función cardíaca del cerdo durante el procedimiento de I/R miocárdica. A. Trazado electrocardiográfico en la derivación DIII de forma previa (PRE) y posterior al procedimiento (POST). Las imágenes de la derecha son una ampliación de estos trazados, señalando el segmento ST normal y elevado (flecha roja), indicativo de la consecución del IAM. **B.** Modo M ecocardiográfico donde se muestran los diferentes parámetros evaluados en el animal de experimentación en los mismos momentos del procedimiento, destacando el descenso del grosor del septo interventricular tras el procedimiento.

Finalmente, tratamos a 17 de los animales con 1 mg/kg de NIL10 y a otros 17 con 1 mg/kg de NIL10SC, de manera aleatoria, por vía venosa durante la reperusión cardíaca y consiguiente estabilización de las constantes.

En todos los animales recogimos 5 mL de sangre periférica de la vena femoral para la obtención de plasma, separando las diferentes fases de la sangre mediante centrifugación a 400 G durante 10 min, a tiempos basal (PRE), tras la estabilización del animal (POST), 3 y 7 días post-IAM.

A los 7 días posteriores a la cirugía, procedimos a realizar el protocolo de eutanasia mediante sobredosis de anestésico y KCl –con el objetivo de mantener el corazón en diástole ventricular en el momento de su aislamiento– y recogimos muestras cardíacas de las regiones sana (S), de riesgo (R) e infartada (I) (Fig 15) con este fin.

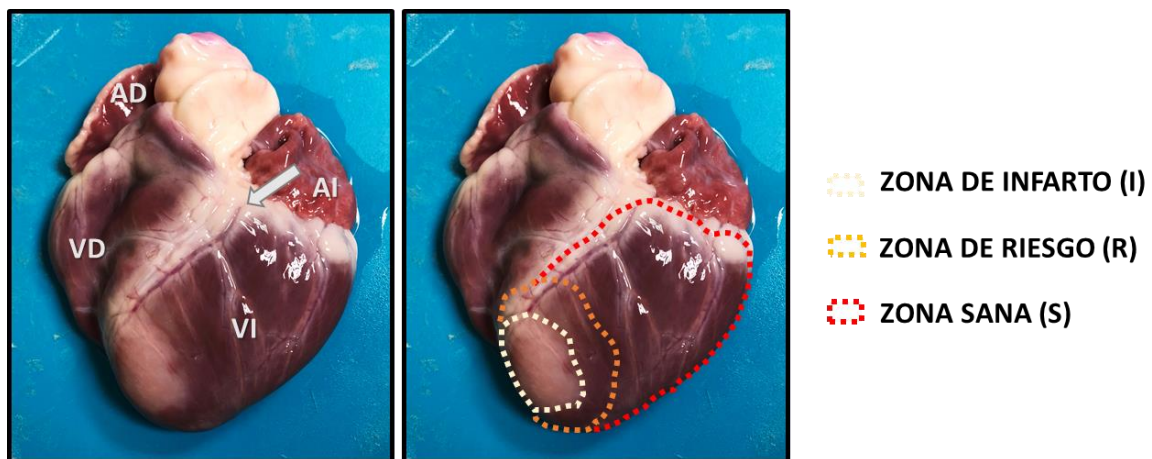


Figura 15. Cara anterior del corazón de cerdo. Estructuras que conforman el corazón y distinción de las tres áreas de estudio tras la consecución de un IAM al cabo de 7 días de reperusión. La flecha blanca indica la localización de la DA.

3. DETERMINACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD CARDIACA MEDIANTE ECOCARDIOGRAFÍA

Para estudiar la funcionalidad miocárdica post-IAM a lo largo del tiempo, realizamos un análisis ecocardiográfico utilizando el equipo portátil Vivid Q ultrasound GE Healthcare (General Electric, Chicago, IL, EE. UU.) equipado con una sonda de 1.9-4 MHz y 14.5 MHz, para la obtención de imágenes cardíacas en cerdos y ratones, respectivamente. Siguiendo las recomendaciones para mediciones lineales internas, obtuvimos imágenes del eje corto paraesternal izquierdo en modo bidimensional para localizar de manera precisa el área ventricular izquierda, sobre la que realizamos un modo monodimensional o modo M, gracias al cual calculamos los distintos parámetros de funcionalidad cardíaca. La evaluación de la función sistólica o la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) es un parámetro adimensional que se define como el volumen de latido (VL) expresado como porcentaje del volumen telediastólico (VTD). El volumen de latido es la cantidad de sangre eyectada por el ventrículo en un latido, siendo también la

diferencia entre el VTD y el volumen telesistólico (VTS). La FEVI es un parámetro que depende de la precarga, la poscarga y la contractilidad miocárdica, siendo los valores basales de FEVI por debajo del 50% indicativos de alguna patología, y categorizados en función de su severidad como FEVI deprimida de manera leve (40-50%), moderadamente deprimida (30-40%) y deprimida de manera severa (<30%).

$$FEVI \% = \frac{VTD - VTS}{VTD}$$

Adicionalmente, evaluamos los siguientes parámetros: grosor del tabique intraventricular telediastólico (IVS), diámetro interno de sístole y diástole en ventrículo izquierdo al final de la diástole (LVID), grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo telesistólico y telediastólico (LVPW), fracción de acortamiento del ventrículo izquierdo (FS), frecuencia cardiaca (FC) y el GC. El mismo operador se encargó de la adquisición y el análisis de datos para evitar error entre observadores. Las mediciones basales las realizamos en animales antes (PRE) de ser sometidos al procedimiento de I/R coronaria, después, tras la estabilización del animal (POST) y a los 7 días posteriores a la reperfusión coronaria con el fin de estudiar la mejora o deterioro en la función miocárdica.

4. VISUALIZACIÓN DEL ÁREA DAÑADA POR RESONANCIA MAGNÉTICA CARDIACA EN RATÓN

Todos los experimentos los realizamos en el servicio de Resonancia Magnética del Centro de Apoyo a la Investigación (CAI) de la Universidad Complutense de Madrid. Adquirimos las imágenes mediante el equipo Bruker Biospec 47/40 (Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen, Alemania) de 4.7 Tesla y equipado con un sistema de gradiente de 6 cm capaz de llegar a su máximo alcance con una fuerza de 450 mT/m. Colocamos a los animales en una cámara de inducción de anestesia con Isoflurano al 2,5% y oxígeno a un flujo de 0,8 litros/minuto durante 4 minutos. Posteriormente, procedimos a colocar los animales anestesiados en un carril de 3,5 cm (Bruker BioSpin GmbH) que sirvió como bobina, en posición cúbito prono, y los sometimos a una inhalación continua de anestesia a través de un cono nasal con una máscara conectada al gas anestésico mantenido entre el 1,5 y el 2% de Isoflurano con la ayuda del espectrómetro para mantener el ciclo respiratorio entre 60 y 80 latidos por minuto. Así pudimos adquirir las imágenes de forma ajustada al acoplamiento con la señal de electrocardiografía y recibidas del animal, que contaba con un sistema de monitorización y ajuste externo (SAIL, Nueva York, EE.UU.). Las imágenes anatómicas en T1 se adquirieron con una secuencia multicorte y los

siguientes parámetros: tiempo de repetición = 15 ms; Tiempo de eco = 2,5 ms; Número de experimentos promediados = 2; Campo de visión = 3 x 3 cm²; Espesor de corte = 1,0 mm; Matriz adquirida = 128 x 128. Para localizar los planos de imagen de eje corto, procedimos a la adquisición de imágenes de dos y cuatro cámaras a lo largo de todo el corazón del ratón.

Las secuencias modificadas pre-contraste y post-contraste nos permitieron obtener el tiempo de relajación longitudinal (T1) y transversal (T2), que nos facilitaron estudiar la anatomía cardíaca de forma precisa y detectar el miocardio afectado de manera correcta. Así mismo, evaluamos el realce de gadolinio tras la administración de las nanopartículas, conjugadas con este agente de contraste. Realizamos las adquisiciones tras 24 horas de reperfusión, después de la inyección con las NPs. El cálculo de los tiempos de relajación T1 y T2 se realizó con el software ParaVision 6.0.1 (Bruker BioSpin GmbH).

5. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS TISULARES Y ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Las muestras tisulares las fijamos en solución de formol al 10% para su posterior inclusión en parafina siguiendo los métodos convencionales aplicados en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Ramón y Cajal, que consiste en lavar las muestras con agua destilada para después deshidratarlas usando concentraciones crecientes de etanol (70%-100%). Tras este proceso, las incubamos con Xilol con el fin de permitir su correcta inclusión en parafina con ayuda de un molde metálico. De los bloques de parafina obtuvimos secciones histológicas de 5 µm de grosor utilizando el micrótopo HM 325 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). A continuación, extendimos los cortes en agua a 37°C para ser posteriormente depositados en portaobjetos tratados con Polilisina. A continuación, desparafinamos las muestras incubándolas durante 24 horas a 60°C, tras lo que las incubamos con Xilol. Finalmente, utilizando una batería de concentraciones decrecientes de etanol (100-70%) rehidratamos las muestras hasta incubarlas en agua destilada.

5.1. Estudios de biodistribución por inmunofluorescencia

Para analizar los tejidos diana de NIL10 en ratones y cerdos control, utilizamos secciones de corazón, pulmón, hígado, riñón, páncreas y bazo. Ensamblamos las preparaciones con un medio de montaje soluble en agua combinado con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Abcam, Cambridge, Reino Unido) para visualizar los núcleos de las células en azul y la señal de rodamina conjugada en las NPs, en rojo. Finalmente, visualizamos las preparaciones mediante el microscopio confocal Leica TCS SP5 (Leica, Wetzlar, Alemania).

5.2. Análisis de la preservación de la estructura cardíaca en animales infartados

Para evaluar la estructura cardíaca, teñimos las secciones cardíacas de las diferentes regiones de estudio (área sana, área de riesgo y área de infarto) con hematoxilina-eosina (HE) en cerdos tras 7 días de reperfusión post-IAM, y en ratones tras 3 y 7 días de reperfusión. Además, evaluamos el grado de fibrosis cardíaca en secciones de las mismas muestras usando la tinción tricrómica de Masson (TM).

5.3. Inmunohistoquímica del área necrótica cardíaca

Una vez concluida la rehidratación de las muestras, llevamos a cabo un proceso de desenmascaramiento antigénico utilizando tampón citrato a un pH de 6 (Dako, Glostrup, Dinamarca) con el objetivo de recuperar la inmunoreactividad de aquellos epítomos que de alguna forma pudieran encontrarse enmascarados dentro de la preparación. Posteriormente, inactivamos la peroxidasa endógena durante 10 minutos e incubamos con el correspondiente anticuerpo primario durante 16 horas a temperatura ambiente, a la dilución específica recomendada por el fabricante. Para eliminar el exceso de anticuerpo primario realizamos tres lavados con PBS 1x y, a continuación, incubamos las muestras durante 1 hora con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), a la dilución recomendada. Finalmente, tras lavar las preparaciones de manera repetida con PBS, aplicamos el reactivo cromógeno diaminobencidina (DAB), que al reaccionar con la enzima HRP conjugada con el anticuerpo secundario, emitirá un color marrón en el espectro visible. Para poder visualizar los núcleos celulares realizamos una contratinción con HE, y finalmente montamos las preparaciones con un medio de montaje compuesto por resina acrílica con base de xileno (DPX), proceso tras el cual adquirimos las imágenes con un microscopio de campo claro en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Ramón y Cajal. Todos los reactivos usados para inmunohistoquímica fueron del kit "Dako REAL™" Detection System (Dako).

5.4. Análisis histopatológico por Evans blue/TTC

Para el análisis histopatológico del corazón en cerdos tras 7 días de reperfusión post-isquemia, seguimos el mismo protocolo anestésico de ventilación, acceso vascular y oclusión coronaria descrita en el apartado 2.2. Ocluimos la DA en el mismo punto de la oclusión inicial, siguiendo las mismas referencias angiográficas. A su vez, procedimos a introducir un segundo catéter por la segunda arteria femoral, alojándolo en el VI del animal. Este segundo catéter denominado pigtail, lo utilizamos para infundir 100 mL de una solución del colorante Evans blue al 5% en 0,9 NaCl en la cavidad del VI tras el inflado del balón de angioplastia en la DA (Fig 16). Gracias a este

abordaje, el colorante perfundió a través del VI a todos los tejidos del animal, excepto aquellos en los que se produjera la obstrucción del cualquier vaso sanguíneo del cual depende el tejido subyacente. Este proceso tuvo lugar en el tramo posterior a la primera diagonal del VI, la misma zona que 7 días antes habíamos ocluido mediante angioplastia coronaria. De esta forma, conseguimos diferenciar el miocardio sano (S) del afectado, que comprende el área de riesgo (R) entendida como la porción del miocardio sano susceptible de necrosis, y el área infartada (I), entendida como la región del miocardio necrosada. Tras la visualización del cambio azulado del animal en toda su extensión, procedimos a realizar la eutanasia del animal para aislar del corazón.

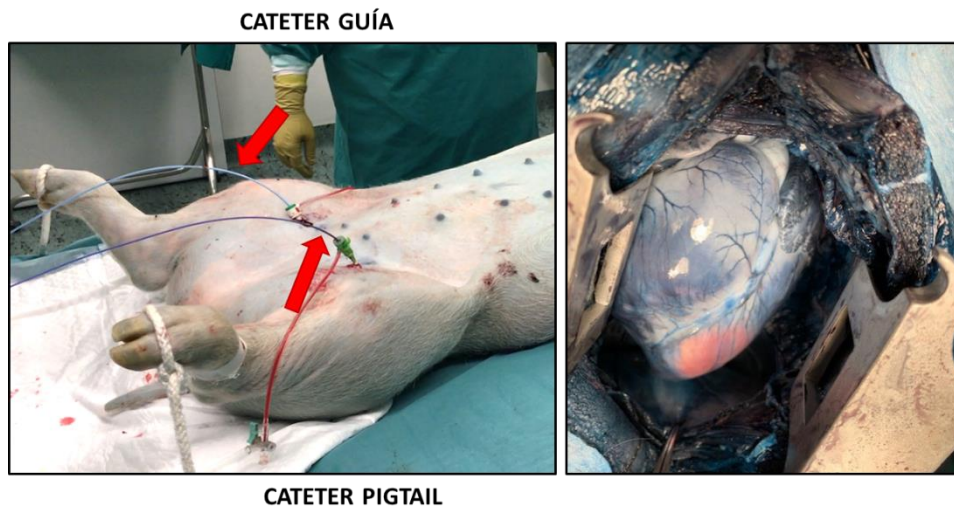


Figura 16. Infusión de Evans blue mediante acceso percutáneo femoral con un catéter pigtail alojado en el VI. La flecha roja superior indica la zona de inserción del catéter con el balón de angioplastia, alojado e inflado tras la primera diagonal de la DA, y la flecha roja inferior, el abordaje utilizado en la segunda arteria femoral para introducir el catéter pigtail en el VI. La imagen de la derecha muestra la tinción del corazón antes de su extracción, donde se reconoce la coloración característica en azul de la zona sana.

Una vez aislamos el corazón, lo almacenamos a -20°C para posteriormente realizar secciones transversales de 8 mm de grosor en el eje corto del órgano. Todas las secciones las incubamos en presencia de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) diluido al 1% en 0,9 NaCl a 37°C en rotación durante 20 minutos. La incubación con el reactivo TTC permite detectar tejidos metabólicamente activos: el tetrazolio se reduce enzimáticamente al compuesto denominado formazán, de color rojo, por la acción de enzimas de tipo deshidrogenasa, revelando de esta manera actividad mitocondrial. Las células muertas, no reducirán al tetrazolio y, por tanto, el tejido necrosado permanecerá de un color pálido. Tras la tinción con TTC, fijamos las secciones con una solución de paraformaldeído (PFA) diluida al 10% y finalmente, procedimos a la documentación de cada una de las secciones mediante fotografía de alta resolución.

Este protocolo nos ha permitido determinar con rigor las tres áreas cardíacas para su cuantificación (S, R, I) con la aplicación ImageJ, así como cuantificar de manera precisa la extensión del área necrosada (tejido no teñido), expresándola como porcentaje respecto al área de riesgo (tejido de color rojo), evitando de esta forma cualquier tipo de sesgo en virtud del tamaño total del corazón. Los reactivos utilizados los obtuvimos de Thermo Fisher Scientific.

6. ANÁLISIS DE POBLACIONES CELULARES MEDIANTE SUSPENSIÓN DE CÉLULAS INDIVIDUALES

6.1. Marcaje de macrófagos miocárdicos

Para determinar las poblaciones de macrófagos miocárdicos presentes tras 3 y 7 días de la inducción del IAM en ratones, procedimos al aislamiento del corazón completo y su mantenimiento en el medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS) y un 5% de la mezcla antibiótica Penicilina/Estreptomicina (P/S). Después, trituramos y disgregamos el tejido utilizando un filtro estéril (Corning, Nueva York, NY, EE.UU.) para el aislamiento de células, con un diámetro de tamiz de 40 μm . Para aislar la porción celular, centrifugamos la muestra a 350 G durante 5 minutos y lisamos los eritrocitos que pudieran permanecer en la suspensión de células con el tampón cloruro de amonio-potasio (ACK) durante 10 minutos a 4°C. A continuación, lavamos las muestras con PBS 1x y las mantuvimos en un tampón compuesto por 1% FBS en PBS 1x (FACS) mediante centrifugaciones sucesivas de 350 G durante 5 minutos.

Para determinar la población de macrófagos presentes, incubamos las células con una mezcla de los anticuerpos anti-CD68 y anti-CD206, conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) respectivamente, a la dilución recomendada, durante 30 minutos a 4°C en oscuridad (Tabla 3). Después de lavar las muestras con PBS 1x y realizar tres centrifugaciones más en las mismas condiciones, preservamos las células en tampón FACS para su análisis por citometría de flujo. Todos los reactivos utilizados procedieron de Thermo Fisher Scientific.

6.2. Determinación de poblaciones de macrófagos por citometría de flujo

Llevamos a cabo la técnica de citometría de flujo utilizando el citómetro MACSQuant Analyzer 10 Flow Cytometer (Bergisch Gladbach, Alemania) para analizar la presencia de macrófagos y distinguir las poblaciones de los mismos. Realizamos una primera clasificación, atendiendo a los parámetros de complejidad y tamaño celular, para así poder diferenciar y seleccionar una región correspondiente a los macrófagos.

Adquirimos un total de 30000 eventos por muestra y, dentro de dicha región, medimos la señal de fluorescencia emitida por la población de células positivas para CD68-FITC correspondientes a macrófagos totales, y obteniendo el porcentaje relativo a esta población celular. A partir de la población determinada previamente, haciendo uso del formato dot plot, seleccionamos las células marcadas con CD206-PE pertenecientes a la población de macrófagos resolutivos o de tipo M2, gracias a lo cual pudimos obtener los porcentajes relativos de dos poblaciones de macrófagos. Como control de fluorescencia marcamos células con un solo anticuerpo de los 2 empleados: anti-CD68 y anti-CD206 (Tabla 4). Como control negativo, utilizamos muestras de células sin teñir.

Anticuerpo	Huésped	Dilución	Referencia	Casa comercial
MMP-9	Conejo	1:2000	ab38898	Santa Cruz (Dallas, TX, EE. UU.)
IL-10RA	Conejo	1:1000	ab225820	Abcam
NF- κ B (p65)	Conejo	1:500	sc-109	Santa Cruz
Secundario-Alexa Fluor 488	Burro anti-conejo	1:1000	ab15008	Abcam
CD68-FITC	Ratón	1:100	AB_795874	Thermo Fisher Scientific
CD206-PE	Ratón	1:100	AB_2637422	Thermo Fisher Scientific
GAPDH	Ratón	1:2000	ab22555	Abcam
β -Tubulina	Conejo	1:2000	ab6046	Abcam
STAT3	Conejo	1:1000	79D7	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EE. UU.)
P-STAT3	Conejo	1:1000	D3A7	Cell Signaling Technology
P-IL-10RA	Ratón	1:1000	PA5-104991	Thermo Fisher Scientific
I κ B- α	Conejo	1:1000	sc-371	Santa Cruz
P-I κ B- α	Conejo	1:1000	14D4	Cell Signaling Technology
iNOS	Conejo	1:1000	sc-651	Santa Cruz
Secundario	Burro anti-conejo	1:3000	ab97080	Abcam
Secundario	Conejo anti-ratón	1:3000	ab97023	Abcam

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en las técnicas de inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, citometría de flujo y Western Blot.

7. CULTIVOS CELULARES

La línea celular RAW 264.7 fue establecida desde un tumor en ratón inducido por el virus de la leucemia murina de Abselon. Se trata de células de morfología monocitaria-macrofágica procedentes de la colección europea de cultivos celulares (ECACC). Esta línea prolifera en monocapa adherente y se cultiva a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de contenido en CO₂.

Para realizar los diferentes experimentos, cultivamos los macrófagos en DMEM complementado con L-glutamina, un 5% de FBS y un 10% de P/S hasta alcanzar una confluencia aproximada del 70% para prevenir su activación, y realizamos pases de las mismas en relación 1:10 para el mantenimiento de la línea.

7.1. Ensayos de especificidad de NIL10

Con el fin de confirmar la correcta unión del péptido IT9302 conjugado en NIL10 al receptor de IL-10, utilizamos la dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para tratar las células RAW 264.7 tanto de la nanopartícula NIL10 como de la nanopartícula NIL10SC. Transcurridos 60 minutos de incubación con las NPs, lavamos parte de las placas con PBS 1x y visualizamos las células utilizando microscopía confocal con el fin de estudiar la unión de las NPs a las células vivas, mientras que el resto de placas las utilizamos para ensayos de inmunofluorescencia, para lo que las fijamos y conservamos en PFA al 4%.

7.2. Ensayos de activación de macrófagos y estudio de la ruta de señalización IL-10R/STAT3 por inmunofluorescencia

Con el fin de estudiar la implicación de NIL10 en la activación del eje de señalización IL-10R/STAT3, sembramos e incubamos las células RAW 264.7 hasta que alcanzaron un 60% de confluencia. En este punto, las sometimos a diferentes condiciones: exposición a LPS, incubación con NIL10, co-incubación LPS+NIL10 o el equivalente con la nanopartícula control, LPS+NIL10SC. A este bloque de ensayos, añadimos las mismas condiciones en combinación adicional con el inhibidor farmacológico de STAT3, Stattic, que previene la fosforilación de STAT3, y por lo tanto bloquea la cascada de señalización inducida a partir de este factor de transcripción. Tras un periodo de incubación de 4 horas, lavamos las células con PBS 1x y las fijamos con metanol a 4°C. Una vez fijadas, permeabilizamos las células con Tritón X-100 diluido al 0,1% en PBS 1x para la adecuada detección de NF- κ B, el factor de transcripción más relacionado con el despliegue de la respuesta inflamatoria. Incubamos las células durante 1 hora con el anticuerpo primario, tras lo que las lavamos e incubamos posteriormente con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa flúor 488 durante 1 hora en oscuridad (Tabla 4). Las diluciones que utilizamos para incubar ambos anticuerpos fueron las recomendadas por el fabricante. Finalmente, montamos las muestras con medio de montaje soluble en agua combinado con DAPI (Abcam) para la visualización de los núcleos y su almacén.

8. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN PROTEICA

8.1. Análisis de citoquinas y quimioquinas en plasma

Con el fin de estudiar la respuesta inmune sistémica al tratamiento con NIL10 en animales sometidos a I/R cardiaca, utilizamos muestras de plasma de sangre periférica basal y tras 3 días de reperfusión post-infarto en ratones y cerdos, para detectar la expresión de citoquinas y quimioquinas de interés empleando el kit “Profile Cytokine Array Kit” (RD Systems, Minneapolis, MN, EE. UU.). Las citoquinas que estudiamos figuran en la tabla que aparece a continuación.

CITOQUINAS INFLAMATORIAS	CITOQUINAS ANTI-INFLAMATORIAS	QUIMIOQUINAS
C5a	IL1-RA	CXCL1
G-CSF	IL-4	CXCL2
GM-CSF	IL-5	CXCL3
CCL1	IL-7	CXCL9
CCL11	IL-10	CXCL10
sICAM-1	IL-11	CXCL11
IFN- γ	IL-13	CXCL12
IL1- α	IL-16	CCL2
IL1- β	IL-27	CCL3
IL-2		CCL4
IL-3		CCL5 (RANTES)
IL-6		CCL12
IL-12-p70		CCL17
IL-17		
IL-23		
TNF- α		
TREM-1		
M-CSF		

Tabla 4. Citoquinas detectadas y clasificadas en función de su naturaleza.

8.2. Extracción y cuantificación de proteína

Realizamos el aislamiento de lisados proteicos tanto de células en cultivo como de muestras de tejido utilizando el tampón de extracción y lisis comercial “Pierce© RIPA” (Thermo Fisher Scientific) compuesto por 0,5M de Tris-HCl, 1,5M de NaCl, un 2,5% de ácido desoxicólico, un 10% de NoniDet P40 y 10 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) suplementado con una pastilla del inhibidor de proteasas “cOmplete Mini” (Roche, Basilea, Suiza) y una pastilla de inhibidor de fosfatasa “PhosSTOP EASYpack” (Roche).

En el caso del tejido cardiaco, trituramos las muestras con ayuda de un mortero para la resuspensión de sedimentos (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y después lisamos el tejido con el mismo tampón de lisis. A continuación, incubamos los lisados a 4°C durante 30 minutos en rotación y los centrifugamos a 1000 G durante 10 minutos. Una vez aislado el sobrenadante que contiene el extracto proteico, cuantificamos la concentración de proteínas mediante la técnica colorimétrica con ácido bicinconímico. Para ello, utilizamos el kit comercial “Pierce™ BCA Protein Assay” siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Como curva patrón utilizamos el kit comercial “Pierce™ Bovine Serum Albumin Standard Pre-Diluted Set”. La cuantificación colorimétrica la realizamos en el espectrofotómetro Nanodrop, calculando la concentración de proteína mediante regresión lineal sobre la recta patrón. Todos los reactivos y equipos los obtuvimos de Thermo Fisher Scientific.

8.3. Detección de proteínas mediante inmunoblot (Western blot)

Para realizar la técnica de Western blot, utilizamos 20 µg de extracto proteico total, a lo que añadimos el tampón de carga compuesto por β-mercaptoetanol 1x y Laemli Sample Buffer 1x - compuesto por azul de bromofenol al 0.004%, 400 mM de DTT, 0,125 de Tris, un 20% de glicerol y SDS al 4%- y una incubación de 5 minutos a 95°C con el fin de reducir y desnaturalizar las proteínas, obteniéndolas en su estructura primaria y asegurando así la accesibilidad del anticuerpo a su sitio de unión. Separamos las proteínas mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida a una concentración variable en función del peso molecular de la proteína a detectar, con tampón Tris Glicina 1x y SDS 20%. Una vez separadas las proteínas, las transferimos a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) utilizando un tampón de transferencia compuesto por Tris Glicina 1x y un 20% de metanol para realizar un método de transferencia semiseco con el equipo Trans-Blot® Turbo™ Transfer System. Todos los materiales utilizados los obtuvimos de la casa comercial Bio-Rad (Bio Rad, California, EE.UU.). Una vez transferidas las proteínas, bloqueamos las membranas a temperatura ambiente con albúmina de suero bovino (BSA) diluida al 3% en tampón tris salino compuesto por 25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20, pH 7.4 o tampón tris salino con el detergente Tween 20 (TTBS) e incubadas con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 4) diluido en tampón BSA al 1,5% a 4°C en rotación durante 16 horas. Transcurrido ese tiempo, lavamos las membranas 3 veces con tampón TTBS con el fin de eliminar el exceso de anticuerpo primario adherido y las incubamos con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con HRP durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación. A continuación, lavamos nuevamente las membranas tres veces con tampón TTBS, eliminamos el exceso de humedad, para a continuación detectar las proteínas

mediante luminiscencia con el kit “Pierce™ ECL Western Blotting Substrate” (Thermo Fisher Scientific). Las membranas fueron a continuación introducidas en el equipo de detección de quimioluminiscencia Fusion Solo-S (Vilber Lourmant, Collégien, Francia), para la detección de las proteínas de manera específica con ayuda del software Fusion-Capt, aportado con el equipo de instrumentación. Todas las membranas fueron utilizadas además para la detección de las proteínas gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) o β -Tubulina, utilizadas como control de carga. Finalmente, llevamos a cabo la cuantificación de la señal de quimioluminiscencia mediante densitometría utilizando la aplicación Image J.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Hemos realizado todos los cálculos estadísticos con los programas GraphPad Prism y SPSS (IBM Corporation, Armonk, NY, EE.UU.). Utilizamos el test de Shapiro-Wilk para conocer si los datos presentaban una distribución normal. Como no seguían dicha distribución, realizamos la comparación entre grupos utilizando el análisis no paramétrico U de Mann Whitney. Las diferencias significativas se fijaron con $p < 0,05$ en todos los cálculos estadísticos empleados.

Resultados

1. Diseño experimental

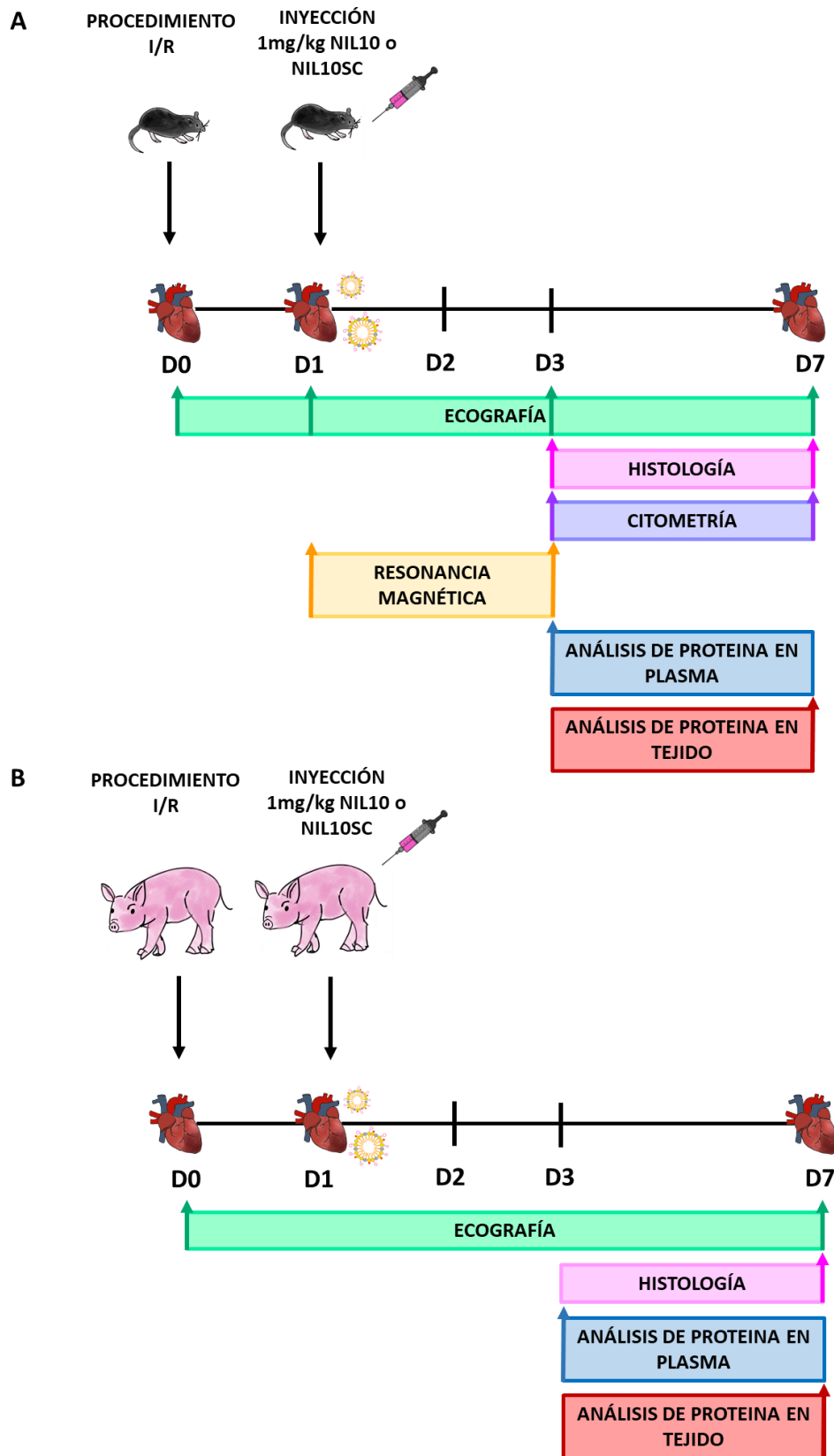


Figura 17. Diseño experimental del trabajo de investigación desarrollado en modelos animales de I/R.

1. Síntesis y caracterización físico-química de las nanopartículas NIL10 y NIL10SC

Las NPs fueron sintetizadas con una base micelar a base de DSPE-PEG (2000), un lípido conjugado con polietilenglicol (PEG) funcionalizado y cargado con maleimida como molécula de anclaje para la conjugación a los péptidos seleccionados, dotándolos de flexibilidad. Los péptidos utilizados, de secuencia aminoacídica conocida (Tabla 2) se componen de 10 aminoácidos ordenados (péptido IT9302), o en posición descolocada respecto al péptido IT9302 (*scramble*), descrito inicialmente como 100% homólogo a la secuencia de IL-10 y correspondiente al extremo carboxilo terminal (residuos 152-160) de la citoquina¹²⁴. Además, las NPs fueron dotadas de propiedades paramagnéticas, gracias a lo cual pudimos proceder a su visualización en campos magnéticos mediante RM. Para ello, se incluyó en su composición gadolinio, de carácter anfipático, con un agente quelante para evitar su toxicidad (Gd-DTPA-BSA), gracias a lo cual, pudimos visualizar el proceso inflamatorio de forma no invasiva tras el IAM. Finalmente, se incluyó el fluoróforo rodamina (conjugada a FE), lo que le confirió propiedades fluorescentes en el espectro de emisión de rojo (568 nm), empleando microscopía confocal o de fluorescencia, como mecanismo último de confirmación de la presencia de las NPs en el tejido. La estructura molecular completa de los componentes de la nanopartícula se describe en la Figura 18.

Las características físico-químicas de las NPs incluidas en este estudio se describen en la Tabla 5. Los datos obtenidos muestran que el tamaño hidrodinámico de las micelas esféricas, NIL10 y NIL10SC se encontraban en rangos medios de entre 111,5 y 135 nm, mientras que el potencial zeta, cuyo valor informa sobre la estabilización de las NPs debido a la repulsión electrostática, fue de entre 22,7 - 28,9 mV indicando la baja propensión a la agregación de las nanosondas. Los valores de relajatividad (r_1 y r_2) y su cociente fueron adecuados, similares a los fármacos para contraste de RM normalmente utilizados, basados en complejos de gadolinio (Tabla 5).

Lote	PDI	Tamaño hidrodinámico (nm)	Potencial z (mV)	r_1 ($s^{-1} mM^{-1}$)	r_2 ($s^{-1} mM^{-1}$)	r_2/r_1
Micela	0,253	111,5	-28,9	28,93	55,21	1,91
NIL10	0,280	135	-22,7	18	39,07	2,17
NIL10SC	0,263	132.6	-26,7	19,53	46,77	2,39

Tabla 5. Datos físico-químicos de las nanopartículas. Descripción de los valores correspondientes al PDI, el tamaño hidrodinámico, el potencial zeta, la relajatividad longitudinal (r_1) y transversal (r_2) y su cociente, en las micelas vacías y en las NPs generadas NIL10 y NIL10SC.

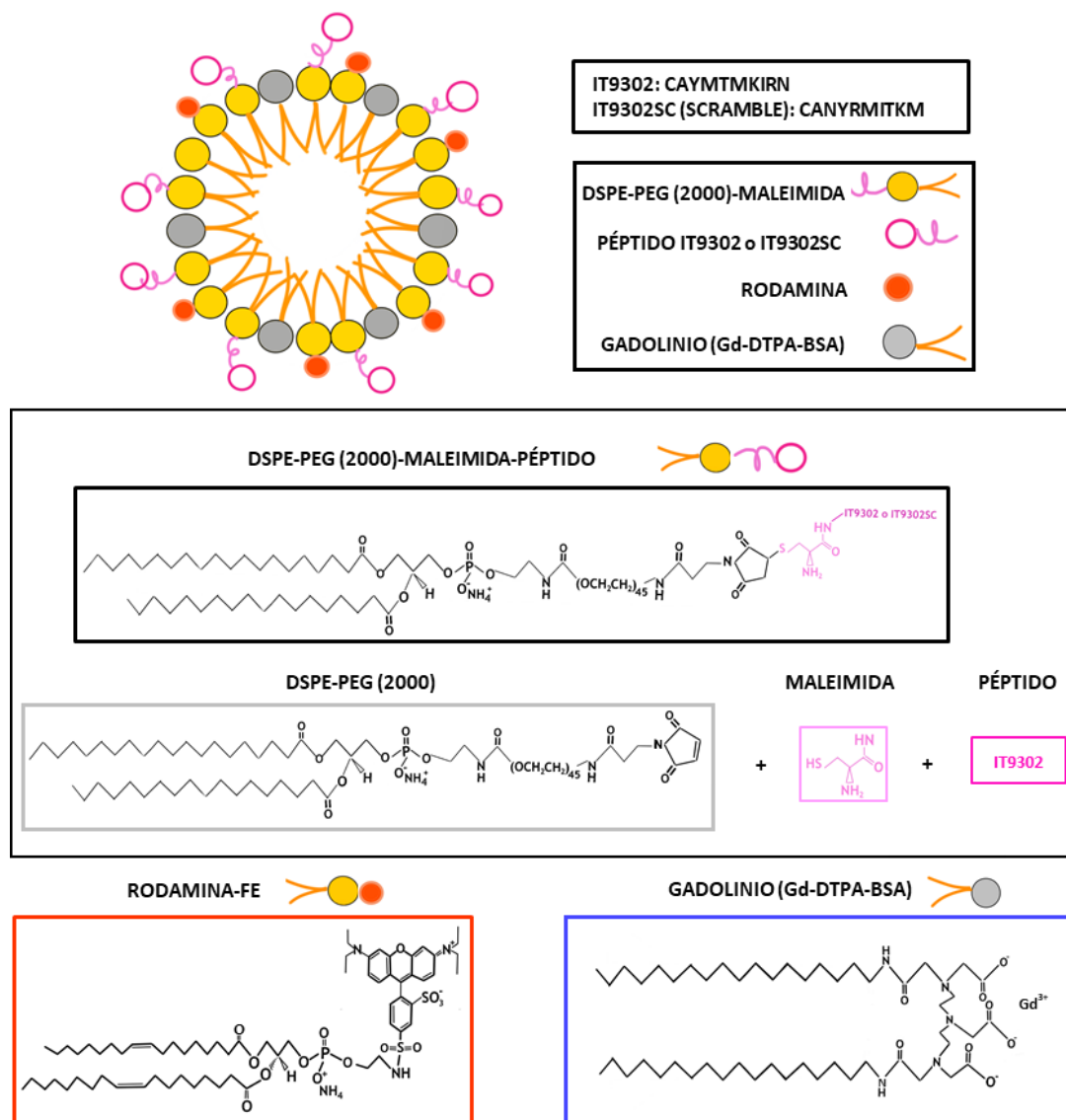


Figura 18. Fórmula estructural de los componentes de la nanopartícula NIL10 y NIL10SC.

2. Caracterización funcional de NIL10

Para estudiar la capacidad de unión de NIL10 a su diana, utilizamos la línea celular de macrófagos de ratón RAW 264.7. Incubamos las células con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NIL10 o NIL10SC y detectamos la co-localización de la señal de emisión de la rodamina de dichas NPs (568 nm, rojo) e IL-10RA utilizando un anticuerpo secundario específico conjugado con FITC (492 nm, verde) mediante microscopía confocal. La combinación de las dos señales superpuestas en los macrófagos se visualizó en amarillo (Fig 19) siendo el porcentaje de co-localización de pixels del 77% y del 21% en NIL10 y NIL10SC, respectivamente. Este dato nos permitió confirmar la especificidad de NIL10 por su diana.

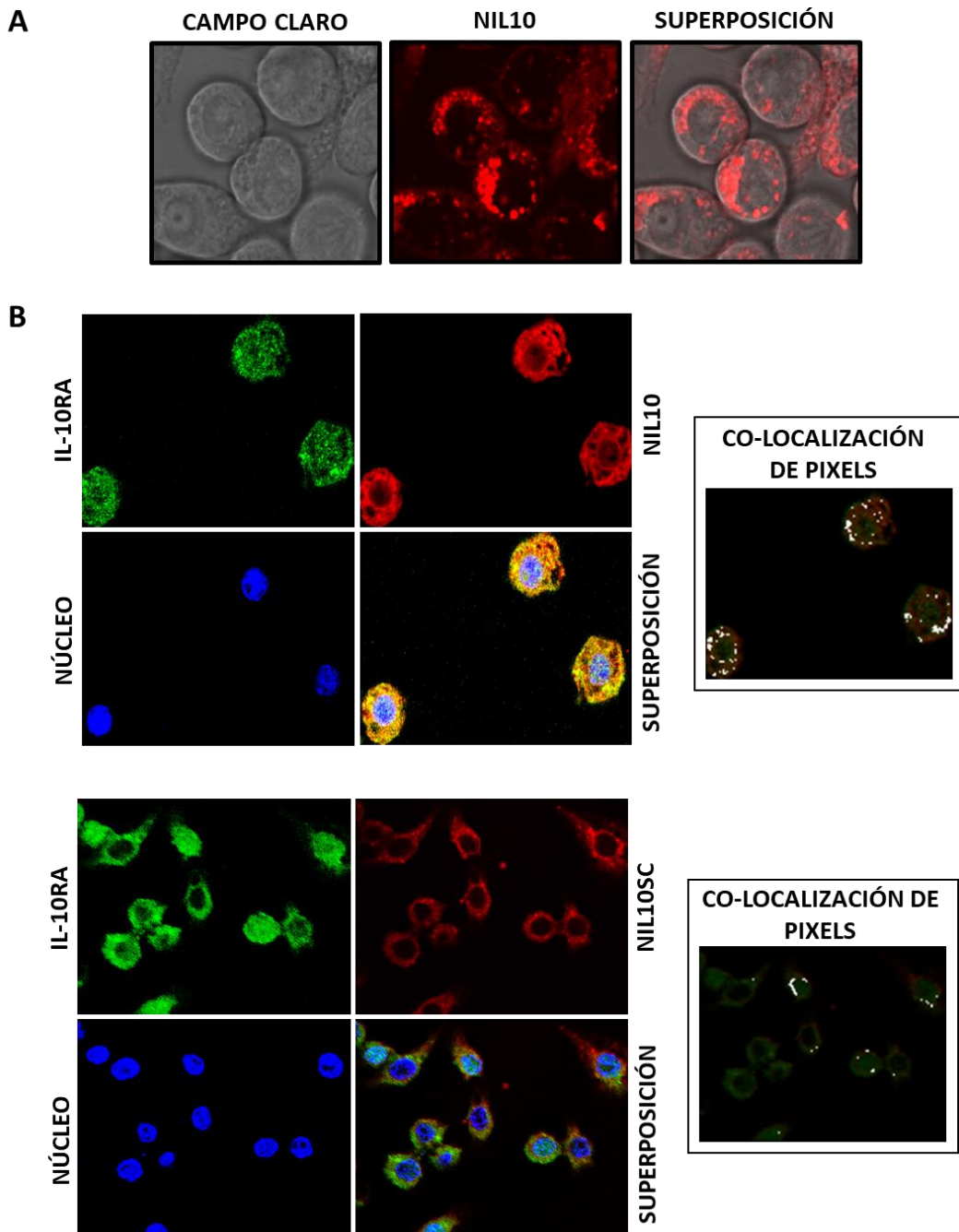


Figura 19. Especificidad de NIL10 por su diana IL-10RA en células RAW 264.7. *A. Células visualizadas por microscopía confocal de campo claro en las que detectamos rodamina (rojo) tras una incubación de 60 minutos con 10 µg/mL de NIL10. B. Co-localización de NIL10 (rodamina, rojo) con IL-10RA (Alexa Fluor 488, verde) mediante microscopía confocal en células RAW 264.7 incubadas con 10 µg/mL NIL10 y anti-IL-10RA. Visualizamos los núcleos gracias a la contratinción con DAPI (azul). El panel de superposición refleja la co-localización de ambas señales en amarillo. Al lado de cada panel se indica el análisis realizado mediante el software ImageJ. Los puntos blancos corresponden a la co-localización de pixels.*

Todas las imágenes fueron tomadas a un aumento de 20x (n = 3).

3. Viabilidad, citotoxicidad y biodistribución de NIL10 en animales de experimentación

Con el fin de determinar la dosis máxima con menor mortalidad, inyectamos las NPs en concentraciones crecientes de 0'01, 0'1, 1 y 10 mg/kg en ratones sanos, y consiguientemente evaluamos la supervivencia de los animales a 30 días. La fracción de animales vivos sin síntomas de toxicidad fue del 100% para los tratados con 0,01 y 0,1 mg/kg, del 80% para los tratados con 1 mg/kg de NIL10, mientras que para la mayor dosis (10mg/kg) la fracción de animales que terminó el periodo de experimentación marcado para evaluar la toxicidad del compuesto fue tan solo del 25%, como se observa en las curvas de supervivencia Kaplan Meier (Fig 20A). La dosis máxima con menor mortalidad fue 1 mg/kg y, por lo tanto, la que decidimos utilizar en la especie de ratón.

Para estudiar la biodistribución de las NPs, procedimos a administrar la dosis de 1 mg/kg de NIL10 o NIL10SC en animales sanos, mostrando en el caso del tratamiento con NIL10 que su depósito se restringía a aquellos tejidos en los que su unión con IL-10R había sido efectiva, coincidiendo con regiones con gran cantidad de células inmunes, en cuya membrana se expresa IL-10R, como es el caso del corazón en mayor medida, el riñón y el pulmón, seguido del hígado, el bazo y en menor proporción, el páncreas (Fig 20B). Por el contrario, la señal emitida por la rodamina presente en la nanopartícula NIL10SC estaba significativamente disminuida en los tejidos analizados en comparación con los mismos tejidos, de animales tratados con NIL10.

De este modo, inyectamos las NPs –NIL10 o NIL10SC– a una dosis de 1 mg/kg, dosis equivalente a la previamente testada en ratón, en cerdos sanos con el fin de evaluar la distribución de ambos compuestos 7 días tras su administración. Los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos en ratones, siendo el corazón, el riñón, el pulmón y el hígado los órganos donde se encontraron depósitos de NIL10 (Fig 21), mientras que los mismos tejidos estudiados en animales inyectados con NIL10SC no manifestaron presencia de la nanopartícula tras el fin del experimento. El péptido conjugado en NIL10SC es incapaz de unirse a IL-10R de manera específica, razón por la cual no fue posible detectarla en los órganos analizados de ambas especies (Fig 20B-21).

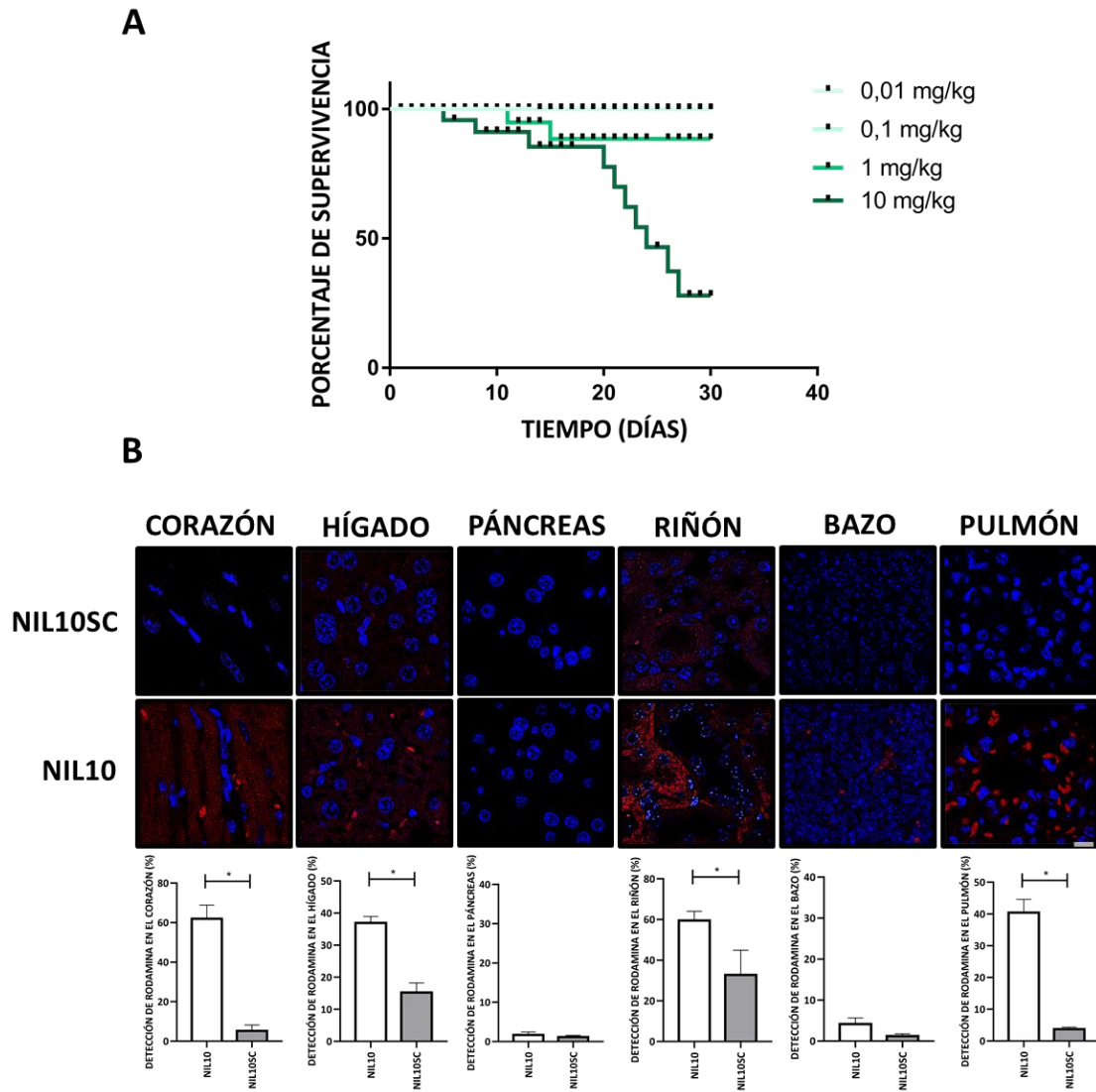


Figura 20. Dosis efectiva y biodistribución de las nanopartículas en ratón. A. La gráfica de supervivencia de Kaplan Meier muestra el porcentaje de supervivencia en ratones sanos tratados con distintas dosis de NIL10 ($n = 6$ /condición). **B.** Detección de NIL10 y NIL10SC (rodamina, rojo) a la dosis efectiva por microscopía confocal en secciones de corazón, hígado, páncreas, riñón, bazo y pulmón a un aumento de 20x. La barra de escala representa 50 μm . En la parte inferior se muestra la cuantificación de la señal de rodamina en cada tejido (media \pm SD. $*p < 0.05$ NIL10 vs NIL10SC, $n = 6$ /grupo).

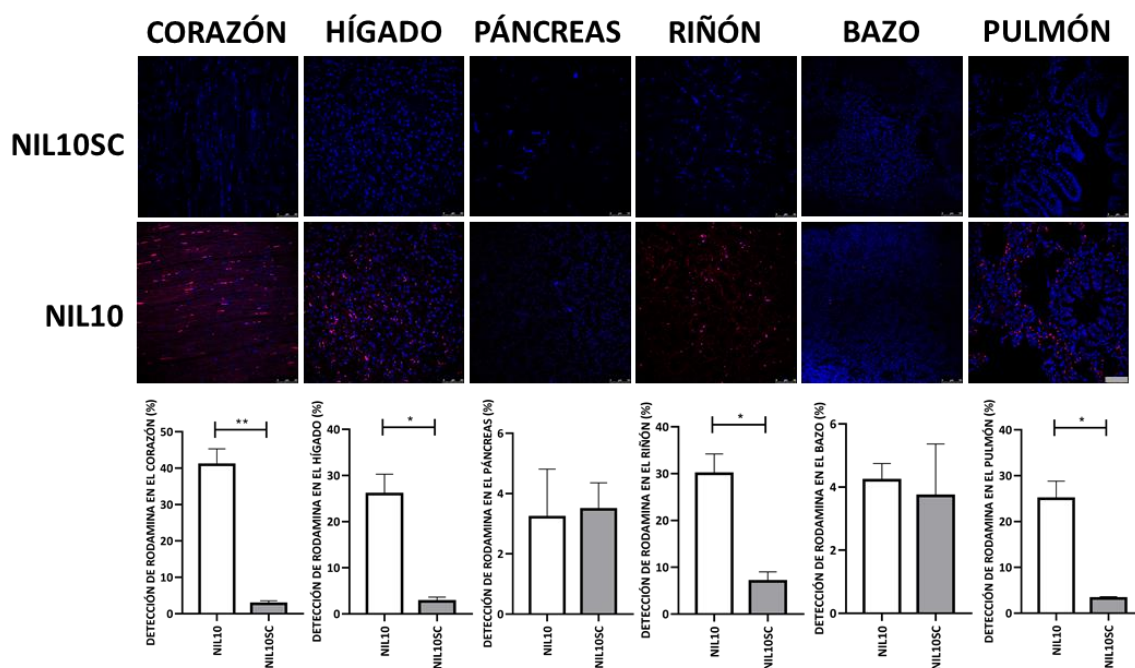


Figura 21. Biodistribución de las nanopartículas NIL10 y NIL10SC en cerdo. Detección de NIL10 y NIL10SC (rodamina, rojo) a la dosis efectiva por microscopía confocal en secciones de corazón, hígado, páncreas, riñón, bazo y pulmón a un aumento de 20x. La barra de escala representa 50 μm . En la parte inferior se muestra la cuantificación de la señal de rodamina en cada tejido (media \pm SD. * $p < 0.05$ NIL10 vs NIL10SC, $n = 3/\text{grupo}$).

4. NIL10 presenta un efecto cardioprotector en animales sometidos a I/R miocárdica

Siguiendo el diseño experimental ilustrado y descrito al principio de la sección de resultados (Fig 17) establecimos un periodo de 24 horas para iniciar el tratamiento con NIL10 tras el procedimiento quirúrgico de I/R con el fin de actuar antes del pico máximo de la fase inflamatoria. Así, analizamos distintos parámetros cardiacos mediante ecocardiografía en modo bidimensional y monodimensional para evaluar la función miocárdica antes (PRE), inmediatamente después del procedimiento de I/R (D0), 24 horas (D1), 72 horas (D3) y 7 días (D7) tras la inducción de la isquemia coronaria en ratones de genotipo salvaje, en los deficientes para el gen *IL-10* y en los deficientes para el receptor de *IL-10*, el gen *IL-10R*.

El tratamiento con 1 mg/kg de NIL10 resultó mejorar significativamente la FEVI en ratones de genotipo salvaje tanto a los 3 y 7 días posteriores al procedimiento de I/R, en comparación con los animales tratados con NIL10SC. En el caso de los animales tratados con NIL10, se alcanzaron unos valores de FEVI casi igualados a los que obtuvimos al inicio del estudio, en condiciones fisiológicas (Fig 22A). De la misma forma, realizando el mismo experimento en animales deficientes para el gen *IL-10*, ratones con mayor propensión a una situación inflamatoria

sistémica¹²⁸, también observamos un grado significativo de cardioprotección atendiendo a la conservación de los valores de FEVI por encima del 50% (Fig 22B). En este caso, los animales tratados con NIL10 llegaron incluso a superar los valores de FEVI alcanzados al inicio del estudio, mientras que los animales tratados con NIL10SC lograron pobremente valores cercanos al 50%, al cabo de los 7 días posteriores al procedimiento de I/R. Por el contrario, el tratamiento con NIL10 no reportó ninguna mejora de la función cardíaca en ratones deficientes para el gen *IL-10R*, que mantuvieron unos valores de FEVI deprimida de manera leve hasta el final del experimento (Fig 22C). Este resultado dota de especificidad al tratamiento con NIL10, ya que demuestra que esta nanopartícula ejerce su efecto a través de la activación de IL-10R tras la formación del complejo ligando-receptor NIL10/IL-10R, concretamente. En animales deficientes para el gen *IL-10R* el elemento clave en el mecanismo de acción de NIL10 está ausente, limitando su efecto a valores semejantes a los obtenidos en animales tratados con NIL10SC.

En vista de los anteriores resultados, y como estrategia previa a su utilización en humanos, decidimos utilizar un modelo porcino de I/R miocárdica mediante angioplastia con inflado de balón intracoronario, para comprobar la eficiencia de NIL10 en esta especie animal. En este caso, el tratamiento con 1 mg/kg de NIL10 administrado 24 horas después del procedimiento de isquemia coronaria (Fig 17), resultó en la mejora de la funcionalidad cardíaca visible en la recuperación de la FEVI 7 días después del procedimiento, frente a los cerdos tratados con NIL10SC (Fig 22D).

Gracias al estudio de I/R porcina, y más allá de los resultados obtenidos en ratón, dotamos a la experimentación de una gran especificidad tanto por el mantenimiento del efecto de manera interespecífica, como por obtener un resultado positivo en una especie con una arquitectura coronaria y de circulación colateral, si no igual, muy semejante a la humana, reproduciendo en este modelo, además, el resultado tras la oclusión intracoronaria tal y como sucede en los pacientes.

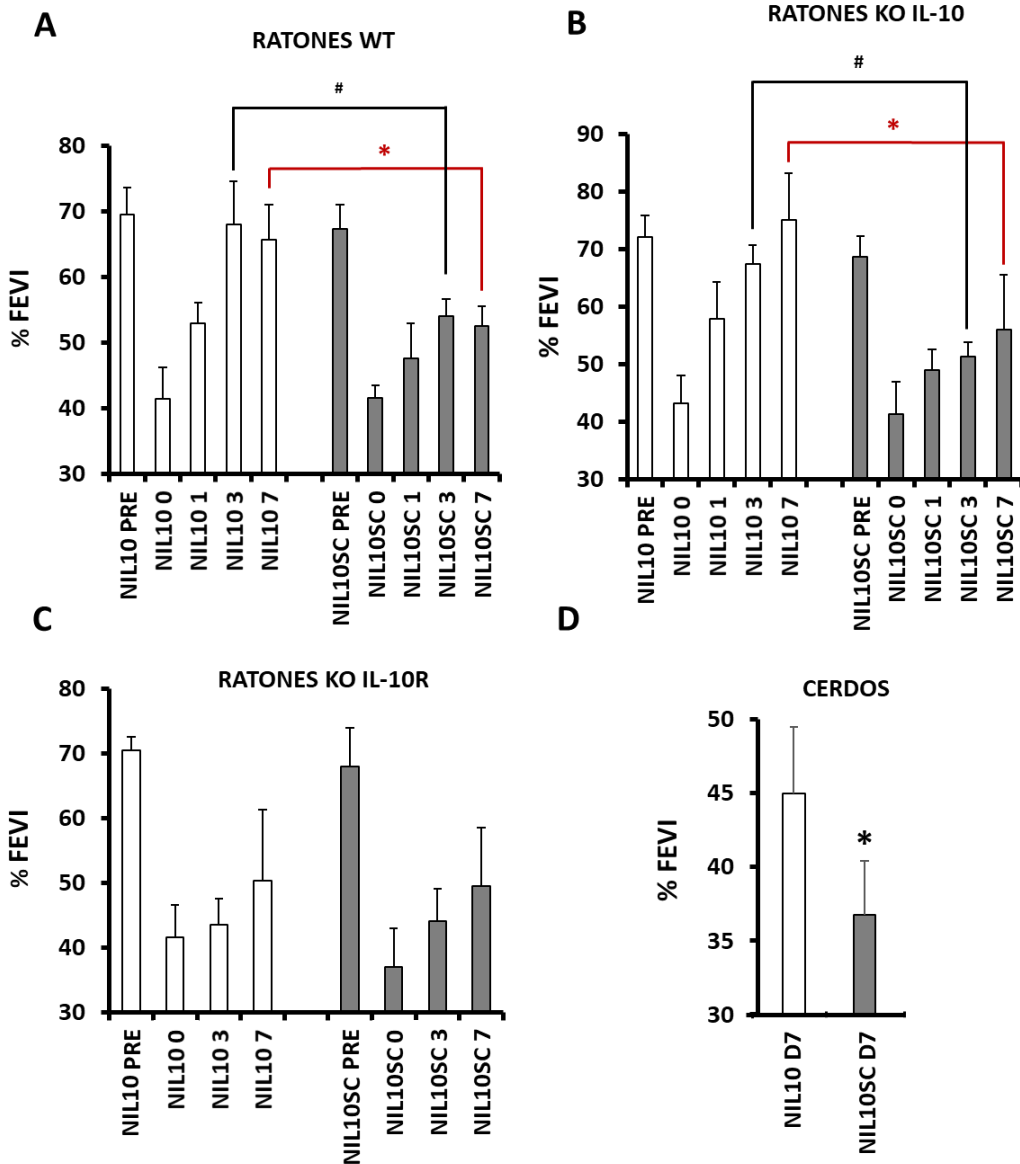


Figura 22. El tratamiento con NIL10 induce cardioprotección en modelos animales de I/R tras 7 días de reperfusión. A. Valores de FEVI expresados en porcentaje a distintos tiempos, en animales de genotipo salvaje tratados con NIL10 o NIL10SC. Resultados expresados como la media \pm SD. * $p < 0.03$ NIL10 vs NIL10SC día 7. # $p < 0.05$ NIL10 vs NIL10SC día 3 ($n = 10$ /grupo). **B.** Los mismos valores evaluados en animales deficientes para el gen IL-10. Los resultados se expresan como la media \pm SD. * $p < 0.01$ NIL10 vs NIL10SC día 7. # $p < 0.05$ NIL10 vs NIL10SC día 3 ($n = 10$ /grupo) **C.** Los mismos valores evaluados en animales deficientes para el gen IL-10R. Resultados expresados como la media \pm SD ($n = 10$ /grupo). **D.** Valores de FEVI expresados en porcentaje tras 7 días de reperfusión post-isquemia miocárdica en cerdos tratados con NIL10 y NIL10SC (Media \pm SD. * $p < 0.001$ NIL10 vs NIL10SC). $n = 10$ /grupo.

De manera adicional, el grupo de ratones de genotipo salvaje fue estudiado mediante RM en ausencia de contraste tras la inyección de las NPs NIL10 o NIL10SC (D0), y después de 24 horas de reperfusión (D3). El realce de gadolinio en la RM nos permitió identificar las regiones lesionadas del miocardio, por las que la nanopartícula NIL10 tenía afinidad, a diferencia de NIL10SC. Recordando que la única fuente de contraste es el gadolinio conjugado en la nanopartícula estudiada, en este caso, las imágenes potenciadas en T1 muestran cómo se producía una hipercaptación de contraste brillante en la región infartada de los animales tratados con 1 mg/kg de NIL10, de manera específica. Este abordaje nos permitió determinar una vez más la especificidad de la nanopartícula NIL10 y la demostración de que su efecto es ejercido en las regiones dañadas del corazón (Fig 23), aportando además una aplicación diagnóstica a este compuesto, al poder visualizar la progresión de la inflamación a lo largo del tiempo posterior al procedimiento quirúrgico.

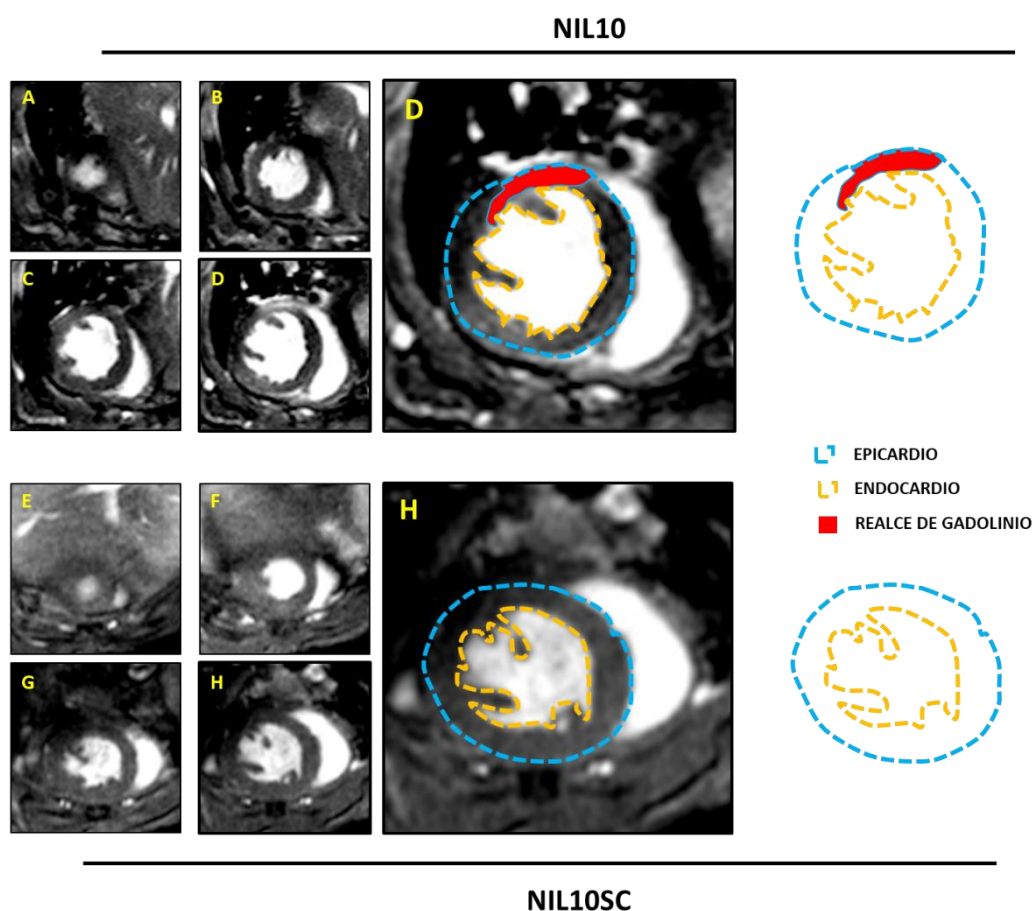


Figura 23. NIL10 se une de manera específica a la zona lesionada del corazón tras un IAM. Secuencias de realce de gadolinio adquiridas con potenciación de T1 en corazones de ratones sometidos al procedimiento de I/R y tratados con 1 mg/kg de NIL10 (A-D) o NIL10SC (E-H), después de 24 horas de reperfusión (n = 4/condición).

5. NIL10 previene la inflamación y la necrosis del tejido cardiaco tras la I/R

Para estudiar la contribución de NIL10 a la mejora de la función cardiaca post-IAM, realizamos un análisis histológico de los corazones de ratones de genotipo salvaje sometidos a I/R después de 3 y 7 días de reperfusión. Para ello, trabajamos con secciones transversales del miocardio a nivel ventricular donde nos fue posible localizar el área dañada o área de infarto. La estructura del miocardio, así como la presencia de focos de inflamación, la pudimos desvelar en secciones de 5 μm en el eje corto cardiaco desde el ápex hacia la base del corazón. Las preparaciones teñidas con HE mostraron que el tratamiento con NIL10 reducía significativamente el área infartada y el número de focos de inflamación tanto a los 3 días como a los 7 posteriores a la isquemia miocárdica, en comparación con el tratamiento control (NIL10SC) (Fig 24). Los corazones de los animales inyectados con NIL10SC, con una lesión producida con una antigüedad de 3 días, se caracterizaron por la presencia de varios focos de infiltración leucocitarios densos en la zona infartada, región que abarcaba no solo la zona superficial, sino que comprometía también la pared interna del VI. La tinción con HE nos permitió también visualizar el desplazamiento casi por completo de los miocitos necrosados, resultado de su fagocitosis anterior, mientras que en los animales tratados con NIL10, se consiguió contener la inflamación y reducir la zona infartada, observando un infiltrado leucocitario más escaso y el mantenimiento casi total de la estructura miocárdica. Estos resultados nos indicaron que la progresión de la respuesta inflamatoria se encontraba en una fase inmediatamente anterior con respecto a la alcanzada en el tejido infartado de los animales control (NIL10SC), gracias al tratamiento con NIL10 (Fig 24A). A los 7 días de la lesión isquémica, fue posible identificar la extensión de los múltiples focos de inflamación localizados en gran parte del VI de los animales tratados con NIL10SC, resultado de la progresión de la respuesta inflamatoria. Así, pudimos detectar la destrucción del tejido compuesto por miocitos necrosados y la reposición de tejido conjuntivo en su lugar. Por el contrario, la evolución del tejido en los animales tratados con NIL10 condujo al inicio de la reparación ya a los 7 días de infarto. En estas muestras encontramos hematíes, marcando el inicio de los procesos de angiogénesis, conjuntamente con la aparición de tejido de granulación donde, además, esta zona de infarto se restringió solo a la cara externa del VI (Fig 24B).

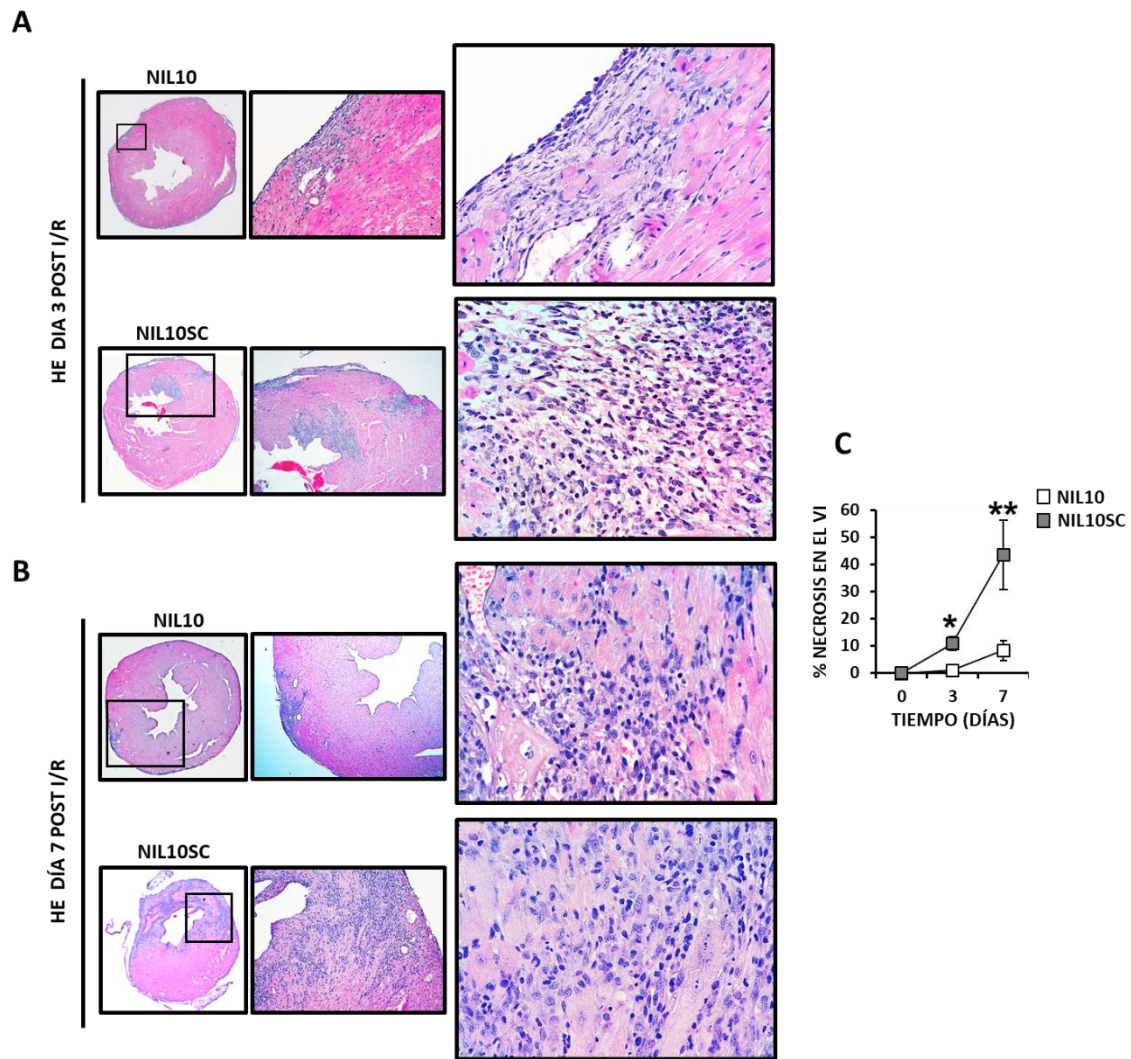


Figura 24. NIL10 reduce la inflamación en el corazón de ratones sometidos a I/R. A. Tinción con HE en secciones de corazones de ratones tratados con 1 mg/kg de NIL10 o NIL10SC después de 3 y **B.** 7 días de reperusión. Magnificación de 2x, 10x y 20x de izquierda a derecha. **C.** La gráfica muestra el área necrótica del VI de los animales sometidos a ambos tratamientos tras 7 días de reperusión post-infarto, expresada en porcentaje (media \pm SD. $p < 0.001$ NIL10 vs NIL10SC, $n = 6$ /grupo).

De manera adicional, con el objetivo de determinar el grado de fibrosis generada tras el infarto, realizamos la tinción TM en las mismas secciones, detectando así la presencia de colágeno (azul), los núcleos celulares (marrón) y el tejido muscular (rojo). Las lesiones fibróticas se encontraron significativamente extendidas en las regiones infartadas de los animales tratados con NIL10SC sometidos a I/R tras 3 días de reperusión siendo aún más evidente el efecto 7 días posteriores, a diferencia del tratamiento con NIL10, donde los animales no desarrollaron tal extensión del tejido fibrótico, siendo menos abundante en ambos tiempos estudiados (Fig 25).

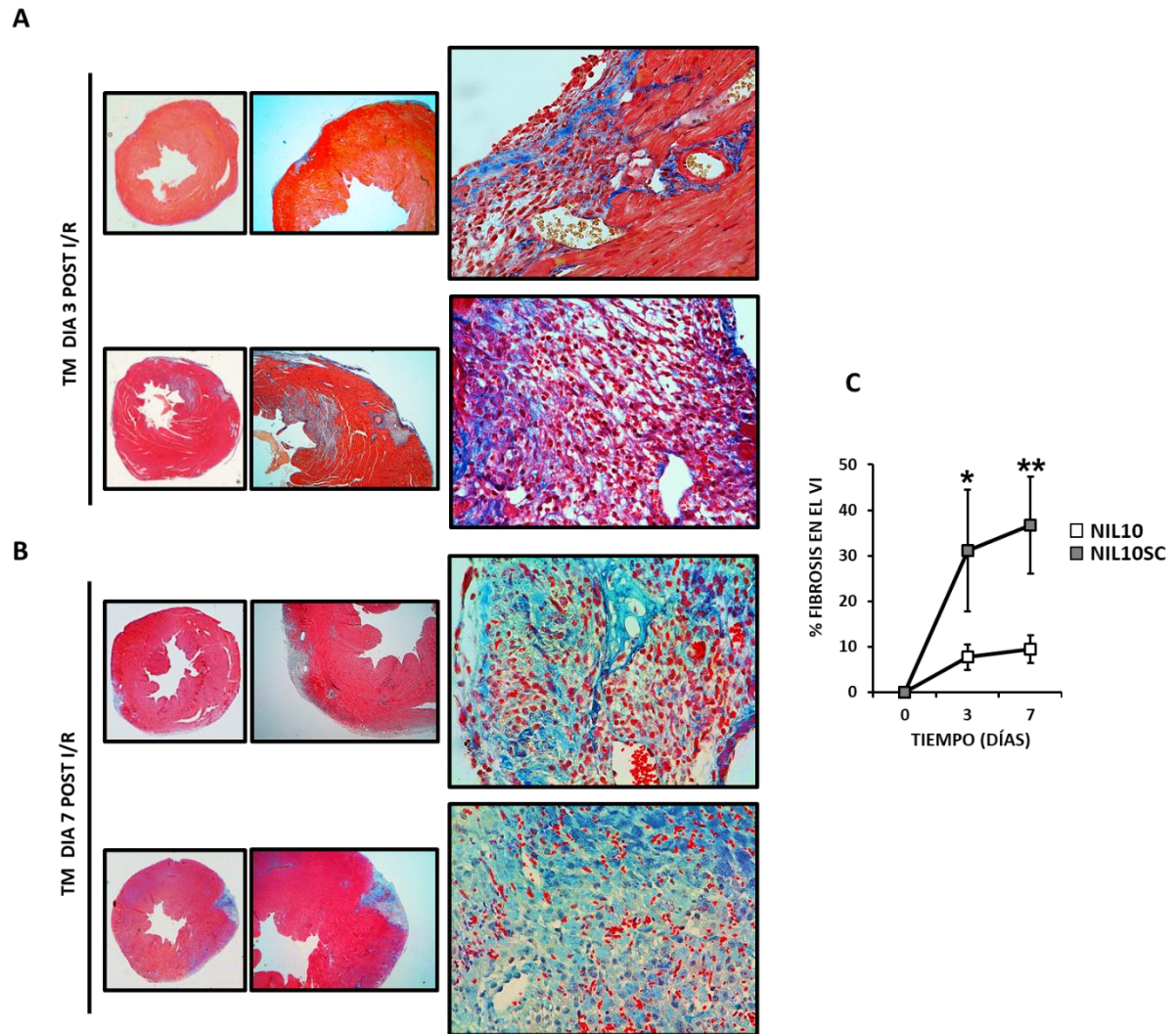


Figura 25. NIL10 reduce el tejido fibrótico en el corazón de ratones sometidos a I/R. A. Tinción TM en secciones de corazón de ratón tratados con 1 mg/kg de NIL10 o NIL10SC después de 3 y **B.** 7 días de reperfusión. Magnificación 2x, 10x y 20x de izquierda a derecha. **C.** La gráfica muestra la fibrosis del VI de los animales sometidos a ambos tratamientos tras 7 días de reperfusión post-infarto, expresado en porcentaje (media \pm SD. $p < 0.001$ NIL10 vs NIL10SC, $n = 6$ /grupo).

Por otra parte, visualizamos el grado de expresión de la metaloproteínasa de matriz extracelular 9 (MMP-9) cuya actividad se ve elevada en los procesos de necrosis miocárdica, utilizándose de esta forma como marcador necrótico⁵⁰, con el fin de evaluar la extensión del tejido afectado después de 7 días de reperfusión. Los resultados mostraron una reducción notable de la expresión de MMP-9 en los animales tratados con NIL10, a diferencia de los tratados con NIL10SC (Fig 26A). En esta ocasión realizamos, además, un análisis cuantitativo de MMP-9 mediante inmunoblot mostrando el descenso de su expresión en el área necrosada, al contrario de lo que ocurría en las áreas sanas de los mismos corazones, en respuesta al tratamiento con NIL10 (Fig 26B-D).

Específicamente, la proforma inactiva (92kDa) de MMP-9 se expresaba de manera similar en el tejido sano, tanto en animales tratados con NIL10 como con NIL10SC, siendo en el tejido infartado donde observamos una disminución de la expresión de esta proforma solo en animales tratados con NIL10. Por otra parte, de manera semejante al patrón de expresión de la proforma MMP-9, la expresión de la forma activa (78kDa) de esta proteína se veía a su vez disminuida en el tejido infartado de animales tratados con NIL10, mientras que, en los tratados con NIL10SC, esta se mantiene o desciende ligeramente. Nuestros datos pueden sugerir que pro-MMP-9 se secreta menos y además no se activa en el tejido necrótico de los animales que son tratados con NIL10.

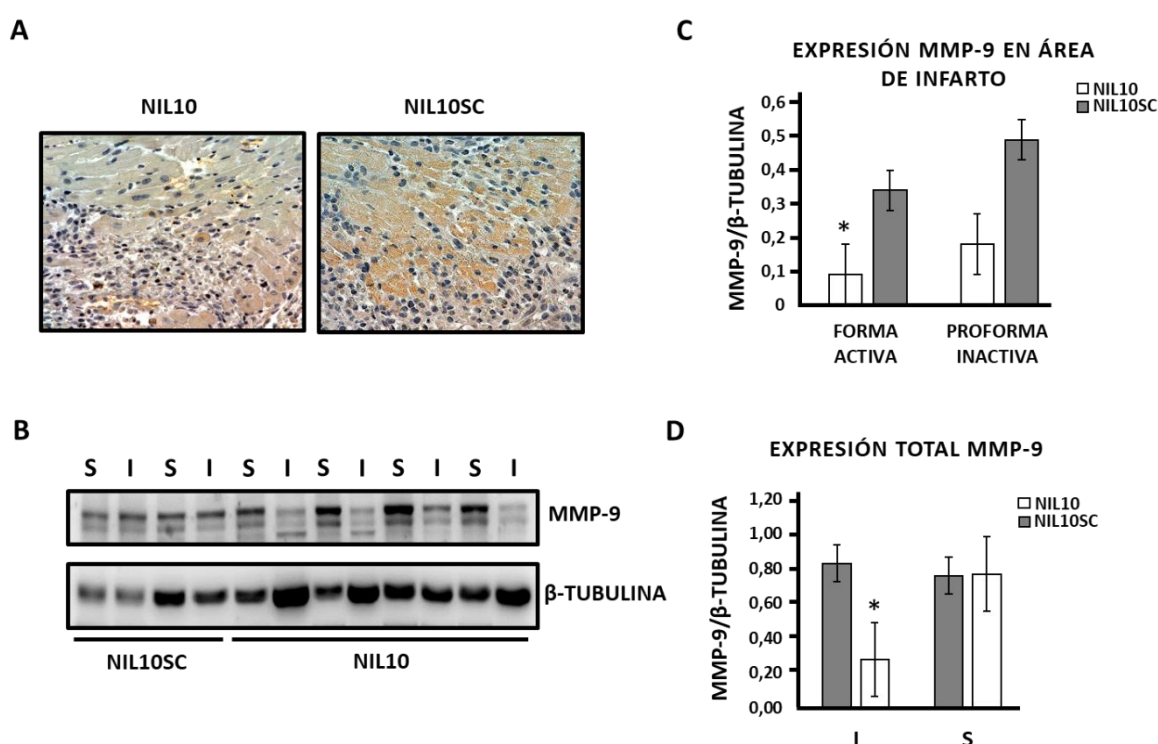


Figura 26. NIL10 reduce la expresión de MMP-9 en el corazón de ratones sometidos al procedimiento de I/R tras 7 días de reperfusión. A. Tinción inmunohistoquímica de MMP-9 en secciones de la zona de infarto del corazón de ratones sometidos al procedimiento de I/R tras 7 días de reperfusión, tratados con 1 mg/kg de NIL10 o NIL10SC. **B.** Detección mediante western blot de MMP-9 en las regiones sanas (S) y de infarto (I) en los mismos grupos de animales. (n = 3/grupo). **C.** Expresión de las dos formas de MMP-9 en la región de infarto de los mismos animales. **D.** Expresión total de MMP-9 en las regiones (S) e (I) de los mismos animales. Para calcular el porcentaje de MMP-9 en tejido necrótico en relación con el sano hemos usado los valores de expresión de la forma activa de MMP-9. Valores expresados en promedio \pm SD. * $p < 0.001$ NIL10 vs NIL10SC (n = 3/grupo). (Media \pm SD. * $p < 0.05$ NIL10 vs NIL10SC, n = 3/grupo).

El estudio histopatológico en el modelo porcino (Fig 27), nos permitió además realizar un análisis más exhaustivo y preciso del tejido afectado tras la I/R miocárdica. En este modelo pudimos cuantificar de manera precisa la extensión del área infartada en comparación con las áreas sanas y de riesgo del corazón, gracias a una doble tinción Evans blue/TTC. El TTC es un sustrato de la enzima Lactato-deshidrogenasa utilizado como marcador de la respiración celular. En los tejidos metabólicamente activos (vivos), se reducirá a 1,3,5-trifenilformazán, aportando un color rojizo que, en el caso de tejidos necrosados (no metabólicamente activos), no cambiará de color, manteniéndose pálidos. El reactivo Evans blue, por otra parte, se une fuertemente a la albúmina plasmática, lo que permite detectar el miocardio viable o sano. De esta forma, la combinación de las dos tinciones en la misma sección del miocárdico nos permitirá discriminar entre tejido necrosado del aún viable (de riesgo), que se encontraba bajo el punto de oclusión de la arteria coronaria. El mecanismo para llevar a cabo la tinción en las secciones de corazón se realiza mediante un doble cateterismo el día del sacrificio del animal, según se detalla en la sección de métodos, apartado 5.4 del presente trabajo. Las imágenes que obtuvimos de las secciones de corazones teñidos con Evans blue/TTC, y la distinción de 3 áreas de estudio (Fig 27A) demostraron que la manifestada mejora de la función cardiaca por el tratamiento con NIL10 se debe a una significativa reducción de la zona de infarto respecto al área de riesgo (Fig 27B).

De forma análoga, procedimos a realizar un análisis histológico de los corazones de los cerdos sometidos al procedimiento de I/R miocárdica, tras 7 días de reperusión. Tal y como sucedía en ratones, las tinciones con HE revelaron un descenso significativo del número de focos de inflamación a la vez que tenía lugar una reducción del tamaño de los mismos gracias al tratamiento con NIL10, en comparación con los tratados con NIL10SC (Fig 28A). De la misma forma, la tinción TM nos informó del aumento en el depósito de colágeno en el tejido infartado de los animales tratados con NIL10SC, comparado con los tratados con NIL10, donde no encontramos tal cantidad de tejido fibrótico (azul) (Fig 28B). En la misma línea, al igual que sucedía en el modelo de ratón, el marcador de necrosis MMP-9, mostró una notable reducción en cuanto a su expresión en los animales tratados con NIL10 (Fig 28C).

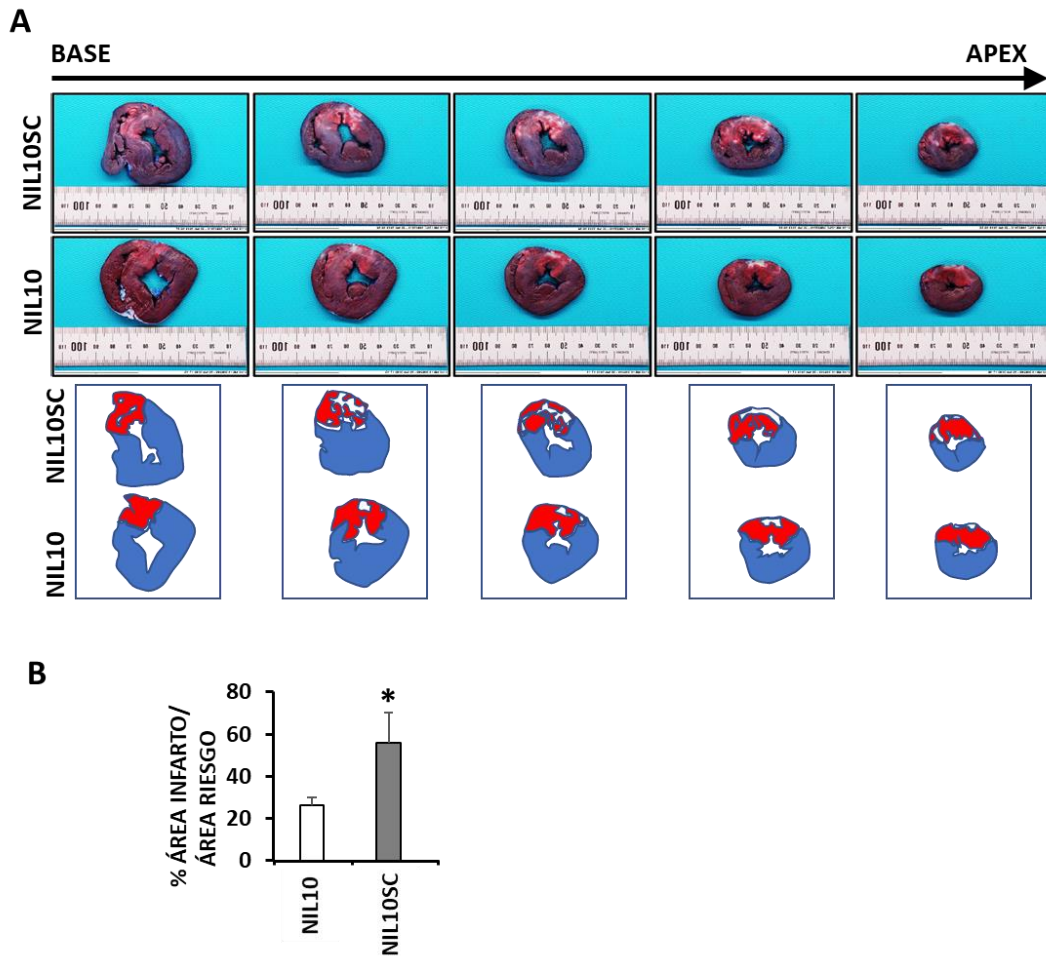


Figura 27. NIL10 induce cardioprotección en cerdos sometidos a I/R. A. Doble tinción Evans Blue/TTC en secciones de corazones de cerdo tras 7 días de reperfusión, tratados con 1 mg/kg de NIL10 o NIL10SC en los que se observa el tejido sano (azul), el área de riesgo (rojo) y el área infartada o necrótica (blanco). Las secciones transversales se muestran de la base al ápex del miocardio. **B.** Medición del área necrótica relativa al área de riesgo representada como porcentaje (Media \pm SD. * $p < 0.001$ NIL10 vs NIL10SC ($n = 4$ /grupo)).

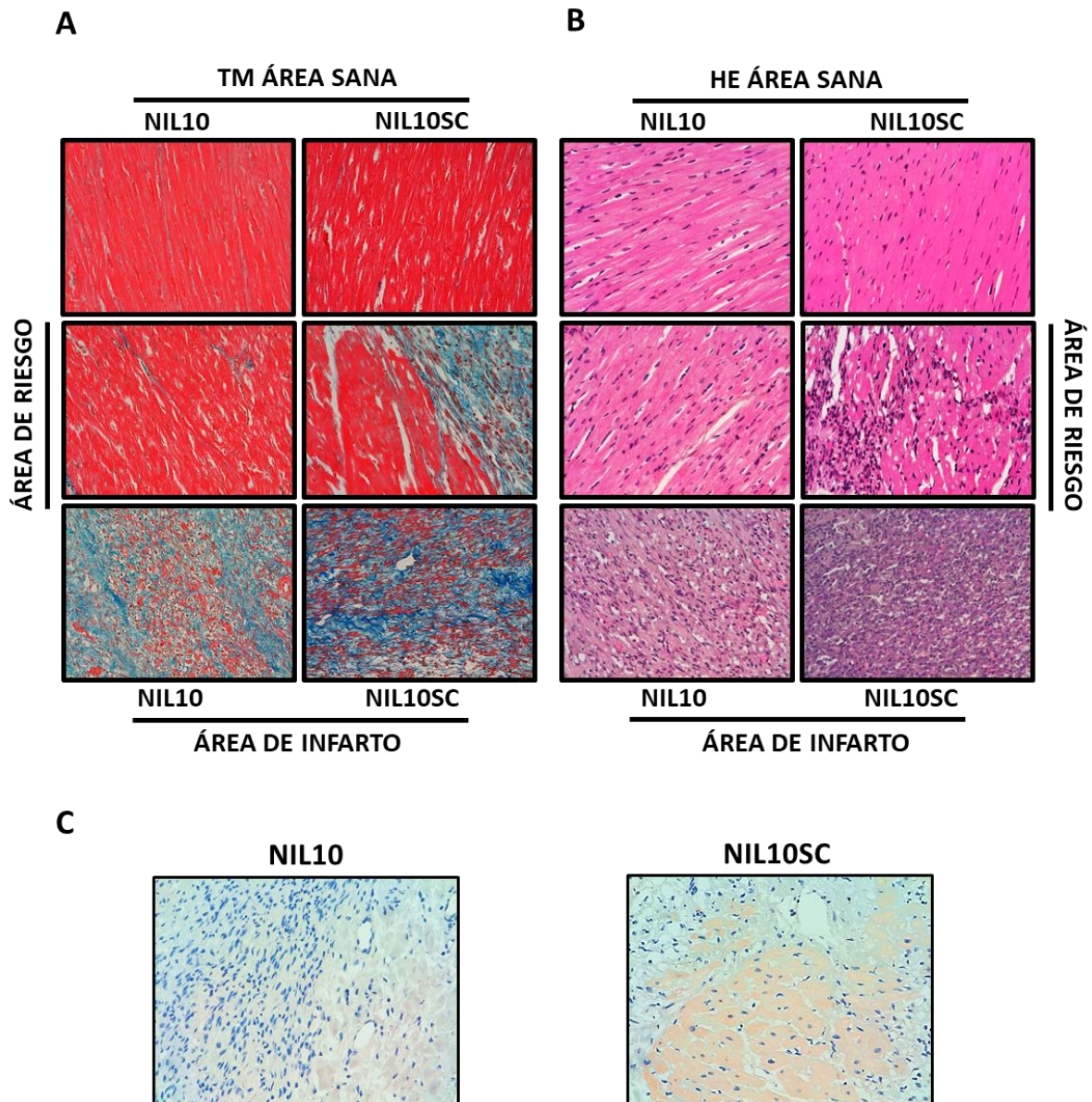


Figura 28. *NIL10 reduce la inflamación y fibrosis en el corazón de cerdos sometidos al procedimiento de I/R tras 7 días de reperfusión. A.* Tinción TM en secciones de las 3 regiones del corazón (sana, de riesgo e infarto) en animales tratados con 1 mg/kg de NIL10 o NIL10SC. *B.* Tinción con HE en las mismas secciones. *D.* Tinción inmunohistoquímica de MMP-9 en la zona de infarto en los mismos animales ($n = 10/\text{grupo}$).

Con todo ello, los resultados obtenidos en ambas especies, nos permiten concluir que el tratamiento con NIL10 reduce de manera específica la necrosis y la fibrosis miocárdica gracias a una reducción significativa en el número y en la extensión de focos de inflamación en los corazones infartados, tanto 3 como 7 días posteriores al procedimiento isquémico, con la relevancia que ello conlleva en cuanto a la remodelación adversa ventricular, y por ende, sobre la IC posterior que determinará la supervivencia del paciente.

6. NIL10 incide sobre la respuesta inflamatoria de manera sistémica

Para estudiar el efecto de NIL10 en la respuesta inflamatoria, no solo a nivel tisular sino de manera integral, utilizamos paneles de distintas citoquinas implicadas en las diferentes fases de la respuesta inmune. Agrupamos las 40 moléculas analizadas atendiendo a sus capacidades comprobadas en el corazón¹²⁹ en citoquinas pro-inflamatorias, citoquinas anti-inflamatorias y quimioquinas (Fig 29A). Los resultados mostraron diferencias significativas en el patrón de expresión de las moléculas analizadas en los animales tratados con NIL10 y NIL10SC después de 3 días de reperfusión post-IAM. Para explicar su modulación, categorizamos las citoquinas en grupos en base a los diferentes patrones de expresión encontrados.

De las 26 moléculas comunes en ambos paneles (cerdo y ratón, Fig 29B), dos quimioquinas pro-inflamatorias (CXCL1 y CXCL10) y tres citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 α , G-CSF, TNF- α) se encontraban más expresadas en ambos modelos animales de I/R tratados con NIL10SC, en comparación con los tratados con NIL10. Por otra parte, cinco citoquinas anti-inflamatorias (IL-4, IL-13, IL-16 e IL-27) se encontraban sobreexpresadas en los animales tratados con NIL10, tanto en ratones como en cerdos, en comparación con los tratados con NIL10SC, incluyendo la citoquina anti-inflamatoria más ampliamente reconocida, IL-10.

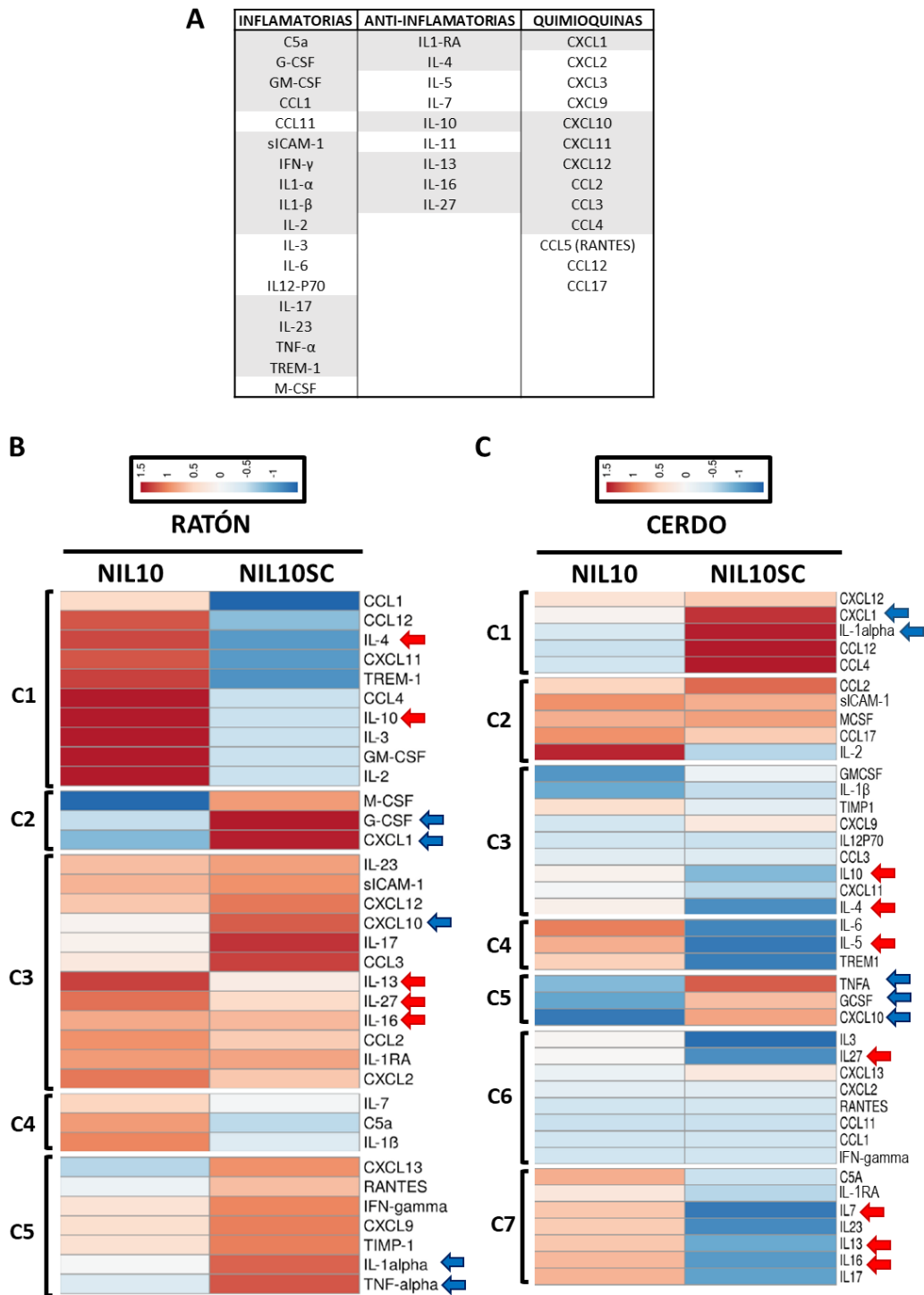


Figura 29. NIL10 induce la expresión de moléculas anti-inflamatorias. A. Panel de citoquinas por grupos utilizadas en este estudio. Las moléculas comunes en ambos paneles se encuentran marcadas en gris. **B.** Heat map representativo de los datos de expresión de las citoquinas agrupados en ratones de genotipo salvaje tratados con NIL10 o NIL10SC tras 3 días de reperusión post-isquemia y **C.** en cerdos con las mismas condiciones ($n = 3/\text{grupo}$). Las flechas azules indican las citoquinas pro-inflamatorias más representativas mientras que las rojas indican las citoquinas anti-inflamatorias.

7. Caracterización del efecto de NIL10 en la respuesta inmune local: la polarización de macrófagos

Para estudiar el efecto que produce NIL10 sobre el fenotipo de los macrófagos cardiacos tras un evento inflamatorio como es el IAM, caracterizamos las diferentes poblaciones macrofágicas en la zona de infarto del corazón de ratones de genotipo salvaje sometidos al procedimiento de I/R miocárdica tras 3 y 7 días. Establecimos la estrategia determinada para identificar dichas poblaciones en las dos fases de la respuesta inflamatoria en dos etapas: primero se limitó el porcentaje de células positivas para el marcador específico de macrófagos CD68 y dentro de este margen analizamos las células positivas para CD206, marcador específico de macrófagos de tipo M2. Solo reconocimos las células doble positivas (CD68⁺/CD206⁺) como macrófagos de tipo M2 (Fig 30B).

Después de 3 días de reperfusión, momento de la respuesta inflamatoria en el que los estímulos pro-inflamatorios se encuentran en su fase máxima, observamos un aumento representativo del número total de macrófagos cardiacos en los ratones tratados tanto con NIL10 como con NIL10SC en comparación con los animales que no atravesaron el mismo procedimiento y que no fueron tratados (control) (16,89% en grupo control frente a 28,59% y 34,33%) (Fig 30A). De estos macrófagos totales, un 30,55% fueron positivos para CD206 en los tratados con NIL10 mientras que en los tratados con NIL10SC los porcentajes de macrófagos positivos para CD206 fueron semejantes a los obtenidos en los animales control (18,24% y 12,66% respectivamente) cuyas diferencias no fueron significativas.

Tras 7 días de reperfusión, procedimos a repetir los mismos análisis, obteniendo en este caso, resultados diferentes. El número total de macrófagos se vio significativamente incrementado tanto en los ratones inyectados con NIL10 como en los tratados con NIL10SC, en comparación con los animales control (25,02% y 28,96% frente a 16,89% en el grupo control), encontrando diferencias significativas entre el grupo de animales sometidos a I/R y tratados con NIL10SC y en los tratados con NIL10 comparados con el grupo control ($p < 0.01$ y $p < 0.001$ respectivamente) (Fig 30A). En este punto, los valores que obtuvimos de la fracción de macrófagos positivos para CD206 fueron semejantes entre los dos grupos de animales sometidos a I/R y tratados con ambas NPs siendo 21,71% NIL10 y 18,38% NIL10SC frente a 12,66% en el grupo control, encontrando diferencias significativas entre los animales control y los tratados con NIL10 ($p < 0.01$).

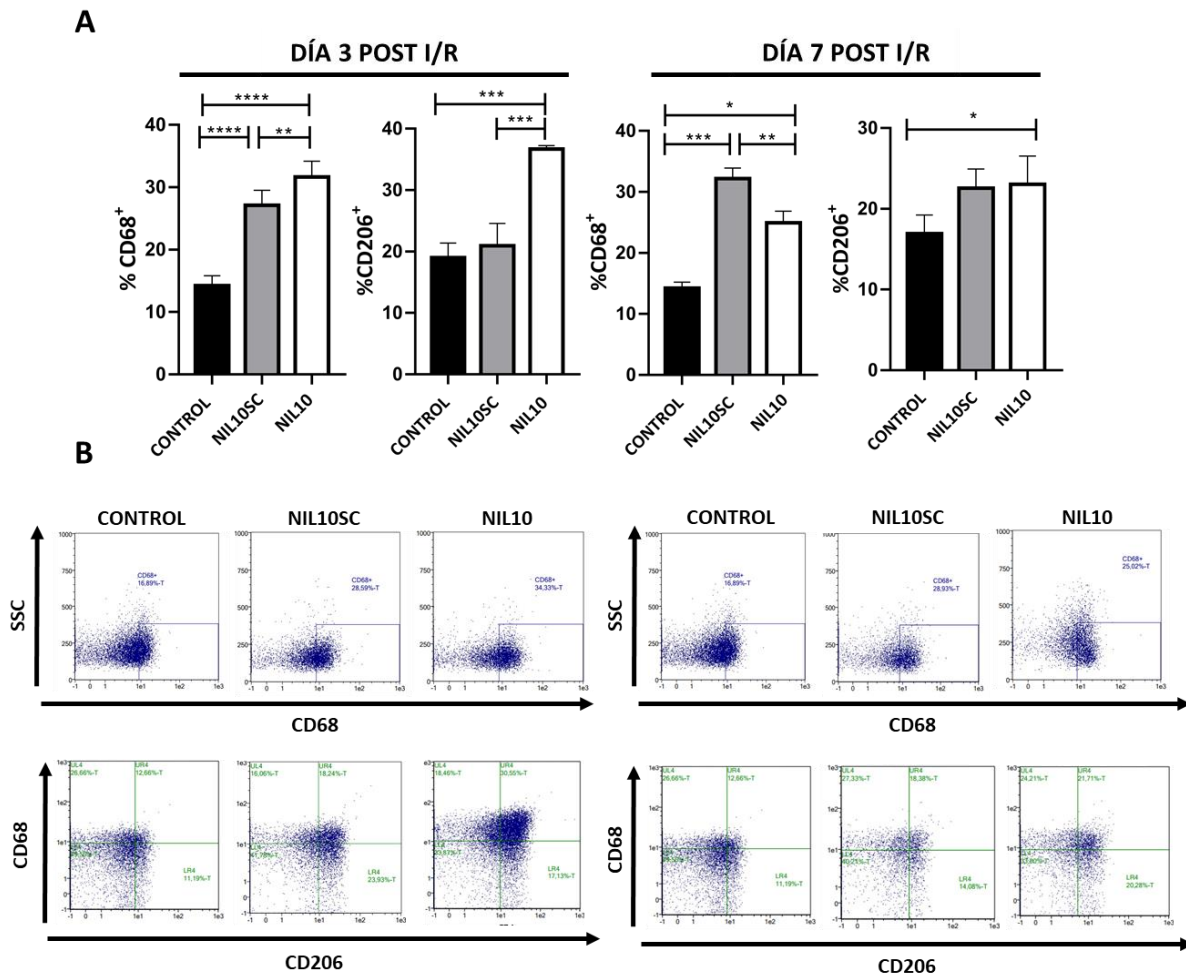


Figura 30. NIL10 induce la polarización de macrófagos cardiacos hacia un fenotipo resolutorio (M2) en estadios tempranos. A. Análisis de las poblaciones de macrófagos en el corazón de ratones tras 3 y 7 días de I/R mediante citometría de flujo. El porcentaje de células positivas para CD68/CD206 se determinó como la población de macrófagos resolutorios o M2, y fueron seleccionadas del total de células del corazón. Resultados expresados como la media \pm SD (** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. **** $p < 0.0001$, $n = 4$ /condición). **B.** Estrategia secuencial de “gating” utilizada inicialmente para identificar macrófagos que expresen el marcador específico CD68, seguida de la identificación de la población positiva para CD206 que solapa con esta anterior (CD68/CD206).

8. Base molecular del efecto cardioprotector de NIL10

El mecanismo de acción propuesto para la modulación de la respuesta inmune por parte de NIL10 ha de residir en el péptido IT9302. Este péptido sirve de enlace de la nanopartícula con la membrana de los macrófagos, uniéndose a IL-10R e induciendo así la polarización de estos a través de la activación de dicha proteína transmembrana, tal y como se comprobó mediante ensayos de inmunoblot en muestras de distintas regiones cardiacas con un infarto de 7 días de antigüedad tanto en el modelo murino como en el porcino (Fig 31). Mientras que la presencia de IL-10RA se mantuvo constante en todas las muestras analizadas (Fig 31A-C), la forma fosforilada de esta proteína (P-IL-10RA) la detectamos mayoritariamente expresada en las muestras de tejido de ratones y cerdos tratados con NIL10, siendo significativamente superior el porcentaje de activación de dicha proteína, en las muestras infartadas de ambas especies.

De manera similar, los niveles del factor de transcripción STAT3, un componente clave en la progresión intracelular de la señalización mediada por IL-10, se encontraron elevados en las regiones infartadas de tejido cardiaco en animales tratados con NIL10, presentando en ambas especies un porcentaje de activación significativamente aumentado con respecto a la misma zona necrosada de animales inyectados con NIL10SC (Fig 31 B-D).

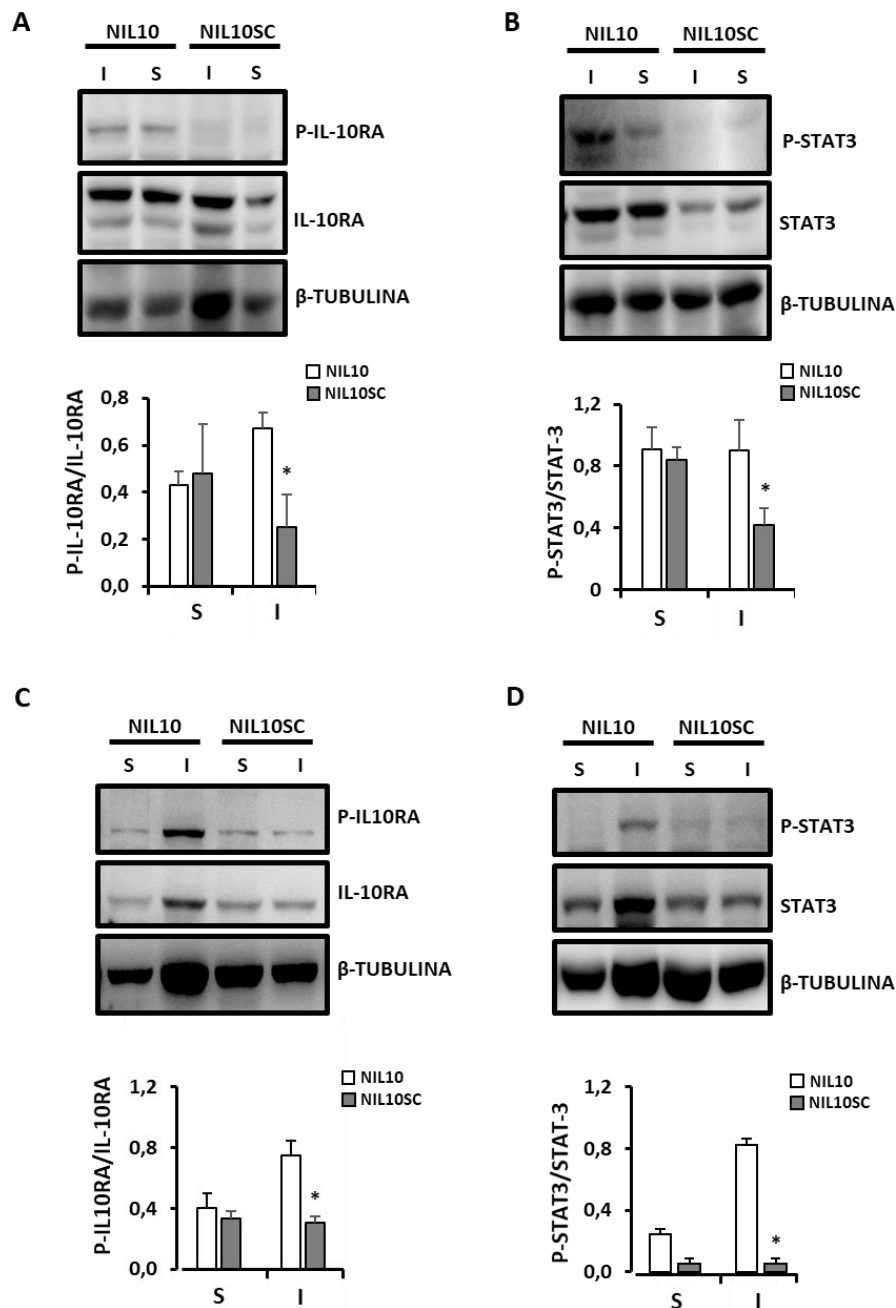


Figura 31. NIL10 induce la activación de la vía IL-10R/STAT3. A. Detección mediante western blot de la expresión de IL-10R y P-IL-10RA total en el tejido sano (S) y necrótico (I) del corazón de ratones sometidos al procedimiento de I/R tras 7 días de reperfusión, tratados con 1 mg/kg de NIL10 o NIL10SC. Los resultados se expresan como la media \pm SD ($p < 0.04$ NIL10 vs NIL10SC área de infarto, $n = 6$ /grupo). **B.** Detección mediante western blot de la expresión de STAT3 y P-STAT3 en las mismas muestras ($p < 0.05$ NIL10 vs NIL10SC área de infarto, $n = 6$ /grupo). **C.** Detección mediante western blot de la expresión de IL-10RA y P-IL-10RA en el tejido sano (S) y necrótico (I) del corazón de cerdos sometidos al procedimiento de I/R tras 7 días de reperfusión, tratados con 1 mg/kg de NIL10 o NIL10SC ($p < 0.05$ NIL10 vs NIL10SC área de infarto, $n = 6$ /grupo). **D.** Detección mediante western blot de la expresión de STAT3 y P-STAT3 en las mismas muestras ($p < 0.005$ NIL10 vs NIL10SC área de infarto, $n = 6$ /grupo).

9. El poder anti-inflamatorio de NIL10 a través de la ruta IL-10R/STAT3

Con el fin último de dar respuesta al mecanismo subyacente de la activación de STAT3 mediada por la unión de NIL10 al receptor de IL-10, utilizamos macrófagos RAW 264.7 para evaluar el fenotipo de estas células frente a un estímulo inflamatorio y en respuesta a la interacción con NIL10. De esta manera, tras incubar las células con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS, principal inductor de la respuesta inflamatoria y activador de macrófagos pro-inflamatorios, pudimos confirmar el éxito de la estimulación de las células al observar, mediante microscopía confocal, la translocación nuclear del factor de transcripción pro-inflamatorio por excelencia NF- κ B (FITC, verde) al núcleo celular (DAPI, azul), a diferencia de lo que ocurría en las células control, donde NF- κ B se encontraba únicamente expresado en el citoplasma celular. La estimulación mediada por LPS se inhibió a través de la co-incubación con NIL10, ya que pudimos visualizar la detención de la translocación nuclear de NF- κ B (Fig 32A), coincidiendo con la inhibición en la fosforilación de I κ B- α (P-I κ B- α), requerida para la liberación del sitio de translocación nuclear de NF- κ B, mecanismo de señalización detectado mediante inmunoblot (Fig 32B). En respuesta a LPS, y en ausencia de NIL10, las células RAW 264.7 expresaban P-I κ B- α , en mayor medida en comparación con las células control.

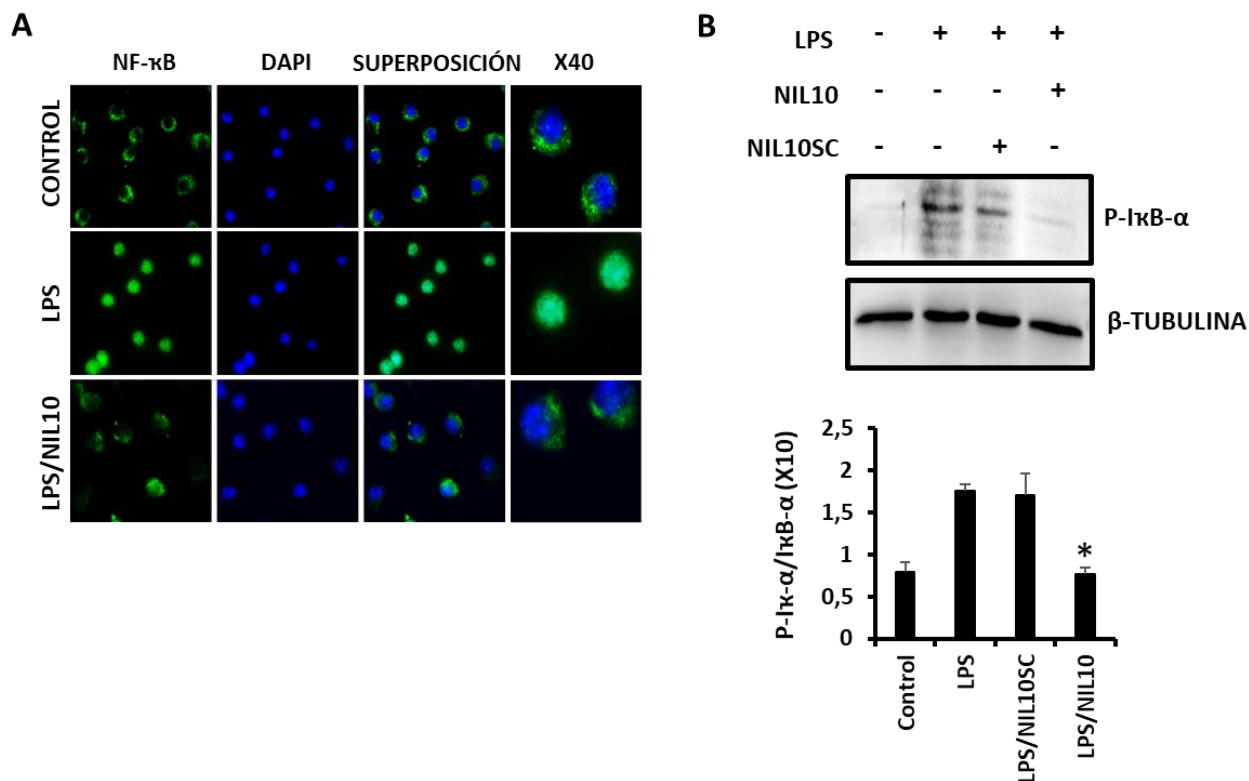


Figura 32. NIL10 impide la translocación al núcleo de NF- κ B en macrófagos RAW 264.7. **A.** Co-localización de NF- κ B (FITC, verde) y el núcleo celular (DAPI, azul) mediante microscopía confocal en células RAW 264.7 control, activadas con 1 μ g/mL de LPS o incubadas con 10 μ g/mL de NIL10 en combinación con LPS. El panel de superposición y la magnificación 40x refleja la translocación nuclear del factor de transcripción. **B.** Detección mediante inmunoblot de P-I κ B- α en extractos proteicos de células control, activadas con 1 μ g/mL de LPS y tratadas con LPS en combinación con 10 μ g/mL de NIL10 o de NIL10SC. Los resultados se expresan como la media \pm SD * p < 0.05 LPS/NIL10 vs LPS/NIL10SC (n = 3/condición).

Para comprobar la participación de STAT3 en la progresión de la señal y la evidente conexión que pudiera existir con NF- κ B, inhibimos la señalización de STAT3 con el inhibidor farmacológico Stattic, que previene la fosforilación de STAT3 y por lo tanto evita su dimerización y consecutiva activación. La incubación con 5 μ M Stattic fue capaz de revertir el efecto de NIL10 en la translocación nuclear de NF- κ B en las células co-incubadas con LPS y NIL10, en donde pudimos comprobar nuevamente la capacidad de LPS de evitar la represión ejercida por NIL10, visualizando el retorno de NF- κ B al núcleo celular (Fig 33A).

Con el objetivo último de confirmar el efecto anti-inflamatorio de NIL10 sobre la inhibición de la translocación de NF- κ B, evaluamos la expresión proteica de uno de los genes reportadores más destacados en macrófagos inflamatorios: el gen que codifica para el enzima iNOS, el cual en respuesta a LPS sufre una activación transcripcional significativa¹³⁰. El tratamiento combinado

LPS/NIL10 resultó en la reducción de la expresión de iNOS hasta valores semejantes a los obtenidos en situaciones control, efecto que se vio suprimido cuando las células fueron tratadas simultáneamente con el inhibidor farmacológico de la activación de STAT3, Stattic, donde NIL10 perdió su capacidad de contención de la expresión de iNOS, lo que supuso que todas las células expuestas a LPS vieran incrementados significativamente los niveles de iNOS con independencia del tratamiento con NIL10 (Fig 33B).

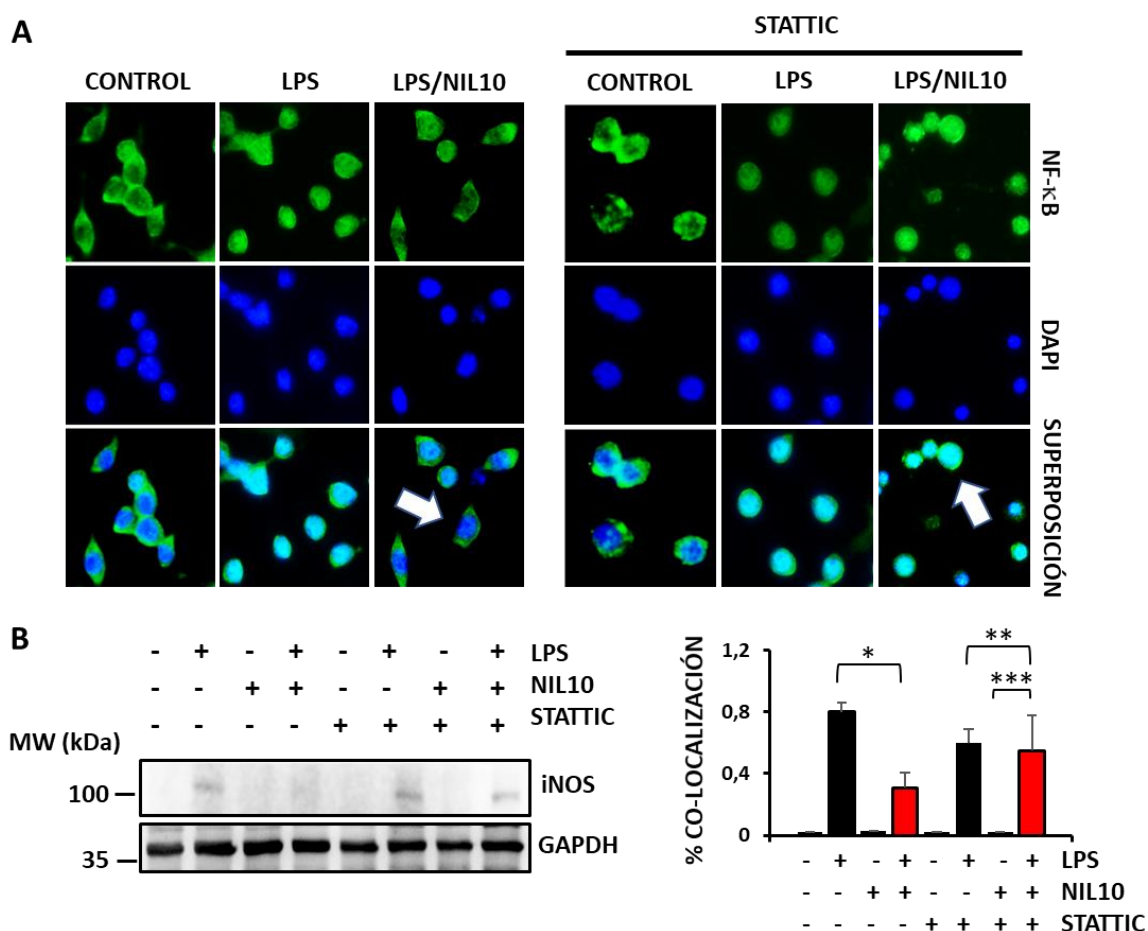


Figura 33. NIL10 impide la translocación al núcleo de NF-κB vía STAT3 en macrófagos RAW 264.7. A. Co-localización de NF-κB (FITC, verde) y el núcleo celular (DAPI, azul) mediante microscopía confocal en células RAW 264.7 control, activadas con 1 μg/mL de LPS o incubadas con 10 μg/mL de NIL10 en combinación con LPS. En estas mismas condiciones, las células se trataron además con el inhibidor de la activación de STAT3, 5 μM Stattic. Las flechas blancas señalan la localización nuclear o citoplasmática de NF-κB. El panel de superposición refleja la co-localización de ambas señales en verde turquesa. Todas las imágenes fueron tomadas a un aumento de 20x. **B.** Detección mediante western blot de iNOS en extractos proteicos de células en las condiciones descritas. Los resultados se expresan como la media ± SD. *p<0.03 LPS vs LPS/NIL10 **p<0.05 LPS/Stattic vs LPS/NIL10SC/Stattic. ***p<0.001 NIL10/Stattic vs LPS/NIL10/Stattic (n = 3/condición).

Discusión

1. Infarto Agudo de Miocardio y terapias anti-inflamatorias

En el presente trabajo se estudiaron los efectos del control de la respuesta inflamatoria en su fase aguda mediante nanopartículas diseñadas por nuestro grupo de investigación, que han demostrado la capacidad de modular directamente la plasticidad de los macrófagos, propiciando la polarización hacia un fenotipo de tipo M2 en dos modelos animales de I/R miocárdica. El desarrollo de la IC, patología caracterizada por la pérdida de capacidad del corazón para aportar un volumen adecuado de sangre¹³¹, tiene un origen multifactorial, aunque el IAM y el shock cardiogénico son los responsables principales de su progreso^{132,133}. Tras la ocurrencia de un IAM, estas alteraciones se generan durante la fase de remodelado cardiaco, un mecanismo fisiopatológico que afecta a la función cardiaca, dando lugar a cambios en el volumen y la forma ventricular, el estrechamiento de la pared cardiaca y la estructura general del corazón. Se trata de una etapa que, además, depende inevitablemente del grado y progreso de la respuesta inflamatoria y la severidad de su actuación. La prolongación de la fase inflamatoria aguda conlleva una remodelación cardiaca anómala en la mayor parte de los casos, que condicionan la vida del paciente de manera permanente en forma de IC e incluso suponiendo el fallecimiento¹³⁴.

Debido a la gravedad y prevalencia del proceso, se han impulsado multitud de estudios que coinciden en la contención de la respuesta inflamatoria como mecanismo determinante para reducir la mortalidad debido al IAM, actuando sobre la etapa previa a ese remodelado cardiaco y evitando así su trastorno^{48,132} hasta el punto de que a lo largo de los últimos 50 años, la ampliación del conocimiento en el papel de la respuesta inmune en la fisiopatología de las ECV ha permitido el desarrollo de múltiples estrategias enfocadas a la inhibición de las respuestas pro-inflamatorias¹³⁵. Los primeros abordajes que se desarrollaron en este sentido fueron las terapias basadas en glucocorticoides que, debido a la presencia de su receptor en todas las células nucleadas, hace de todos los tejidos, diana a este tratamiento.

Algunos estudios apuntan que los glucocorticoides son capaces de reducir el área infartada, en concreto en modelos animales de IAM^{136,137}. Y aunque existen diversos trabajos que reportan efectos protectores, en los que se observa que actúan directamente en los macrófagos, potenciando capacidades reparadoras¹³⁸, en otros se plantearon efectos adversos debido a la interacción de estos compuestos en diferentes cascadas de señalización^{31,132}.

El papel cardioprotector de los anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), a través de la inhibición de las ciclooxigenasas (COX), han sido probados en modelos animales de IAM¹³⁹, reduciendo la necrosis y el remodelado cardiaco anómalo^{140,141}. Sin embargo, existen suficientes evidencias

clínicas que demuestran que este tipo de compuestos incrementan el riesgo a desarrollar ECV o agravar estas enfermedades a largo plazo^{142,143}. Precisamente, el punto débil del uso de ambos tipos de terapias reside en la inespecificidad del tratamiento para atender una patología tan localizada como es el IAM. Las alternativas que ofrecen mejores resultados son, por tanto, las que estén dirigidas a inhibir o activar señales moleculares específicas, como ocurre mediante la inhibición o activación de citoquinas, objetivo principal de la presente tesis doctoral.

Es importante destacar que las propuestas más recientes, en consonancia con nuestra estrategia, consisten en promover la inhibición de la interleuquina-1 (IL-1). Estos abordajes, ya sean mediante inhibidores competitivos o el desarrollo de anticuerpos que bloquean de manera específica las respuestas mediadas por IL-1 β han descrito efectos cardioprotectores, atenuando el remodelado adverso y frenando el desarrollo de IC¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Sin embargo, en estas terapias, existen inconvenientes no desdeñables, incluyendo el elevado coste de producción de dichos anticuerpos, el hecho de ser objeto de controversia de cara a su utilización en pacientes y, en especial, el planteamiento fundamental de que la respuesta pro-inflamatoria inicial es imprescindible para la correcta actuación de las fases posteriores, y en concreto, su contención o limitación sería el mecanismo ideal frente al de su desactivación.

Estudios recientes en plasma de pacientes de SCA han revelado un incremento y expresión descontrolada de citoquinas pro-inflamatorias en conjunto con un descenso de la citoquina anti-inflamatoria IL-10, siendo este desequilibrio el causante de un peor pronóstico¹⁴⁷ y la progresión hacia un remodelado cardiaco anómalo. Este dato pone el foco una vez más en la importancia del equilibrio entre ambas señales, pro-inflamatorias y anti-inflamatorias.

Si bien IL-10 ha demostrado un potente efecto anti-inflamatorio en multitud de estudios^{96,148} a los que se suman muchos otros que describen mejoras en la función cardiaca post-IAM mediante su administración exógena¹⁴⁹⁻¹⁵¹, también existen otros autores que han destacado la sobreexpresión plasmática de IL-10 en patologías cardiovasculares¹⁵². Sin embargo, más recientemente se ha descrito que la relación entre esta citoquina y el pronóstico de las ECV depende de cada patología, estado de la misma y el contexto de otros factores pro-inflamatorios¹⁵³. En general, los efectos pleiotrópicos de las citoquinas y su participación en diversas respuestas en diferentes tipos celulares, suponen una desventaja más añadida. Es cierto que muchos tipos celulares son sensibles a IL-10, que no comprenden únicamente a los macrófagos y, por lo tanto, es un abordaje que podría causar efectos no específicos. No obstante, y a pesar de los avances en la investigación biomédica, la implementación de este tipo de terapias sigue siendo un gran reto debido a la gran heterogeneidad celular y molecular

implicada en el IAM y las distintas y entrelazadas vías de señalización que se activan en respuesta al mismo, y que dependen sustancialmente del tipo celular dentro del microambiente que lo dirige.

En este trabajo demostramos el poder anti-inflamatorio de un análogo a IL-10 que opera específicamente en los macrófagos cardíacos, y de esta manera, evita su llegada a otras dianas en respuesta al IAM. Nuestro enfoque aporta una especificidad añadida al tratamiento, siendo vehiculado en forma de nanopartícula y pudiendo, concretamente tras un IAM cuando la población de macrófagos crece exponencialmente, unirse y ejercer su función en el miocardio dañado.

La respuesta inflamatoria que acompaña al IAM tiene un impacto local y sistémico. El desequilibrio en la secreción de citoquinas está relacionado con un mal pronóstico en la mayoría de los casos, que se agudizan cuando el desequilibrio parte de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α o IL-1. Algunos estudios en pacientes de IAM con posterior perfusión vía APTC, han revelado un patrón inflamatorio definido por una elevada concentración de citoquinas pro-inflamatorias¹⁵⁴, moléculas secretadas predominantemente por leucocitos en general y macrófagos de tipo M1 en especial, que también se relacionaron con el desarrollo de cardiomiopatías, un remodelado cardíaco adverso y edema pulmonar¹⁵⁵. Otros autores corroboraron estos datos en pacientes de IAM, mostrando que el incremento plasmático de TNF- α se asociaba, además, a un extenso daño miocárdico, signos de IC y anomalías en la conducción¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ que específicamente dependía de los leucocitos mononucleares a las pocas horas tras la ocurrencia de un IAM¹⁵⁶.

Nuestros resultados están en consonancia con esta aproximación, al observar, tras la evaluación de los niveles plasmáticos de varias citoquinas, que TNF- α e IL-1 α , se encuentran incrementadas en animales sometidos a I/R con una lesión miocárdica más extendida y peor función cardíaca, al contrario de lo que sucede en los animales tratados con NIL10, donde el patrón de respuesta es mayoritariamente anti-inflamatorio. Sin embargo, encontramos diferencias con otros autores en cuanto al papel de G-CSF, una citoquina hematopoyética encargada de movilizar células madre desde la médula ósea. Algunos estudios reportaron efectos beneficiosos en la inyección de G-CSF en ratones sometidos a IAM donde se conseguía, a través de la movilización de células madre hacia el corazón lesionado, mejorar la función cardíaca y reducir la mortalidad,¹⁵⁷ a lo que se le suman otros autores que han descrito efectos cardioprotectores adicionales de G-CSF en varios modelos animales de IAM^{158,159}. Sin embargo, también se publicaron ensayos clínicos realizados mediante la administración de G-CSF en pacientes de IAM en los que vieron efectos

no significativos, o incluso negativos^{160,161}. En nuestro caso, los dos modelos animales de IAM utilizados en este estudio mostraron unos niveles elevados de G-CSF en comparación con los animales tratados con NIL10, que además no se relacionaba con efectos cardioprotectores. La explicación a estos resultados podría deberse a un mecanismo fisiológico compensatorio en el que se esté induciendo la infiltración de células madre en el corazón lesionado en un intento por remediar el daño cardiaco sostenido, que no encontramos en los animales tratados con NIL10, planteándonos su futura investigación.

Las citoquinas anti-inflamatorias han cobrado importancia como dianas terapéuticas en investigación cardiovascular por la evidencia en sus efectos favorables en las ECV, como describíamos sobre IL-10. Como ejemplo, IL-4, es una citoquina de naturaleza anti-inflamatoria que ha demostrado estar relacionada con un riesgo bajo de padecer ECV¹⁶². Concretamente en el IAM, una baja concentración plasmática de IL-4 suele estar asociada al desarrollo de disfunción ventricular¹⁶³, que ha sido descrita también como implicada en el reclutamiento y polarización de macrófagos de tipo M2 en la fase aguda de la respuesta inflamatoria post-IAM¹⁶⁴.

Así mismo, la interleuquina-13 (IL-13) también actúa a nivel de polarización de macrófagos interviniendo en el tránsito hacia M2, vía IL-4R α /STAT6 en este caso¹⁶⁵. Algunos autores han descrito que IL-13 se encuentra significativamente aumentada en ratones después de 3 días post-IAM, momento en el que la respuesta inflamatoria debe comenzar a atenuarse. Otros trabajos describen que los animales deficientes para el gen *IL-13* muestran un VI anormalmente dilatado tras la generación de un IAM, comparándolo con animales de genotipo salvaje¹⁶⁶. Con todo, IL-13 está implicada en el reclutamiento de monocitos y macrófagos en el área de infarto y la posterior inducción de un fenotipo anti-inflamatorio.

En común, ambas citoquinas IL-4 e IL-13 se caracterizan por tener propiedades cardioprotectoras, en la misma dirección que muestran nuestros resultados, donde el análisis de citoquinas plasmáticas tras 3 días de reperusión post-isquemia reveló unos niveles aumentados de las citoquinas anti-inflamatorias IL-10, IL-4 e IL-13 en ambas especies animales estudiadas, tratadas con NIL10. Estos resultados manifiestan una vez más las capacidades de NIL10 no solo para inducir un microambiente anti-inflamatorio sino para atenuar las señales pro-inflamatorias que se expresan de manera fisiológica tras el acontecimiento de un IAM, ejerciendo un efecto modulador de la interacción entre las señales pro- y anti-inflamatorias.

2. STAT3 en la respuesta anti-inflamatoria

La familia STAT incluye 7 miembros implicados en diversas respuestas desencadenadas por distintas citoquinas y receptores¹⁶⁷. En concreto, STAT3 es un regulador clave de la respuesta inflamatoria. De todos los miembros de este grupo de proteínas, solo la deficiencia del gen *STAT3* es letal a nivel embrionario en ratones, un dato que demuestra su papel absolutamente esencial para la vida¹⁶⁸.

Inicialmente, STAT3 fue descrito como un factor de transcripción implicado en la maquinaria activadora de la citoquina pro-inflamatoria IL-6, aunque estudios más recientes revelaron su activación mediante muchas otras citoquinas como IL-10, pudiendo mediar respuestas contrarias¹⁶⁹ y jugando un papel regulador en la sinergia y antagonismo de las distintas señales dentro de la respuesta inflamatoria. Concretamente, STAT3 ejerce su papel anti-inflamatorio en células fagocíticas como los macrófagos, donde se ha descrito que su deficiencia genera una secreción de grandes cantidades de citoquinas pro-inflamatorias a través de la activación de TLR4¹⁷⁰.

La activación de STAT3 es uno de los efectos más claros producto de la activación de la ruta de señalización inducida por IL-10^{171,172}. La modulación de IL-10 ha demostrado ser un mecanismo cardioprotector tanto *in vivo* como *in vitro*, modulando e inhibiendo a su vez rutas de señalización implicadas en estrés y pro-inflamación, como P38-MAPK, NF- κ B y JAK/STAT3^{173,174}. En esta línea, hemos caracterizado la ruta de señalización mediante la cual IL-10 consigue polarizar los macrófagos del tejido cardiaco infartado, siendo STAT3 el mediador principal en el contexto de la finalización del proceso pro-inflamatorio. STAT3 ejerce su función en el núcleo celular, regulando la transcripción de genes pro-inflamatorios, específicamente induciendo la expresión de represores de moléculas pro-inflamatorias, entre las que se encuentra NF- κ B¹⁷⁵.

El análisis tisular de la zona necrótica del miocardio tras 7 días de infarto reveló la completa activación de la ruta IL-10R/STAT3 inducida por IL-10, determinada por la presencia de las formas fosforiladas de las dos proteínas decisivas para la efectiva promoción de la señal anti-inflamatoria. La acumulación de macrófagos de tipo M1 en la zona infartada en primera instancia, es sometida a cambios fenotípicos debido a la unión específica con IL-10, provocando la polarización de gran parte de ellos hacia un fenotipo M2, en los que la ruta de señalización IL-10R/STAT3 descrita, se encuentra activada, y por lo tanto, las proteínas que intervienen, sobreexpresadas. Estos resultados concuerdan con resultados previos en los que se describe concretamente a STAT3 como el factor de transcripción determinante para la activación alternativa o de tipo M2 en macrófagos aislados de ratón y aislados de muestras humanas^{176,177}.

La clasificación de macrófagos cardíacos, aún con su carácter heterogéneo, ha sido convencionalmente establecida a partir de marcadores de superficie de membrana, encontrándose los macrófagos de tipo M1 implicados en la destrucción del tejido y los de tipo M2 en la cicatrización y reparación del tejido inflamado. En este contexto, caracterizamos las subpoblaciones de macrófagos según la expresión de dos marcadores específicos (CD206 y CD68) en el área de infarto de ratones sometidos a I/R tratados con la nanopartícula control (NIL10SC), siendo la subpoblación M1 (células positivas para CD68 pero negativas para CD206) imperante tras 3 días de reperfusión y la subpoblación M2 (positivas para CD68/CD206) la que predominaba transcurridos 7 días de reperfusión, obteniendo resultados similares a los de otros autores en los que se describen macrófagos de tipo M1 como la subpoblación dominante en la primera fase de la respuesta inmune en el corazón tras un IAM, siendo el fenotipo mayoritario durante los primeros 3 días post-isquemia, mientras que los de tipo M2 representaban la población predominante tras 5-7 días post-isquemia en ratones¹⁷⁸.

El conjunto de nuestros resultados obtenidos mediante citometría de flujo apunta directamente a NIL10 como agente modulador del fenotipo de macrófagos, que además se caracteriza por tener un momento específico de actuación. NIL10 actúa en la fase inicial de la respuesta inflamatoria, promoviendo la polarización de macrófagos hacia un estado resolutorio, acelerando el proceso antes de que se produzca el pico efector de la segunda fase de la respuesta inflamatoria en la que se contiene la respuesta pro-inflamatoria inicial (día 3). A los 7 días de reperfusión, los efectos producidos en la aceleración de la polarización de macrófagos hacia un estado M2 quedan amortiguados por mecanismos fisiológicos de contención de la respuesta pro-inflamatoria. Esta es probablemente la razón por la que a los 7 días la población de macrófagos totales es algo menor en animales sometidos a I/R tratados con NIL10, pero la subpoblación de M2 en este punto ya es semejante a la de los animales sometidos a I/R y tratados con la nanopartícula control (NIL10SC) (Fig 34). Este dato, a su vez, contribuye a explicar la reducción de la inflamación tisular encontrada en los estudios histológicos de estos animales. Nuestros resultados son coincidentes con otros estudios que apuntan a que la activación de STAT3 no solo induce la polarización de macrófagos hacia un estado M2, sino que suprime el fenotipo de tipo M1, suprimiendo además la producción de citoquinas pro-inflamatorias a través de la inhibición, entre otras moléculas, de NF- κ B¹⁷⁹.

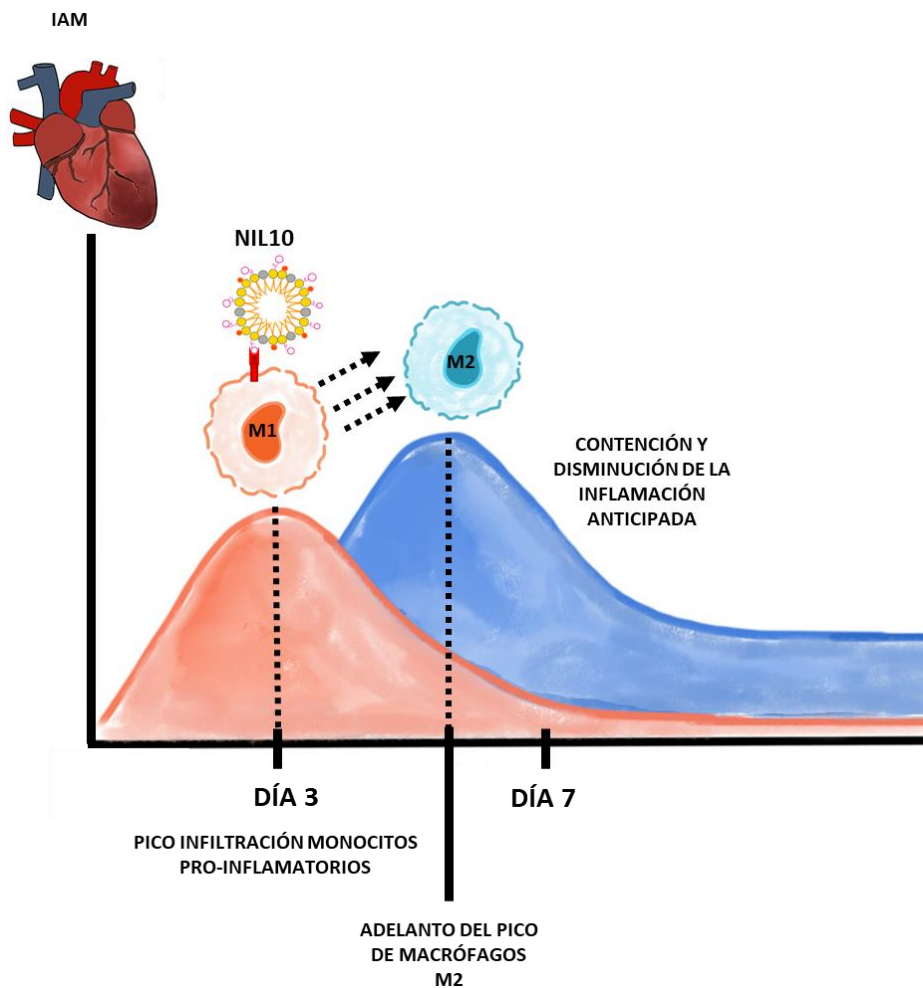


Figura 34. Resumen gráfico del efecto de NIL10 en la polarización de macrófagos cardiacos. NIL10 provoca el adelanto en la aparición del pico de macrófagos de tipo M2 en el tejido cardiaco infartado, que tiene lugar antes de lo esperado (D7). En conjunto, esta situación conduce a un tránsito anticipado hacia un microambiente anti-inflamatorio. De manera general, se induce la contención de la respuesta pro-inflamatoria antes de que esta sea perjudicial para la posterior resolución y reparación del tejido cardiaco dañado, evitando una remodelación cardiaca anómala.

Además de la efectiva progresión de la señal anti-inflamatoria por esta vía dependiente de la activación de IL-10R, se encontró también una asociación entre STAT3 y la disminución de otros factores pro-inflamatorios implicados en la amplificación de la inflamación tras el daño tisular. En este trabajo demostramos una relación directa entre la inhibición de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, proteína secuestradora de NF- κB , y NIL10 en macrófagos activados con LPS. Como ya describimos anteriormente, NIL10 ejerce su función mediante la señalización IL-10R/STAT3, promoviendo así la reducción de marcadores pro-inflamatorios, de manera dependiente de la fosforilación de STAT3. Otros autores han reportado con anterioridad trabajos que apoyan nuestros resultados, en los que describen el poder inhibitorio de IL-10 para NF- κB de manera $\text{I}\kappa\text{B}$ dependiente^{180,181}.

La confirmación del efecto anti-inflamatorio de NIL10 la analizamos inhibiendo farmacológicamente STAT3, encontrando que en este caso la localización nuclear de NF- κ B no se veía modificada en presencia de NIL10, así como tampoco su efecto sobre la expresión de iNOS, utilizado en este caso como gen reportador, al presentar su promotor dos dominios de unión a NF- κ B¹⁸². En los casos en los que no inhibimos farmacológicamente la activación de STAT3, la enzima iNOS se veía incrementada en macrófagos activados por LPS. Sin embargo, en presencia de NIL10, la retención de NF- κ B en el citoplasma celular condicionó su expresión, disminuyéndola. La presencia o ausencia de NF- κ B nuclear, tuvo como repercusión la recuperación o disminución de los niveles de iNOS.

En conjunto, nuestros resultados demuestran que NIL10 no solo actúa mediando la polarización de macrófagos de manera IL-10R/STAT3 dependiente, sino que además inhibe efectores pro-inflamatorios claves en la extensión de la primera fase de la respuesta inflamatoria.

Por otra parte, identificamos una disminución de marcadores relacionados con la progresión de la necrosis en el tejido lesionado post-isquemia de los modelos animales de I/R estudiados en este trabajo en respuesta a NIL10. MMP-9 es un marcador de necrosis que ayuda a estimar la afectación del tejido cardíaco¹⁸³. La reducción de infiltrados leucocitarios se asocia con un descenso de factores pro-inflamatorios en la región tisular dañada, entre otros motivos, por la reducción de la fuente mayoritaria de MMP-9 y la consiguiente atenuación de la degradación de colágeno, reduciendo así la ruptura del VI¹⁸⁴.

Nuestros resultados muestran una menor actividad de MMP-9 en el tejido infartado de animales tratados con NIL10 que a su vez concuerdan con el fenotipo anti-inflamatorio de la población mayoritariamente localizada en esta región, los macrófagos M2, según los datos que obtuvimos en citometría de flujo, donde la subpoblación M1 disminuía significativamente. Estos datos, se encuentran en concordancia con los de otros autores que atribuyen a la subpoblación de macrófagos de tipo M1 la cualidad de destrucción del tejido durante el remodelado cardíaco mediante la liberación de proteasas entre las que se encuentra MMP-9^{185,186} y enlazan con la razón por la cual, en el tejido infartado de animales tratados con NIL10, MMP-9 se encuentra disminuida, siendo la razón causante la disminución de macrófagos.

En resumen, nuestros resultados no solo fueron similares en ambas especies animales, tanto en ratones de genotipo salvaje y deficientes para el gen *IL-10* como en cerdos, sino considerablemente positivos: el tratamiento con NIL10 logró el mantenimiento de la FEVI, la reducción del tamaño infarto, el descenso de focos inflamatorios y depósitos de colágeno en el miocardio dañado, la inducción de un microambiente anti-inflamatorio acelerado en el tejido necrótico del corazón gracias a la polarización de macrófagos de tipo M2, que se traducía además en la instauración de un ambiente anti-inflamatorio sistémico (Fig 35).

La similitud en la respuesta a un mismo fármaco entre distintas especies es un dato que difiere de otros autores que describen cambios sustanciales entre especies incluso emparentadas en cuanto a la efectividad de tratamientos y que, por lo tanto, no solo invalida resultados, sino que se suele asociar a efectos contrapuestos en humanos¹⁸⁷. El uso de modelos animales grandes en el desarrollo de terapias en el IAM es determinante para la validación de resultados y el análisis de diferentes parámetros hemodinámicos que propicien el salto a la clínica, a lo que se le añade en este caso, la paridad detectada en la respuesta a la nanopartícula NIL10 de las dos especies estudiadas, un punto a favor más a su apuesta traslacional.

3. Resumen gráfico

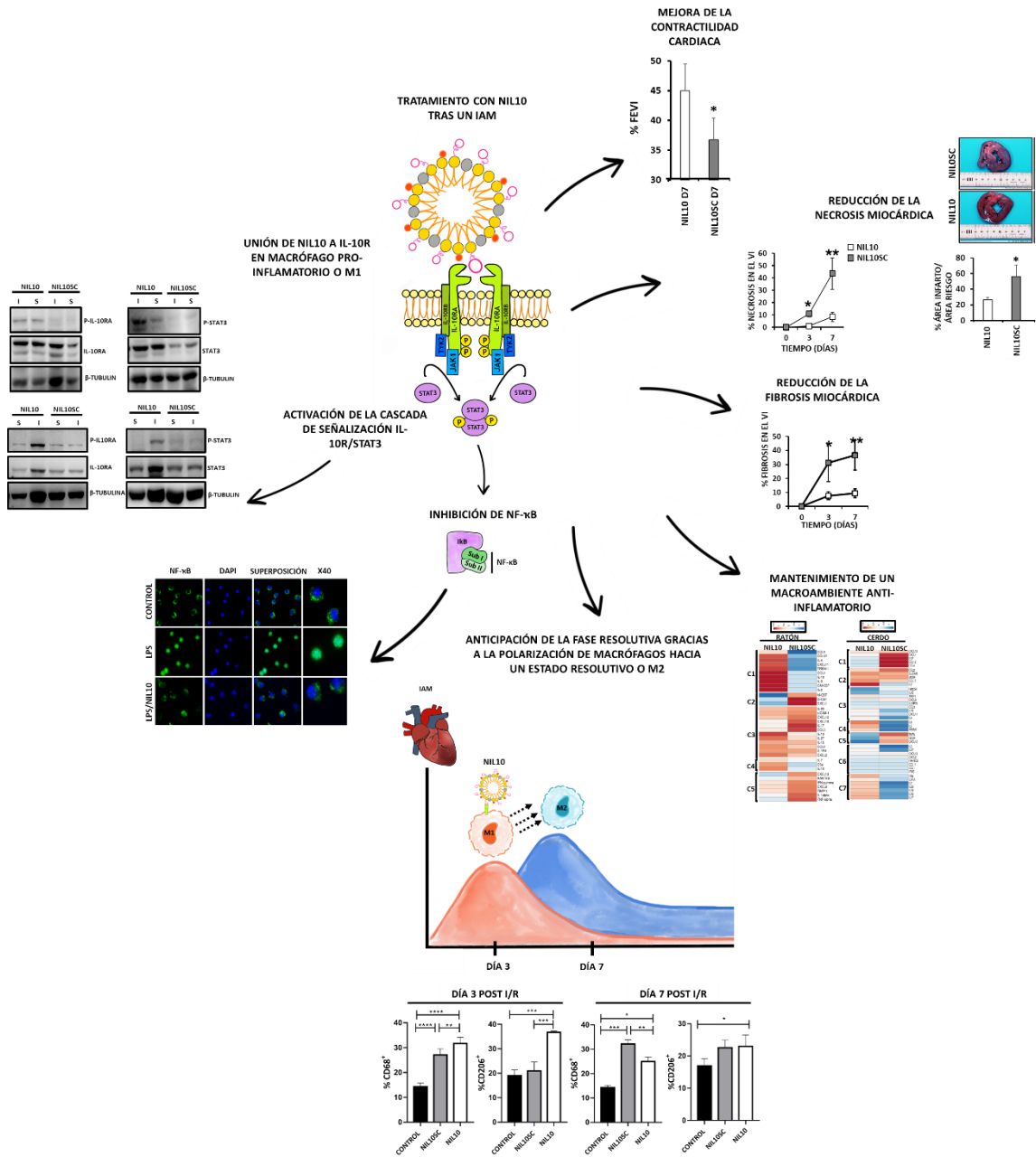


Figura 35. Resumen gráfico del proyecto de investigación.

Conclusiones

1. NIL10 tiene como diana específica IL-10R, a través del cual ejerce su función anti-inflamatoria.
2. La administración de NIL10 mejora la función cardíaca, reduciendo el área de infarto, la fibrosis y la inflamación en modelos animales de isquemia-reperfusión coronaria.
3. La administración de NIL10 induce la polarización de macrófagos hacia un estado anti-inflamatorio o M2, anticipando la fase resolutive del proceso inflamatorio en el tejido cardíaco lesionado tras un Infarto Agudo de Miocardio.
4. La administración de NIL10 inhibe la repolarización de macrófagos anti-inflamatorios o M2 hacia un estado pro-inflamatorio o M1 debido a la activación de STAT3, inhibiendo el factor de transcripción pro-inflamatorio NF- κ B.
5. NIL10 no solo tiene la propiedad de inducir la instauración de un microambiente anti-inflamatorio en el corazón tras un Infarto Agudo de Miocardio, sino que también incide en la implantación anticipada de un ambiente anti-inflamatorio sistémico.
6. NIL10 es una herramienta con potencial teragnóstico, gracias a la cual podríamos evaluar la progresión del Infarto Agudo de Miocardio mediante imagen molecular no invasiva por resonancia magnética nuclear y a la vez promover la mejora de la función cardíaca tras esta patología.

Bibliografía

1. SS, V. *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics-2021 Update A Report from the American Heart Association. *Circulation* vol. 143 E254–E743 Preprint at <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000950> (2021).
2. Timmis, A. *et al.* European society of cardiology: Cardiovascular disease statistics 2019. *Eur Heart J* **41**, 12–85 (2020).
3. World Health Organization. WHO Mortality Database. <https://www.who.int/data/data-collection-tools/who-mortality-database> (2022).
4. Jaul, E. & Barron, J. Age-Related Diseases and Clinical and Public Health Implications for the 85 Years Old and Over Population. *Front Public Health* **5**, 335 (2017).
5. Instituto Nacional de Estadística (INE). Defunciones según la Causa de Muerte (Avance enero-mayo 2019 y de 2020). www.ine.es/prensa/prensa.htm.
6. Alcalá López, J. E., Bellido, C. M., Simón, P. H. & Rodríguez Padial, L. *Cardiopatía isquémica: concepto, clasificación, epidemiología, factores de riesgo, pronóstico y prevención*. *Medicine* vol. 12 (2017).
7. Anderson, K. M., Wilson, P. W. F., Odell, P. M. & Kannel, W. B. An updated coronary risk profile. A statement for health professionals. *Circulation* **83**, 356–362 (1991).
8. Pencina, M. J. *et al.* Quantifying Importance of Major Risk Factors for Coronary Heart Disease. *Circulation* **139**, 1603 (2019).
9. Grau, M. & Marrugat, J. Funciones de riesgo en la prevención primaria de las enfermedades cardiovasculares. *Rev Esp Cardiol* **61**, 404–416 (2008).
10. Greenland, P. *et al.* Major Risk Factors as Antecedents of Fatal and Nonfatal Coronary Heart Disease Events. *JAMA* **290**, 891–897 (2003).
11. J, S. *et al.* Low risk-factor profile and long-term cardiovascular and noncardiovascular mortality and life expectancy: findings for 5 large cohorts of young adult and middle-aged men and women. *JAMA* **282**, 2012–2018 (1999).
12. PW, W. *et al.* Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* **97**, 1837–1847 (1998).
13. RB, D. *et al.* General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation* **117**, 743–753 (2008).
14. P, B., A, B., T, F. & S, E. Accuracy and impact of risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *Heart* **92**, 1752–1759 (2006).
15. Guía ESC 2016 sobre prevención de la enfermedad cardiovascular en la práctica clínica. *Rev Esp Cardiol* **69**, 939.e1-939.e87 (2016).
16. DL, B. *et al.* Comparative determinants of 4-year cardiovascular event rates in stable outpatients at risk of or with atherothrombosis. *JAMA* **304**, 1350–1357 (2010).
17. Corti, R., Fuster, V. & Badimon, J. J. Pathogenetic concepts of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* **41**, S7–S14 (2003).
18. Kumar, V., Abbas, A. K., Abbas, A. K. & Aster, J. C. Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional. in 499–501 (Elsevier, 2021).

19. Thygesen, K. *et al.* Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation* **138**, e618–e651 (2018).
20. McLeish, M. J. & Kenyon, G. L. Relating structure to mechanism in creatine kinase. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **40**, 1–20 (2005).
21. Aydin, S., Ugur, K., Aydin, S., Sahin, İ. & Yardim, M. Biomarkers in acute myocardial infarction: current perspectives. *Vasc Health Risk Manag* **15**, 1 (2019).
22. Black, S., Kushner, I. & Samols, D. C-reactive Protein *. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 48487–48490 (2004).
23. Clyne, B. & Olshaker, J. S. The C-reactive protein. *J Emerg Med* **17**, 1019–1025 (1999).
24. Criteria, I. of M. (US) C. on S. S. C. D. Ischemic Heart Disease. (2010).
25. Sevilla, T., Arnold, R., Amado, M., Revilla, A. & San Román, J. A. Técnicas de imagen no invasivas en la investigación cardiovascular. *Rev Esp Cardiol* **13**, 64–72 (2013).
26. Hernández, C. *et al.* [Basic principles of cardiovascular magnetic resonance (CMR): sequences, acquisition planes and study protocol]. *An Sist Sanit Navar* **30**, 405–418 (2007).
27. Thygesen, K. *et al.* Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation* **138**, e618–e651 (2018).
28. Kim, R. J. *et al.* Relationship of MRI delayed contrast enhancement to irreversible injury, infarct age, and contractile function. *Circulation* **100**, 1992–2002 (1999).
29. Cheng, K. *et al.* Hybrid Nanotrimers for Dual T1 and T2-Weighted Magnetic Resonance Imaging. *ACS Nano* **8**, 9884 (2014).
30. Criteria, I. of M. (US) C. on S. S. C. D. *Cardiovascular disability: Updating the social security listings. Cardiovascular Disability: Updating the Social Security Listings* (National Academies Press, 2010). doi:10.17226/12940.
31. Falk, E., Nakano, M., Bentzon, J. F., Finn, A. v. & Virmani, R. Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view. *Eur Heart J* **34**, 719–728 (2013).
32. Bentzon, J. F., Otsuka, F., Virmani, R. & Falk, E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res* **114**, 1852–1866 (2014).
33. Killip, T. & Kimball, J. T. Treatment of myocardial infarction in a coronary care unit. A two year experience with 250 patients. *Am J Cardiol* **20**, 457–464 (1967).
34. JF, B., F, O., R, V. & E, F. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res* **114**, 1852–1866 (2014).
35. Reimer, K. A., Jennings, R. B. & Tatum, A. H. Pathobiology of acute myocardial ischemia: Metabolic, functional and ultrastructural studies. *Am J Cardiol* **52**, 72–81 (1983).
36. RB, J. & CE, G. Structural changes in myocardium during acute ischemia. *Circ Res* **35 Suppl 3**, 156–172 (1974).
37. Reimer, K. A., Jennings, R. B. & Tatum, A. H. Pathobiology of acute myocardial ischemia: Metabolic, functional and ultrastructural studies. *Am J Cardiol* **52**, 72–81 (1983).

38. Piper, H. M., Abdallah, Y. & Schäfer, C. The first minutes of reperfusion: A window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovascular Research* vol. 61 365–371 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.12.012> (2004).
39. Hausenloy, D. J. & Yellon, D. M. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest* **123**, 92–100 (2013).
40. HM, P., D, G.-D. & M, O. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **38**, 291–300 (1998).
41. Frangogiannis, N. G. Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Compr Physiol* **5**, 1841–1875 (2015).
42. Frangogiannis, N. G. The immune system and the remodeling infarcted heart: cell biological insights and therapeutic opportunities. *J Cardiovasc Pharmacol* **63**, 185–195 (2014).
43. Bianchi, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* **81**, 1–5 (2007).
44. Gerber, B. L. Risk area, infarct size, and the exposure of the wavefront phenomenon of myocardial necrosis in humans. *Eur Heart J* **28**, 1670–1672 (2007).
45. Nahrendorf, M. & Swirski, F. K. Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart. *Circ Res* **112**, 1624–1633 (2013).
46. Mann, D. L. & Bristow, M. R. Mechanisms and models in heart failure: The biomechanical model and beyond. *Circulation* **111**, 2837–2849 (2005).
47. Schwinger, R. H. G. Pathophysiology of heart failure. *Cardiovasc Diagn Ther* **11**, (2021).
48. Frangogiannis, N. G. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nature Reviews Cardiology* 2014 11:5 **11**, 255–265 (2014).
49. Vandooren, J., van den Steen, P. E. & Opdenakker, G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **48**, 222–272 (2013).
50. Iyer, R. P., Jung, M. & Lindsey, M. L. MMP-9 signaling in the left ventricle following myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **311**, H190–H198 (2016).
51. Cuadrado, I. *et al.* EMMPRIN-Targeted Magnetic Nanoparticles for In Vivo Visualization and Regression of Acute Myocardial Infarction. *Theranostics* **6**, 545–557 (2016).
52. Nathan, C. & Ding, A. Nonresolving inflammation. *Cell* **140**, 871–882 (2010).
53. Kumar, V., Abbas, A. K., Abbas, A. K. & Aster, J. C. Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional. in 70–107 (2021).
54. Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E. & Taylor, P. R. Tissue-resident macrophages. *Nature Immunology* 2013 14:10 **14**, 986–995 (2013).
55. Greter, M. *et al.* Stroma-derived interleukin-34 controls the development and maintenance of langerhans cells and the maintenance of microglia. *Immunity* **37**, 1050–1060 (2012).

56. Gordon, S. & Taylor, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology* 2005 5:12 **5**, 953–964 (2005).
57. Cohn, Z. A. The Activation of Mononuclear Phagocytes: Fact, Fancy, and Future. *The Journal of Immunology* **121**, (1978).
58. Ilya Mechnikov – Nobel Lecture - NobelPrize.org. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1908/mechnikov/lecture/>.
59. Gordon, S. & Taylor, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology* Preprint at <https://doi.org/10.1038/nri1733> (2005).
60. Van Furth, R., Diesselhoff-Den Dulk, M. M. C. & Mattie, H. Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction. *Journal of Experimental Medicine* (1973) doi:10.1084/jem.138.6.1314.
61. Geissmann, F., Jung, S. & Littman, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**, 71–82 (2003).
62. Tsujioka, H. *et al.* Impact of Heterogeneity of Human Peripheral Blood Monocyte Subsets on Myocardial Salvage in Patients With Primary Acute Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* **54**, 130–138 (2009).
63. Nahrendorf, M. *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* **204**, 3037 (2007).
64. Hashimoto, D. *et al.* Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* **38**, 792–804 (2013).
65. Sager, H. B. *et al.* Proliferation and Recruitment Contribute to Myocardial Macrophage Expansion in Chronic Heart Failure. *Circ Res* **119**, 853–864 (2016).
66. Bajpai, G. *et al.* The Human Heart Contains Distinct Macrophage Subsets with Divergent Origins and Functions HHS Public Access. *Nat Med* **24**, 1234–1245 (2018).
67. Aurora, A. B. *et al.* Macrophages are required for neonatal heart regeneration. *J Clin Invest* **124**, 1382–1392 (2014).
68. Hulsmans, M. *et al.* Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart. *Cell* **169**, 510-522.e20 (2017).
69. Frantz, S. & Nahrendorf, M. Cardiac macrophages and their role in ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res* **102**, 240–248 (2014).
70. Taylor, P. R. *et al.* Macrophage receptors and immune recognition. *Annual Review of Immunology* Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115816> (2005).
71. Mosser, D. M. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* (2003) doi:10.1189/jlb.0602325.
72. Goerdts, S. & Orfanos, C. E. Other functions, other genes: Alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity* Preprint at [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80014-X](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80014-X) (1999).

73. Ong, S. B. *et al.* Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. *Pharmacol Ther* **186**, 73 (2018).
74. Hulsmans, M. & Nahrendorf, M. Smad3 Cranks Up the Appetite of Infarct Macrophages. *Circ Res* **125**, 71–73 (2019).
75. Fiorentino, D. F., Bond, M. W. & Mosmann, T. R. Two types of mouse t helper cell: IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *Journal of Experimental Medicine* (1989) doi:10.1084/jem.170.6.2081.
76. Moore, K. W., De Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. & O'Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology* Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.683> (2001).
77. Medzhitov, R. *et al.* Highlights of 10 years of immunology in Nature Reviews Immunology. *Nature Reviews Immunology* Preprint at <https://doi.org/10.1038/nri3063> (2011).
78. Zdanov, A. *et al.* Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon γ . *Structure* (1995) doi:10.1016/S0969-2126(01)00193-9.
79. Walter, M. R. & Nagabhushan, T. L. Crystal Structure of Interleukin 10 Reveals an Interferon γ -like Fold. *Biochemistry* (1995) doi:10.1021/bi00038a004.
80. Zdanov, A., Schalk-Hihi, C., Menon, S., Moore, K. W. & Wlodawer, A. Crystal structure of Epstein-Barr virus protein BCRF1, a homolog of cellular interleukin-10. *J Mol Biol* (1997) doi:10.1006/jmbi.1997.0990.
81. Commins, S., Steinke, J. W. & Borish, L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.02.026> (2008).
82. Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T. R., Howard, M. & O'Garra, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* (1991).
83. Abrams, J., Figdor, C. G., De Waal Malefyt, R., Bennett, B. & De Vries, J. E. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *Journal of Experimental Medicine* (1991) doi:10.1084/jem.174.5.1209.
84. Bogdan, C., Vodovotz, Y. & Nathan, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *Journal of Experimental Medicine* (1991) doi:10.1084/jem.174.6.1549.
85. Oswald, I. P., Gazzinelli, R. T., Sher, A. & James, S. L. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity. *J Immunol* (1992).
86. Windsor, W. T. *et al.* Disulfide Bond Assignments and Secondary Structure Analysis of Human and Murine Interleukin 10. *Biochemistry* (1993) doi:10.1021/bi00085a011.
87. Mosmann, T. R. *et al.* Isolation of monoclonal antibodies specific for IL-4, IL-5, IL-6, and a new Th2-specific cytokine (IL-10), cytokine synthesis inhibitory factor, by using a solid phase radioimmunoabsorbent assay. *The Journal of Immunology* (1990).

88. Liu, Y. *et al.* The EBV IL-10 homologue is a selective agonist with impaired binding to the IL-10 receptor. *J Immunol* **158**, 604–613 (1997).
89. Liu, Y., Wei, S. H., Ho, A. S., de Waal Malefyt, R. & Moore, K. W. Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *J Immunol* **152**, 1821–1829 (1994).
90. Lutfalla, G., Gardiner, K. & Uze, G. A new member of the cytokine receptor gene family maps on chromosome 21 at less than 35 kb from IFNAR. *Genomics* (1993) doi:10.1006/geno.1993.1199.
91. Sung, I. Y., Logsdon, N. J., Sheikh, F., Donnelly, R. P. & Walter, M. R. Conformational changes mediate interleukin-10 receptor 2 (IL-10R2) binding to IL-10 and assembly of the signaling complex. *Journal of Biological Chemistry* (2006) doi:10.1074/jbc.M606791200.
92. Spencer, S. D. *et al.* The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the interleukin 10 receptor. *Journal of Experimental Medicine* (1998) doi:10.1084/jem.187.4.571.
93. Kotenko, S. V. *et al.* Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. *EMBO Journal* (1997) doi:10.1093/emboj/16.19.5894.
94. Shouval, D. S. *et al.* Interleukin 10 receptor signaling: Master regulator of intestinal mucosal homeostasis in mice and humans. in *Advances in Immunology* (2014). doi:10.1016/B978-0-12-800267-4.00005-5.
95. Verma, S. K. *et al.* Interleukin-10 treatment attenuates pressure overload-induced hypertrophic remodeling and improves heart function via signal transducers and activators of transcription 3-dependent inhibition of nuclear factor- κ B. *Circulation* **126**, 418–429 (2012).
96. Frangogiannis, N. G. *et al.* IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. *Journal of Immunology* **165**, 2798–2808 (2000).
97. Murray, P. J. Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. *Curr Opin Pharmacol* **6**, 379–386 (2006).
98. Murray, P. J. The JAK-STAT Signaling Pathway: Input and Output Integration. *The Journal of Immunology* (2007) doi:10.4049/jimmunol.178.5.2623.
99. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology* Preprint at <https://doi.org/10.1038/nri978> (2003).
100. Starr, R. *et al.* A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* **387**, 917–921 (1997).
101. Hovsepian, E., Penas, F., Siffo, S., Mirkin, G. A. & Goren, N. B. IL-10 Inhibits the NF- κ B and ERK/MAPK-Mediated Production of Pro-Inflammatory Mediators by Up-Regulation of SOCS-3 in Trypanosoma cruzi-Infected Cardiomyocytes. *PLoS One* **8**, e79445 (2013).
102. Shouval, D. S. *et al.* Interleukin 10 Receptor Signaling: Master Regulator of Intestinal Mucosal Homeostasis in Mice and Humans. *Adv Immunol* **122**, 177 (2014).
103. Perkins, N. D. The diverse and complex roles of NF- κ B subunits in cancer. *Nat Rev Cancer* **12**, 121–132 (2012).

104. Cartwright, T., Perkins, N. D. & L Wilson, C. NFKB1: a suppressor of inflammation, ageing and cancer. *FEBS J* **283**, 1812–1822 (2016).
105. Trinh, D. v., Zhu, N., Farhang, G., Kim, B. J. & Huxford, T. The nuclear I kappaB protein I kappaB zeta specifically binds NF-kappaB p50 homodimers and forms a ternary complex on kappaB DNA. *J Mol Biol* **379**, 122–135 (2008).
106. Perkins, N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 49–62 (2007).
107. Welte, T. *et al.* STAT3 deletion during hematopoiesis causes Crohn's disease-like pathogenesis and lethality: A critical role of STAT3 in innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1879 (2003).
108. Driessler, F., Venstrom, K., Sabat, R., Asadullah, K. & Schottelius, A. J. Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF-κB activity: a role for p50. *Clin Exp Immunol* **135**, 64 (2004).
109. Mansoori, G., International, T. S.-J. of A. & 2005, undefined. Nanotechnology—an introduction for the standards community. *astm.org* **2**, (2005).
110. Kinnear, C., Moore, T. L., Rodriguez-Lorenzo, L., Rothen-Rutishauser, B. & Petri-Fink, A. Form Follows Function: Nanoparticle Shape and Its Implications for Nanomedicine. *Chem Rev* **117**, 11476–11521 (2017).
111. Irvine, D. J. & Dane, E. L. Enhancing cancer immunotherapy with nanomedicine. *Nat Rev Immunol* **20**, 321–334 (2020).
112. Chames, P., van Regenmortel, M., Weiss, E. & Baty, D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br J Pharmacol* **157**, 220 (2009).
113. Duivenvoorden, R. *et al.* Nanoimmunotherapy to treat ischaemic heart disease. *Nat Rev Cardiol* **16**, 21–32 (2019).
114. van der Valk, F. M. *et al.* Prednisolone-containing liposomes accumulate in human atherosclerotic macrophages upon intravenous administration. *Nanomedicine* **11**, 1039–1046 (2015).
115. van der Valk, F. M. *et al.* Liposomal prednisolone promotes macrophage lipotoxicity in experimental atherosclerosis. *Nanomedicine* **12**, 1463–1470 (2016).
116. Sosnovik, D. E. *et al.* Molecular MRI of Cardiomyocyte Apoptosis with Simultaneous Delayed Enhancement MRI Distinguishes Apoptotic and Necrotic Myocytes In Vivo: Potential for Midmyocardial Salvage in Acute Ischemia. doi:10.1161/CIRCIMAGING.109.859678.
117. Sosnovik, D. E., Nahrendorf, M. & Weissleder, R. Targeted imaging of myocardial damage. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **5**, S63 (2008).
118. Cuadrado, I. *et al.* EMMPRIN-Targeted Magnetic Nanoparticles for In Vivo Visualization and Regression of Acute Myocardial Infarction. *Theranostics* **6**, 545 (2016).
119. W, C., DP, C., ZA, F. & WJM, M. Nanoparticles as magnetic resonance imaging contrast agents for vascular and cardiac diseases. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **3**, 146–161 (2011).

120. Ramirez-Carracedo, R. *et al.* Non-Invasive Detection of Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer EMMPRIN, a New Therapeutic Target against Atherosclerosis, Inhibited by Endothelial Nitric Oxide. *Int J Mol Sci* **19**, (2018).
121. Cuadrado, I. *et al.* EMMPRIN-Targeted Magnetic Nanoparticles for In Vivo Visualization and Regression of Acute Myocardial Infarction. *Theranostics* **6**, 545–557 (2016).
122. Helm, P. A. *et al.* Postinfarction myocardial scarring in mice: molecular MR imaging with use of a collagen-targeting contrast agent. *Radiology* **247**, 788–796 (2008).
123. Lipinski, M. J. *et al.* MRI to detect atherosclerosis with gadolinium-containing immunomicelles targeting the macrophage scavenger receptor. *Magn Reson Med* **56**, 601–610 (2006).
124. Gesser, B. *et al.* Identification of functional domains on human interleukin 10. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14620–14625 (1997).
125. López, M. N. *et al.* A synthetic peptide homologous to IL-10 functional domain induces monocyte differentiation to TGF- β + tolerogenic dendritic cells. *Immunobiology* **216**, 1117–1126 (2011).
126. Kurte, M. *et al.* A synthetic peptide homologous to functional domain of human IL-10 down-regulates expression of MHC class I and Transporter associated with Antigen Processing 1/2 in human melanoma cells. *J Immunol* **173**, 1731–1737 (2004).
127. Rossello, X. *et al.* CIBER-CLAP (CIBERCV Cardioprotection Large Animal Platform): A multicenter preclinical network for testing reproducibility in cardiovascular interventions. *Sci Rep* **9**, (2019).
128. Richwine, A. F., Sparkman, N. L., Dilger, R. N., Buchanan, J. B. & Johnson, R. W. Cognitive deficits in interleukin-10-deficient mice after peripheral injection of lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun* **23**, 794 (2009).
129. Nian, M., Lee, P., Khaper, N. & Liu, P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res* **94**, 1543–1553 (2004).
130. Saura, M., Zaragoza, C., Bao, C., McMillan, A. & Lowenstein, C. J. Interaction of interferon regulatory factor-1 and nuclear factor kappaB during activation of inducible nitric oxide synthase transcription. *J Mol Biol* **289**, 459–471 (1999).
131. Ponikowski, P. *et al.* 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* **37**, 2129–2200m (2016).
132. Sager, H. B. *et al.* Proliferation and Recruitment Contribute to Myocardial Macrophage Expansion in Chronic Heart Failure. *Circ Res* **119**, 853–864 (2016).
133. Sulo, G. *et al.* Ischemic heart failure as a complication of incident acute myocardial infarction: Timing and time trends: A national analysis including 78,814 Danish patients during 2000-2009. *Scand J Public Health* **48**, 294–302 (2020).

134. Schächinger, V. *et al.* Intracoronary infusion of bone marrow-derived mononuclear cells abrogates adverse left ventricular remodelling post-acute myocardial infarction: insights from the reinfusion of enriched progenitor cells and infarct remodelling in acute myocardial infarction (REPAIR-AMI) trial. *Eur J Heart Fail* **11**, 973–979 (2009).
135. Huang, S. & Frangogiannis, N. G. Anti-inflammatory therapies in myocardial infarction: failures, hopes and challenges. *Br J Pharmacol* **175**, 1377–1400 (2018).
136. Libby, P., Maroko, P. R., Bloor, C. M., Sobel, B. E. & Braunwald, E. Reduction of experimental myocardial infarct size by corticosteroid administration. *J Clin Invest* **52**, 599–607 (1973).
137. Xu, B., Strom, J. & Chen, Q. M. Dexamethasone induces transcriptional activation of Bcl-xL gene and inhibits cardiac injury by myocardial ischemia. *Eur J Pharmacol* **668**, 194–200 (2011).
138. McColl, A. *et al.* Glucocorticoids Induce Protein S-Dependent Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils by Human Macrophages. *The Journal of Immunology* **183**, 2167–2175 (2009).
139. Leferand, A. M. & Polansky, E. W. Beneficial effects of ibuprofen in acute myocardial ischemia. *Cardiology* **64**, 265–279 (1979).
140. Abbate, A. *et al.* Cyclo-oxygenase-2 (COX-2) inhibition reduces apoptosis in acute myocardial infarction. *Apoptosis* **11**, 1061–1063 (2006).
141. Straino, S. *et al.* Protective effects of parecoxib, a cyclo-oxygenase-2 inhibitor, in postinfarction remodeling in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* **50**, 571–577 (2007).
142. Gislason, G. H. *et al.* Risk of death or reinfarction associated with the use of selective cyclooxygenase-2 inhibitors and nonselective nonsteroidal antiinflammatory drugs after acute myocardial infarction. *Circulation* **113**, 2906–2913 (2006).
143. Brophy, J. M., Lévesque, L. E. & Zhang, B. The coronary risk of cyclo-oxygenase-2 inhibitors in patients with a previous myocardial infarction. *Heart* **93**, 189–194 (2007).
144. Bujak, M. *et al.* Interleukin-1 Receptor Type I Signaling Critically Regulates Infarct Healing and Cardiac Remodeling. *Am J Pathol* **173**, 57 (2008).
145. Abbate, A. *et al.* Interleukin-1 Blockade with Anakinra to Prevent Adverse Cardiac Remodeling After Acute Myocardial Infarction (Virginia Commonwealth University Anakinra Remodeling Trial [VCU-ART] Pilot Study). *Am J Cardiol* **111**, 1394 (2013).
146. Abbate, A. *et al.* Comparative safety of interleukin-1 blockade with anakinra in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction (from the VCU-ART and VCU-ART2 pilot studies). *Am J Cardiol* **115**, 288–292 (2015).
147. Pasqui, A. L. *et al.* Pro-inflammatory/anti-inflammatory cytokine imbalance in acute coronary syndromes. *Clin Exp Med* **6**, 38–44 (2006).
148. Yang, Z., Zingarelli, B. & Szabó, C. Crucial role of endogenous interleukin-10 production in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* **101**, 1019–1026 (2000).
149. Kwon, W. Y. *et al.* Interleukin-10 deficiency aggravates angiotensin II-induced cardiac remodeling in mice. *Life Sci* **146**, 214–221 (2016).

150. Hayward, R., Nossuli, T. O., Scalia, R. & Lefer, A. M. Cardioprotective effect of interleukin-10 in murine myocardial ischemia-reperfusion. *Eur J Pharmacol* **334**, 157–163 (1997).
151. Gupta, R. *et al.* IL-10 provides cardioprotection in diabetic myocardial infarction via upregulation of Heme clearance pathways. *JCI Insight* **5**, (2020).
152. Mälärstig, A. *et al.* Raised interleukin-10 is an indicator of poor outcome and enhanced systemic inflammation in patients with acute coronary syndrome. *Heart* **94**, 724 (2008).
153. Ni, S. H. *et al.* The pleiotropic association between IL-10 levels and CVD prognosis: Evidence from a meta-analysis. *Cytokine* **119**, 37–46 (2019).
154. Neumann, F. J. *et al.* Cardiac Release of Cytokines and Inflammatory Responses in Acute Myocardial Infarction. *Circulation* **92**, 748–755 (1995).
155. Debrunner, M. *et al.* Proinflammatory cytokines in acute myocardial infarction with and without cardiogenic shock. *Clinical Research in Cardiology* **97**, 298–305 (2008).
156. Vaddi, K., Nicolini, F. A., Mehta, P. & Mehta, J. L. Increased secretion of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by mononuclear leukocytes in patients with ischemic heart disease. Relevance in superoxide anion generation. *Circulation* **90**, 694–699 (1994).
157. Orlic, D. *et al.* Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10344–10349 (2001).
158. Minatoguchi, S. *et al.* Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. *Circulation* **109**, 2572–2580 (2004).
159. Sugano, Y. *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor attenuates early ventricular expansion after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res* **65**, 446–456 (2005).
160. Ince, H. *et al.* Preservation From Left Ventricular Remodeling by Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Use of Granulocyte-Colony-Stimulating Factor (FIRSTLINE-AMI). (2005) doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.541433.
161. Nienaber, C. A. *et al.* Effects of granulocyte-colony-stimulating factor on mobilization of bone-marrow-derived stem cells after myocardial infarction in humans. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **3 Suppl 1**, (2006).
162. Engelbertsen, D. *et al.* T-helper 2 immunity is associated with reduced risk of myocardial infarction and stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**, 637–644 (2013).
163. Szkodzinski, J. *et al.* Serum concentrations of interleukin-4 and interferon-gamma in relation to severe left ventricular dysfunction in patients with acute myocardial infarction undergoing percutaneous coronary intervention. *Heart Vessels* **26**, 399–407 (2011).
164. Shintani, Y. *et al.* IL-4 as a Repurposed Biological Drug for Myocardial Infarction through Augmentation of Reparative Cardiac Macrophages: Proof-of-Concept Data in Mice. *Sci Rep* **7**, 1–14 (2017).
165. Khurana Hershey, G. K. IL-13 receptors and signaling pathways: An evolving web. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **111**, 677–690 (2003).

166. Hofmann, U. *et al.* Interleukin-13 deficiency aggravates healing and remodeling in male mice after experimental myocardial infarction. *Circ Heart Fail* **7**, 822–830 (2014).
167. Takeda, K. & Akira, S. STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine Growth Factor Rev* **11**, 199–207 (2000).
168. Takeda, K. *et al.* Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3801 (1997).
169. Ahmed, S. T. & Ivashkiv, L. B. Inhibition of IL-6 and IL-10 signaling and Stat activation by inflammatory and stress pathways. *J Immunol* **165**, 5227–5237 (2000).
170. Melillo, J. A. *et al.* Dendritic cell (DC)-specific targeting reveals Stat3 as a negative regulator of DC function. *J Immunol* **184**, 2638–2645 (2010).
171. Murray, P. J. The primary mechanism of the IL-10-regulated antiinflammatory response is to selectively inhibit transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8686–8691 (2005).
172. el Kasmi, K. C. *et al.* General nature of the STAT3-activated anti-inflammatory response. *Journal of Immunology* **177**, 7880–7888 (2006).
173. Chen, H. *et al.* Stat5-dependent cardioprotection in late remote ischaemia preconditioning. *Cardiovasc Res* **114**, 679–689 (2018).
174. Cambier, L. *et al.* Y RNA fragment in extracellular vesicles confers cardioprotection via modulation of IL-10 expression and secretion. *EMBO Mol Med* **9**, 337–352 (2017).
175. el Kasmi, K. C. *et al.* Cutting edge: A transcriptional repressor and corepressor induced by the STAT3-regulated anti-inflammatory signaling pathway. *J Immunol* **179**, 7215–7219 (2007).
176. Williams, L., Bradley, L., Smith, A. & Foxwell, B. Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages. *J Immunol* **172**, 567–576 (2004).
177. Nakamura, R. *et al.* IL10-driven STAT3 signalling in senescent macrophages promotes pathological eye angiogenesis. *Nat Commun* **6**, (2015).
178. Yan, X. *et al.* Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* **62**, 24–35 (2013).
179. Jiang, J. *et al.* Macrophage Polarization in IL-10 Treatment of Particle-Induced Inflammation and Osteolysis. *Am J Pathol* **186**, 57–66 (2016).
180. Shames B D *et al.* Interleukin-10 stabilizes inhibitory kappaB-alpha in human monocytes. *Shock* **10**, 389–394 (1998).
181. Schottelius, A. J. G., Mayo, M. W., Balfour Sartor, R. & Baldwin, A. S. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J Biol Chem* **274**, 31868–31874 (1999).
182. Lowenstein, C. J. *et al.* Macrophage nitric oxide synthase gene: Two upstream regions mediate induction by interferon γ and lipopolysaccharide (NF- κ B/enhancer elements/tumor necrosis factor/transcription factors/interleukin). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9730–9734 (1993).

183. Yabluchanskiy, A., Ma, Y., Iyer, R. P., Hall, M. E. & Lindsey, M. L. Matrix Metalloproteinase-9: Many Shades of Function in Cardiovascular Disease. *Physiology* **28**, 391 (2013).
184. Parajuli, N., Yuan, Y., Zheng, X., Bedja, D. & Cai, Z. P. Phosphatase PTEN is critically involved in post-myocardial infarction remodeling through the Akt/interleukin-10 signaling pathway. *Basic Res Cardiol* **107**, (2012).
185. Gough, P. J., Gomez, I. G., Wille, P. T. & Raines, E. W. Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* **116**, 59–69 (2006).
186. Lee, Y. S., Tran, H. T. L. & Quang, V. T. Regulation of expression of matrix metalloproteinase-9 by JNK in Raw 264.7 cells: presence of inhibitory factor(s) suppressing MMP-9 induction in serum and conditioned media. *Exp Mol Med* **41**, 259–268 (2009).
187. Mak, I. W. Y., Evaniew, N. & Ghert, M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am J Transl Res* **6**, 114 (2014).

Anexo

Article

NIL10: A New IL10-Receptor Binding Nanoparticle That Induces Cardiac Protection in Mice and Pigs Subjected to Acute Myocardial Infarction through STAT3/NF- κ B Activation

Laura Tesoro ^{1,2}, Ignacio Hernández ^{1,2}, Rafael Ramírez-Carracedo ^{1,2}, Javier Díez-Mata ¹, Nunzio Alcharani ¹, Beatriz Jiménez-Guirado ¹, Karina Ovejero-Paredes ^{3,4,5}, Marco Filice ^{3,4,5}, Jose Luis Zamorano ^{2,6}, Marta Saura ^{2,7}, Carlos Zaragoza ^{1,2,*} and Laura Botana ^{1,2,*}

- ¹ Unidad de Investigación Cardiovascular, Departamento de Cardiología, Hospital Ramón y Cajal (IRYCIS), Universidad Francisco de Vitoria, 28034 Madrid, Spain
 - ² Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), 28029 Madrid, Spain
 - ³ Departamento de Química, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense (UCM), 28040 Madrid, Spain
 - ⁴ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERRES), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), 28029 Madrid, Spain
 - ⁵ Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), 28029 Madrid, Spain
 - ⁶ Departamento de Cardiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal (IRYCIS), 28034 Madrid, Spain
 - ⁷ Unidad de Fisiología, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá, 28871 Madrid, Spain
- * Correspondence: c.zaragoza.prof@ufv.es (C.Z.); laura.botana@ufv.es (L.B.)



Citation: Tesoro, L.; Hernández, I.; Ramírez-Carracedo, R.; Díez-Mata, J.; Alcharani, N.; Jiménez-Guirado, B.; Ovejero-Paredes, K.; Filice, M.; Zamorano, J.L.; Saura, M.; et al. NIL10: A New IL10-Receptor Binding Nanoparticle That Induces Cardiac Protection in Mice and Pigs Subjected to Acute Myocardial Infarction through STAT3/NF- κ B Activation. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 2044. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102044>

Academic Editor: Yasumasa Ikeda

Received: 4 July 2022

Accepted: 16 September 2022

Published: 26 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: (1) Background: Early response after acute myocardial infarction (AMI) prevents extensive cardiac necrosis, in which inflammation resolution, including expression of anti-inflammatory interleukin-10 (IL-10), may play a key role. (2) Methods: We synthesized NIL10, a micelle-based nanoparticle, to target IL-10 receptor in mice and pigs subjected to AMI. (3) Results: Administration of NIL10 induced cardiac protection of wild-type and IL-10 knockout mice and pigs subjected to AMI. Cardiac protection was not induced in IL-10-receptor null mice, as shown by a significant recovery of cardiac function, in which inflammatory foci and fibrosis were strongly reduced, together with the finding that resolving M2-like macrophage populations were increased after day 3 of reperfusion. In addition, anti-inflammatory cytokines, including IL-4, IL-7, IL-10, IL-13, IL-16, and IL-27 were also elevated. Mechanistically, NIL10 induced activation of the IL-10 receptor/STAT-3 signaling pathway, and STAT3-dependent inhibition of nuclear translocation of pro-inflammatory NF- κ B transcription factor. (4) Conclusions: Taken together, we propose using NIL10 as a novel therapeutic tool against AMI-induced cardiac damage.

Keywords: acute myocardial infarction; interleukin-10; nanoparticles; STAT-3; NF- κ B

1. Introduction

Cardiovascular diseases, including acute myocardial infarction (AMI), are the most frequent cause of death in the world [1]. AMI remains the commonest origin of heart failure (HF), which conditions long-term life quality and may result in the death of the patient [2–4].

Following an ischemic event, the lack of oxygen and nutrients in the heart triggers an inflammatory response. Necrotic cardiomyocytes release signals that stimulate innate immune signaling, then cell mobilization to the damaged area begins, and, finally, anti-inflammatory signaling leads to the replacement of necrotic myocardial tissue by the formation of a fibrotic scar [5]. Even though inflammation is a critical component of tissue healing, currently, more contributions point towards a prolonged inflammatory response

2. Comunicaciones orales presentadas en congresos internacionales asociadas al proyecto de investigación



American Heart Association® Basic Cardiovascular Sciences

[Print this Page for Your Records](#)

[Close Window](#)

Control/Tracking Number: 2022-A-598-AHA-BCVS

Activity: Abstract

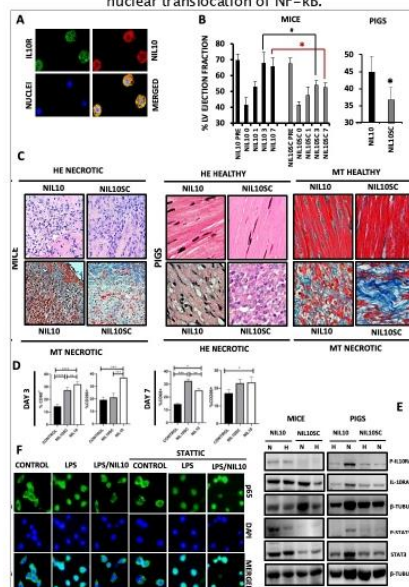
Current Date/Time: 3/23/2022 3:40:25 PM

Ni10: A Newly Synthesized Nanoparticle That Reduces Inflammation And Preserves Heart Function In Murine And Porcine Models Of Acute Myocardial Infarction

Author Block: Laura Tesoro, Univ Francisco de Vitoria, Pozuelo De Alarcon, Spain; Laura Botana, Madrid; Ignacio Hernandez Navarro, Univ Francisco de Vitoria, Pozuelo de Alarcon, Spain; Rafael Ramirez-Carracedo, Univ Francisco de Vitoria, Pozuelo de Alarcon, Spain, Las Rozas; Jose L Zamorano, Hosp Ramon y Cajal, Madrid, Spain; Marta Saura, Univ de Alcalá, Alcalá De Henares, Spain; Carlos Zaragoza, Univ Francisco de Vitoria, Pozuelo De Alarcon

Abstract:

Introduction: Interleukin-10 (IL-10) has long been recognized as a key anti-inflammatory cytokine, whose expression is associated to macrophage polarization towards resolution after acute myocardial infarction. **Hypothesis:** Targeting the IL10 receptor (IL10R) in patients undergoing AMI, may represent a new strategy to improve cardiac function and inflammation resolution after cardiac ischemia/reperfusion. After confirmation of NIL10 (conjugated with Rhodamine) co-localization to IL-10R, as detected by immunohistochemistry (Fig. 1A), intravenous administration of 1 mg/kg NIL10 in mice and pigs subjected to AMI, efficiently decreased left ventricle fibrosis and significantly improved left ventricle ejection fraction (LVEF), by day 7 after injection, when compared to animals injected with, NIL10SC, a nanoparticle control (Fig. 1B-C). As expected, NIL10 induced macrophage polarization towards M2-like macrophages after day 3 of reperfusion (Fig D), by at least promoting IL-10R activity, as shown by increased phosphorylation of IL-10R and the downstream STAT3 in the necrotic area of the heart (Figure 1E). STAT3-dependent inflammation inhibition was assayed by administration of 50µM NIL10 in RAW-247 cells stimulated with 500 µM LPS, in which nuclear translocation of NF-κB was significantly reduced (Fig. 1E) by at least phosphorylation of I-κB-α. **Conclusions:** Our findings show NIL10 as a new tool to improve cardiac function in hearts under AMI, at least through inhibition of STAT3-induced nuclear translocation of NF-κB.



Category (Complete): 15. Myocardial Ischemia, Oxidative Stress, and Cardioprotection

Keywords (Complete): Cardioprotection ; Cell signaling ; Myocardial infarction

Awards (Complete):

Select Award for application : Not applying for an award

Presentation Preference (Complete): Oral or Poster

Additional Info (Complete):

*How did you FIRST become aware of submitting abstracts for BCVS 2022?: B. E-Mail invitation

*Are you an AHA member?: No

*Has this research received full or partial funding from the American Heart Association?: No

*Please Select: There are no unlabeled/unapproved uses of drugs or products.

*: Yes

Twitter Handle : @yomolomas1

3. Patentes presentadas

PREVENTION AND/OR TREATMENT OF CARDIAC DAMAGE

FIELD OF THE INVENTION

The present invention refers to the medical field. Particularly, the present invention refers to a peptide, comprising or consisting of SEQ ID NO: 1 (CAYMTMKIRN), for use as a medicament, preferably in the prevention and/or treatment of cardiac damage arising after ischemia followed by reperfusion, or in the prevention and/or treatment of the inflammatory response following acute myocardial infarction. In a preferred embodiment, the peptide is conjugated with a nanoparticle.

STATE OF THE ART

Cardiovascular diseases, including acute myocardial infarction (AMI), are the most frequent cause of death in the world. AMI remains the commonest origin of heart failure (HF), which conditions long-term life quality and may end up to the death of the patient. Following an ischemic event, the lack of oxygen and nutrients in the tissue triggers the activation of inflammation. First, necrotic cardiomyocytes release danger signals that stimulate innate immune signalling, then cell mobilization begins to the damaged area and finally, anti-inflammatory signalling led to replacement by a fibrotic scar formation. Even though inflammation is a critical component of tissue healing, currently more contributions point towards a prolonged inflammatory response can compromise myocardial structure and function due to an adverse left ventricle remodelling, causing HF.

There is an unmet medical need of finding reliable strategies focused on the prevention and/or treatment of cardiac damage arising after ischemia followed by reperfusion, or in the prevention and/or treatment of the inflammatory response following acute myocardial infarction. The present invention is focused on solving this problem and an innovative therapeutic strategy is herein provided.

DESCRIPTION OF THE INVENTION

Brief description of the invention

The present invention refers to a peptide, comprising or consisting of SEQ ID NO: 1 (CAYMTMKIRN), for use as a medicament, preferably in the prevention and/or

treatment of cardiac damage arising after ischemia followed by reperfusion, or in the prevention and/or treatment of the inflammatory response following acute myocardial infarction. In a preferred embodiment, the peptide is conjugated with a nanoparticle.

It is common general knowledge that early response after AMI is crucial for adequate resolution of inflammation and prevention of adverse cardiac remodelling. Macrophages orchestrate the overall inflammatory process from initiation to resolution, making them crucial cells in the development and progression of AMI.

The inventors of the present invention propose the use of a peptide analogue of Interleukin-10 (IL-10), with sequence SEQ ID NO: 1 (CAYMTMKIRN), preferably a nanoparticle conjugated with the peptide (NIL10), to target the IL-10-receptor in subjects exposed to ischemia/reperfusion (IR). Administration of 1 mg/kg NIL10 24 hours after IR in mice, induced a functional recovery of the left ventricle ejection fraction (LVEF) by days 3 and 7 after IR, when compared to the levels found in mice injected with NIL10SC, a nanoparticle conjugated with the same peptide in a scrambled orientation, in which the number of inflammatory foci and cardiac fibrosis was increased. In the same way, in mice deficient for IL10 subjected to IR, NIL10 also induced a functional recovery of the LVEF, while in IL10 receptor null mice, NIL10 did not show signs of improvement. The same level of cardioprotection was obtained by administration of 1 mg/kg NIL10 in pigs under IR, as detected by a reduction in the LVEF and the area of necrosis. To test whether NIL10 may participate in macrophage polarization, the inventors of the present invention injected 1 mg/kg NIL10 in pigs subjected to IR, in which M2 macrophage populations were significantly increased by day 3 post IR, when compared to the levels found in pigs injected with the same dose of NIL10SC, detecting that anti-inflammatory cytokines, including IL4, IL7, IL10, IL13, IL16 and IL27 resulted increased in mice and in pigs injected with NIL10. To test for the downstream effect of NIL10, the inventors found in both species that NIL10 induced activation of the STAT3 signalling pathway, and STAT3-dependent inhibition of NF- κ B nuclear translocation, as detected accumulation of nuclear p65 by incubating RAW 264.7. macrophages with NIL10 and STAT3IC, a pharmacological inhibitor of STAT3.

In conclusion, administration of NIL10 induces cardiac protection in mice and pigs subjected to IR, by inducing polarization towards M2 resolving macrophages, at least through inhibition of STAT3-induced proinflammatory inhibition of NF- κ B nuclear translocation.

Thus, the first embodiment of the present invention refers to a peptide comprising or consisting of SEQ ID NO: 1 (CAYMTMKIRN) (hereinafter “peptide of the invention”) for use as a medicament.

In a preferred embodiment, the present invention refers to the peptide of the invention for use in the prevention and/or treatment of cardiac damage arising after ischemia followed by reperfusion or in the prevention and/or treatment of the inflammatory response following acute myocardial infarction.

In a preferred embodiment, the peptide of the invention is conjugated with a nanoparticle.

The nanoparticles used according to the present invention have a least 3 characteristics:

1. They have a PEG coating that improves the colloidal properties in blood stream, reduces the opsonization and, thus, enhances the pharmacodynamic and pharmacokinetic of the nanoparticles.
2. They comprise a dye, for instance rhodamine, which allows the visualization of the nanoparticle by *in vivo* fluorescence molecular imaging.
3. They comprise a chemical compound, such as gadolinium, which allows the detection of the nanoparticle *in vivo*, non-invasively, by nuclear magnetic resonance molecular imaging. This confers to the compound of the invention the possibility to be used in a patient without the need for an invasive procedure (cardiac biopsy or other invasive treatment) to visualise its effect with enhanced resolution.

It is important to note that, in order to obtain the required physical properties of the nanoparticles of the invention, and in order to reach the optimal colloidal characteristics that are a crucial parameter for their *in vivo* application in the prevention and/or treatment of cardiac damage, the size and polydispersity (PDI) of nanoparticles must be improved. To this end, such as it is indicated in **Example 1.9**, after the synthesis and characterization of the nanoparticles, an emulsification-mediated post processing was carried out. After that, a specific characterization was carried out to confirm the desired size (comprised between 100 and 150 nm in hydrodynamic size) and PDI (lower than 0.3) values reduction. Moreover, in order to finely modulate the biological activity, it is important also to control the density of the ligand (in term of ratio between peptide per lipid amounts) exposed on nanoparticles surface. This aspect was elucidated by HPLC analysis. As general consideration, depending on the application and on the ligand class, for biomedical application this $\text{mg}_{\text{ligand}}/\text{mg}_{\text{lipid}}$ ratio is expected to be comprised between

1:5 (highest ligand density) and 1:15 (lowest ligand density), being 1:10 the desired value. In this case, after HPLC characterization, the $\text{mg}_{\text{ligand}}/\text{mg}_{\text{lipid}}$ ratio was estimated as 1:8 and 1:9 for NIL10 and NIL10SC, respectively.

The second embodiment of the present invention refers to a nanoparticle (hereinafter “*nanoparticle of the invention*”) conjugated with a peptide comprising or consisting of SEQ ID NO: 1 (CAYMTMKIRN).

The third embodiment of the present invention refers to the nanoparticle of the invention for use as a medicament.

In a preferred embodiment, the present invention refers to the nanoparticle of the invention for use in the prevention and/or treatment of cardiac damage arising after ischemia followed by reperfusion or in the prevention and/or treatment of the inflammatory response following acute myocardial infarction.

The fourth embodiment of the present invention refers to a pharmaceutical composition which comprises a peptide comprising or consisting of SEQ ID NO: 1, or a nanoparticle conjugated with the peptide and, optionally, pharmaceutically acceptable excipients or carriers.

The fifth embodiment of the present invention refers to a nanoparticle conjugated with a peptide consisting of SEQ ID NO: 1, characterized in that the nanoparticle size is comprised between 100 and 150 nm, the Polydispersity Index (PDI) is lower than 0.3 and the ratio between the total amount of the peptide and the total amount of lipids in the nanoparticle is comprised within 1:5 and 1:15. In other words, there would be 1 peptide for every 5 to 15 lipids in the nanoparticle.

In a preferred embodiment, the nanoparticle conjugated with a peptide consisting of SEQ ID NO: 1 comprises a PEG coating and maleimide linking point, to enhance the pharmacokinetic properties and to enable the linking of SEQ ID NO: 1 peptide, respectively. In a preferred embodiment, the nanoparticle conjugated with a peptide consisting of SEQ ID NO: 1 comprises a dye which allows the visualization of the nanoparticle by fluorescence imaging.

In a preferred embodiment, the nanoparticle conjugated with a peptide consisting of SEQ ID NO: 1 comprises a chemical compound or radioisotopes which allows the detection of the nanoparticle by *in vivo* molecular imaging techniques.

The sixth embodiment of the present invention refers to the nanoparticle conjugated with a peptide consisting of SEQ ID NO: 1, as defined in any of the above embodiments, for use as a medicament, for use in the prevention and/or treatment of cardiac damage arising after ischemia followed by reperfusion, or for use in the prevention and/or treatment of the inflammatory response following acute myocardial infarction.

The seventh embodiment of the present invention refers to a pharmaceutical composition comprising the nanoparticle conjugated with a peptide consisting of SEQ ID NO: 1 of any of the above embodiments, and, optionally, pharmaceutically acceptable excipients or carriers.

The eighth embodiment of the present invention refers to the above defined pharmaceutical composition for use in the prevention and/or treatment of cardiac damage arising after ischemia followed by reperfusion or for use in the prevention and/or treatment of the inflammatory response following acute myocardial infarction.

Alternatively, the present invention refers to a method for the prevention and/or treatment of cardiac damage arising after ischemia followed by reperfusion, or for the prevention and/or treatment of the inflammatory response following acute myocardial infarction, which comprises the administration of a therapeutically effective dose or amount of the peptide or nanoparticle of the invention.

For the purpose of the present invention the following terms are defined:

- The term "comprising" is meant including, but not limited to, whatever follows the word "comprising". Thus, use of the term "comprising" indicates that the listed elements are required or mandatory, but that other elements are optional and may or may not be present.
- By "consisting of" is meant including, and limited to, whatever follows the phrase "consisting of". Thus, the phrase "consisting of" indicates that the listed elements are required or mandatory, and that no other elements may be present.
- By "therapeutically effective dose or amount" is intended an amount that, when administered as described herein, brings about a positive therapeutic response in the patient. The exact amount required will vary from subject to subject, depending on (non-exhaustive list): the species, age, general condition of the subject, the severity of the condition being treated or the mode of administration. An appropriate "effective" amount in any individual case may be determined by one of ordinary skill

in the art using routine experimentation, based upon the information provided herein.

- The term "nanoparticle", as used in the present invention, refers to any particle that has at least one of its dimensions smaller than about 1000 nm. The person skilled in the art is able to obtain nanoparticles according to the needs. The diameter of the nanoparticles can be about 5 nm or 10 nm or 20 nm or 30 nm or 40 nm or 50 nm or 60 nm or 70 nm or 80 nm or 90 nm or 100 nm or 200 nm or even larger.

Description of the figures

Figure 1. NIL10 binds to IL-10R in RAW 264.7 cells. **A.** Nanoparticle composition of NIL10 and NIL10SC. **B.** Z-potential, longitudinal and transversal relaxivities of NIL10 and NIL10SC nanoparticles. **C.** Bright field and confocal microscopy sections of RAW 264.7 macrophages, detecting rhodamine (red) containing NIL10 nanoparticles. **D,E** Colocalization of NIL10 (**D**) (rhodamine, red) or NIL10SC (**E**) with IL-10R (FICT, green) in confocal microscopy sections of RAW 264.7 cells incubated with NIL10 and anti-IL-10R specific antibody. Merged panel show co-localization of both signals. Nuclei were stained with Hoechst. Right panel: colocalization analysis with Image J co-localization plugin software, in which white dots correspond to co-localization (N=3).

Figure 2. NIL10 organ biodistribution. Confocal microscopy detection of NIL10 and NIL10SC in heart, liver, kidney pancreas, spleen and lung sections of healthy animals (N=10 mice/group).

Figure 3. NIL10 induces cardiac protection in mice subjected to IR. **A.** Outline of the proceedings performed. **B.** Representative electrocardiogram, showing ST-elevation after LAD occlusion. **C.** Left ventricle ejection fraction (LVEF) of wild type mouse hearts at the times indicated after IR and injected with NIL10 or NIL10SC as in A. N=10 mice/group. Results expressed as mean \pm SD. *P<0.03 NIL10 vs NIL10SC day 7. #P<0.05 NIL10 vs NIL10SC day 3. **D.** LVEF in IL-10 knockout mice. N=10 mice/group. Results expressed as mean \pm SD. *P<0.01 NIL10 vs NIL10SC day 7. #P<0.05 NIL10 vs NIL10SC day 3. **E.** LVEF in IL-10 receptor knockout mice. N=10 mice/group. Results expressed as mean \pm SD.

Figure 4. Hematoxylin and Eosine staining of mouse hearts. Heart sections of mice subjected to IR and injected with NIL10 or NIL10SC and collected by days 3 (**A**) or 7 (**B**) after IR. N=10 mice/group. From left to right: 2X, 20X, 40X. *P<0.05 D3; **P<0.01 D7.

Figure 5. NIL10 reduce heart fibrosis in response to IR. A. Representative immunoblot of MMP9 from healthy (H) or necrotic (N) areas of mouse hearts after 7 days of IR and injected with NIL10 or NIL10SC. N= 10 mice/group. Mean \pm SD. *P<0.001 NIL10 vs NIL10SC necrotic areas. **B.** Masson Trichrome staining of heart sections from mice injected with NIL10 or NIL10SC, after 3- or 7-days post IR (N=10 mice/group). *P<0.05 D3; **P<0.03 D7.

Figure 6. NIL10 induces cardiac protection in pigs subjected to IR. A. Evans blue/TTC staining (see methods for details) of pig heart sections (from apex to base) after 7 days of IR, showing healthy tissue (blue), the area at risk (red) and the necrotic areas (white). **B.** Measurement of necrotic areas of the hearts, represented as a percentage respect to the area at risk (Mean \pm SD. *P<0.001 NIL10 vs NIL10SC, at day 7 post IR). **C.** Left ventricle ejection fraction of hearts from pigs injected with NIL10 or NIL10SC after 7 days of IR (Mean \pm SD. *P<0.001 NIL10 vs NIL10SC). **D.** Hematoxylin and Eosin staining of healthy and necrotic heart sections from pigs injected with NIL10 or NIL10SC after 7 days of IR. **E.** Masson Trichrome staining of the same hearts as in D. (N=10 pigs/group).

Figure 7. NIL10 induces M2 macrophage polarization in the hearts of mice subjected to IR. A. Flow cytometry analysis of macrophage populations in mouse hearts after 3 and 7days of IR. The percentage of M2 CD68⁺/CD206⁺ population were selected from the necrotic and at-risk areas of the hearts. **B.** Gating strategy used to identify macrophage-cell subsets in the health and infarcted mouse heart. A sequential getting strategy was first used to identify M2 population expressing specific macrophage marker CD68, followed by the identification of the population with overlapping expression patterns (CD68/CD206) (N=10 mice/group). Differences between groups were compared using one-way ANOVA. **P<0.01. *** P<0.001. ****P<0.0001.

Figure 8. NIL10 induces the expression of resolving cytokines. **A.** Cytokine array used in the study. **B.** Clustered heat map of the differentially expressed cytokines in mice. **C.** Clustered heat map of the differentially expressed cytokines in pigs. Red arrows indicated anti-inflammatory cytokines.

Figure 9. NIL10 induces phosphorylation of IL10RA and STAT3. **A.** Immunoblot detection of P-IL10-RA (upper), and total IL-10-RA in the healthy (H) and necrotic (N) areas of mouse hearts at day 7 after IR ($P < 0.04$ NIL10 vs NIL10SC necrotic areas). **B.** Immunoblot detection of P-STAT3, and total STAT3 in the same protein extracts. $N = 10$ mice/group. Results expressed as Mean \pm SD ($P < 0.05$ NIL10 vs NIL10SC necrotic areas).

Figure 10. NIL10 induces phosphorylation of IL10RA and STAT3. **A.** Immunoblot detection of P-IL10-RA (upper), and total IL10-RA in the healthy (H) and necrotic (N) areas of pig hearts at day 7 after IR ($P < 0.05$ NIL10 vs NIL10SC necrotic areas). **B.** Immunoblot detection of P-STAT3, and total STAT3 in the same protein extracts. $N = 10$ pigs/group. Results expressed as Mean \pm SD ($P < 0.005$ NIL10 vs NIL10SC necrotic areas).

Figure 11. NIL10 prevents nuclear translocation of NF- κ B through STAT3 activation in RAW 264.7 macrophages. **A.** Confocal microscopy detection of NF- κ B (p65) in RAW 264.7 cells stimulated with 500 μ M LPS or in combination with NIL10. Nuclei were stained with DAPI. **B.** Immunoblot detection of P-I κ B- α in RAW 264.7 cells treated with NIL10 or NIL10SC. ($N = 3$, results expressed as Mean \pm SD. $*P < 0.05$ LPS/NIL10 vs LPS/NIL10SC). **C.** Confocal microscopy detection as in A, in which STAT3 inhibitor, STATIC, a pharmacological inhibitor of STAT3 was incubated. Arrows point nuclear or cytoplasmic localization of p65. Lower panels: immunoblot detection of iNOS in cells as in C. ($N = 3$, results expressed as Mean \pm SD. $*P < 0.03$ LPS vs LPS/NIL10 $**P < 0.05$ LPS/STATIC vs LPS/NIL10SC/STATIC. $***P < 0.001$ NIL10/STATIC vs LPS/NIL10/STATIC).

Detailed description of the invention

The present invention is illustrated by means of the Examples set below without the intention of limiting its scope of protection.

Example 1. Material and Methods

Example 1.1. Reagents and Equipment

Hematoxylin-eosin (HE), Trichrome Masson staining reagents, Triphenyl tetrazolium chloride (TTC), Evans Blue and fetal bovine serum (FBS) were from Merck (St Louis, MO, USA). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse secondary antibody and liquid 3,3'-diaminobenzidine (DAB) substrate were from Dako (Santa Clara, CA). Anti-IL10RA antibody (ab225820) was from Abcam (Cambridge, UK), Proteome Profiler Mouse Cytokine Array Kit (ARY006) and Proteome Profiler Human Cytokine Array Kit (ARY005B) was from R&D Systems (Minneapolis, MN), ketamine was from Pfizer (New York, NY, US), isoflurane was from Abbvie (North Chicago, IL, US), propofol was from Fresenius (Bad Homburg, Germany), fentanyl was from Kern Pharma (Madrid, Spain), diazepam was from Roche (Basel, Switzerland), and the amiodarone was from Sanofi Aventis (Gentilly, France).

The following is a list of the most common equipment used for this investigation: 5415R Refrigerated Centrifuge was from Eppendorf (Hamburg, Germany). The chemiluminescence imaging system Fusion Solo-S and the image analysis software Fusion-Capt were from Vilber-Lourmat (Eberhardzell, Germany). TCS-SP5 Confocal Microscope was from Leica (Wetzlar, Germany). The microplate reader was from Biotek (Winooski, VT). NanoDrop OneSpectrophotometer was from Thermo Scientific (Waltham, MA). Guiding catheters, angioplasty balloons and catheter introducers were from Cordis (Miami, FL). Diagnostic and steerable guidewires were from Boston Scientifics (Malborough, MA). The balloon inflation devices and midazolam were from B.Braun (Melsungen, Germany).

Example 1.2. Animal Model of Coronary Ischemia/Reperfusion

All the surgical procedures were performed in the Experimental Surgery Department of the Hospital Universitario La Paz (Madrid, Spain) in conforming to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1985), and the Animal Welfare Ethics Committee

and complied with the EU Directive on experimental animals (63/2010 EU) and related Spanish legislation (RD 53/2013).

20 male Yorkshire pigs (30 ± 4 kg) were housed 1 week preceding the surgery to avoid unease or stress associated with the new environment. Prior to the surgical intervention, animals were anesthetized with intramuscular ketamine 10 mg/kg and midazolam 0.5 mg/kg.

Anesthesia was induced by inhaled sevoflurane and maintained with continuous infusion of propofol 2 mL/kg/h, fentanyl 50 μ g/kg/h, and diazepam 10 μ g/kg/h. After intubation and mechanical ventilation with 100% oxygen saturation, 5000 IU of heparin and amiodarone 2 mg/kg/h was administered to avoid blood clotting of catheters and malignant cardiac arrhythmias, respectively. Preceding the complete occlusion, hearts were submitted to ischemic preconditioning by blocking the LAD for short periods (1, 3, and 5 minutes each). Ischemia/reperfusion was produced by occluding LAD for 45 minutes using a JL3 6F catheter and an angioplasty balloon. The complete myocardial ischemia was confirmed by ST-segment elevation. Then, the balloon was removed to reopen the artery. Animals received NIL10 or NIL10SC (0.1 mg/kg) 24h hours post-ischemia. Blood was extract before and after the procedure, 3 days post-ischemia and at final point. After 7 days of reperfusion, animals were sacrificed to extract the heart, spleen, kidney, lung, liver and pancreas. This samples were included in 4% formalin and other samples of the heart were immediately frozen at -80°C to protein analyses.

20 male twelve-week-old wild type, IL10 knock-out and IL10RA knock-out mice C57/BL6 were anesthetized by inhaled 3% sevoflurane and oxygen with a flow rate of 0.4 L/min until loss of righting reflex. Then, endotracheal intubation was perform using an intubation cannula in order to carry out artificial ventilation (tidal volume: 260 μ L/stroke, ventilation rate: 130 strokes per minute). The fourth left intercostal space was opened and widened using chest mice retractors. Left ventricle was exposed and LAD was occluded for 30 min close by using a 6-0 silk suture and 1 mm tube. Reperfusion was performed by ligation release. After the procedure, the chest was closed, negative pressure restored, and the skin sutured. At the reperfusion time of 24 hours, NIL10 was venous-administrated. Animals were sacrificed at day 3, 7 or 21 to extract the organs and process the samples. NIL10SC-treated animals were included in the assays as control, in which the same procedure was performed.

Example 1.3. Echocardiography

Vivid Q ultrasound system from GE Healthcare (General Electric, Chicago, IL, USA), equipped with a 1.9-4 MHz scan head was used to determine LV function using a. Parasternal long and short-axis-view images of the heart were taken prior to the surgery, at the end of ischemia, and at the endpoint to determine LV function worsening and recovery. The parameters studied using the on-site software cardiac package were: systolic and diastolic interventricular septum thickness (IVS), systolic and diastolic left-ventricle internal diameter (LVID), systolic and diastolic left-ventricle posterior wall thickness (LVPW), left-ventricle ejection fraction (EF), left ventricle shortening fraction (FS), heart rate (HR), cardiac output (CO) and left ventricle ejection fraction (LVEF). Data acquisition and analysis were performed by the same operator to avoid the inter-observer error.

Example 1.4. Histology

Blue/TTC staining in pigs: 7 days after the surgery, the LAD was reoccluded in the same location as day 0, following the same method described before. Then, 200 mL of 5% Evans Blue solution was injected using a 5F fenestrated Pigtail catheter within the left ventricle, to distribute the compound across the entire cardiovascular system, excepting the blood-deprived area of the heart. After 2 minutes, the animal was sacrificed, and the heart extracted to be frozen at -20°C for 24 hours. The next day, hearts were cut into 0.8 cm slices and incubated in 1% TTC for 20 minutes at 37°C and next in 10% Paraformaldehyde solution. The necrotic area was relativized to the area at risk to avoid inter-experiment variability concerning the ischemic area.

Heart morphology was visualized by Hematoxylin/Eosin staining and collagen deposition was detected by Masson's trichrome staining in mice and pigs.

Example 1.5. Confocal Microscopy

Paraffin embedded 0,5 µm heart sections were incubated with anti-CD68 and anti-CD206 (diluted 1:500 in PBS 1.5% BSA) primary antibody overnight at 4C. Slides were washed three times with PBS and mounted in PBS media, containing Hoechst for nuclei visualization. Images were taken using a Leica TCS SP5 confocal microscope. At least three different fields per condition were obtained.

Example 1.6. Immunoblotting

Proteins from healthy and infarcted area of the heart of pigs and mice were extracted to measure MMP-9, IL10-RA, PHOSPHO-IL10-RA, STAT3 and PHOSPHO-STAT3 expression. 20 µg of total protein were loaded into 10% - 7,5% polyacrylamide gels. After the electrophoresis, proteins were transferred to PVDF membranes and blocked with 3% BSA in T-TBS. Membranes were incubated for 1 hour with primary antibody 1:1000 and anti-Rabbit HRP-conjugated secondary antibody 1:3000. Then, protein bands were visualized by chemiluminescence and studied using image analysis software.

Example 1.7. Peptide and Nanoprobe composition

- Peptide IT9302 (SEQ ID NO: 1): CAYMTMKIRN
- Peptide IT9302-scrambled: CANYRMITKM

Example 1.8. Nanoparticles preparation

The paramagnetic nanoparticles were prepared by the lipid film hydration method. In brief, a film was prepared by rotary evaporation of Gd-DTPA-bis (GdDTPA-BSA), 1,2-distearoyl- sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy (polyethylene glycol)-2000] (DSPE- PEG2000), DSPE-PEG2000-maleimide, and Rhodamine-PE, in a molar ratio 50:39:1:10, dissolved in a mixture of chloroform/methanol (4:1 v/v). The lipid film was hydrated with HEPES buffer, pH 6.7, and 150 mM NaCl, and the solution was rotated at 65°C for 1 hour. NIL10 and the corresponding scrambled peptides NIL10SC were modified by adding a terminal cysteine residue (**Figure 1**) to bind to the maleimide moiety at a molar ratio 1:40 (nanoparticle: peptide). Uncoupled peptides were separated with centrifuge concentrators of 100 kDa. Physical and chemical properties, including Zeta-potential, nanoparticle size (calculated as hydrated diameter with dynamic laser light scattering (DSL, Malvern Zetasizer)), nanoparticle morphology (visualized with transmission microscopy (TEM)), longitudinal and transverse relaxivities (Minispec mq relaxometer, Bruker), were calculated. Longitudinal relaxivities were evaluated by using inversion recovery sequences with 15 inversion times. Transverse relaxivities were calculated from spin-echo images and different echo times. In both cases, a series of images with different T1 and T2 weighting were generated. The r1 and r2 values were estimated from the slope of longitudinal and transverse relaxation rates vs Gd-DTPA amount per nanoparticle.

Example 1.9. Improvement of physical properties of peptide-modified nanoparticles

To improve the physical properties of peptide-modified nanoparticles and to reach the optimal colloidal characteristics that are required for their in vivo application (or the prevention and/or treatment of cardiac damage), the size and polydispersity (PDI) of nanoparticles must be improved. To this scope, an emulsification-mediated post processing was carried out. Therefore, after their synthesis and characterization, the nanoparticles described in **Example 1.8** were homogenized three times with an Emulsiflex®-B15 (Avestin) emulsifier by setting the working pressure to 80 psi/5.5 bar. After that, the DLS characterization was carried out to confirm the desired size (comprised between 100 and 150 nm in hydrodynamic size) and and PDI values reduction (lower than 0.3). Furthermore, even the peptide amount bound per mg of lipid was characterized by HPLC analysis and following this protocol: mobile phase 75% water, 25% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid, column Gemini® 5 µm NX-C18 110 Å column, room temperature, λ : 220 nm. The $\text{mg}_{\text{peptide}}/\text{mg}_{\text{lipid}}$ ratio was estimated between 1:5 and 1:15, preferably 1:8 and 1:9 for NIL10 and NIL10SC, respectively.

Example 1.10. Blood collection and plasma isolation

Animal blood samples were collected in buffer Sodium-Citrate tubes (363086) and EDTA tubes (367861) from a retro-orbital bleed in mice or from femoral venous in pigs respectively and were from BD Vacutainer (Franklin Lakes, NJ, US). Plasma was isolated from blood spun at 400g for 10 minutes. Plasma not used immediately was stored at -20°C .

Example 1.11. Cytokine and chemokine determinations

We detected a total of 36 human cytokines, chemokines, and acute phase proteins simultaneously from the serum of pigs and mice at the times indicated, by using the ProteomeProfiler Cytokine Array Kit (RD Systems, Minneapolis, MN) a membrane-based antibody array for the parallel determination of the relative levels of selected human cytokines and chemokines.

Example 1.12. Single-cell suspension for flow cytometry

Whole mouse hearts were mashed in complete DMEM (10% FBS, penicillin/streptomycin) through a 100-µm cell strainer. ACK Lysing Buffer was added to the single-cell suspension and spun down at 350g for 5 minutes. The ACK was washed

out with 50 mL of washing buffer (1% FBS), and cells were incubated with 1:100 anti-EMMPRIN, anti-CD68 and anti-CD206 antibodies. All flow cytometry samples were assayed in a MACSQuant Analyzer Flow Cytometer and analyzed with the Graphpad Prism software package.

Example 1.13. Statistical analysis

All values were given as mean \pm S.D. Significance is reported at the 5% level. Whenever comparisons were made with a common control, significance of differences was tested by Dunnett's modification of the t test.

Example 2. Results

Example 2.1. NIL10 improves cardiac function in mice subjected to IR

To study the specificity of nanoparticles, we first incubated NIL10 (**Figure 1A, B**) in RAW 264.7 macrophages, detecting rhodamine-containing nanoparticles by confocal microscopy (**Figure 1C**). Colocalization with the IL-10R (as detected by immunohistofluorescence (FITC, green) was positive in RAW 264.7 cells incubated with NIL10 (rhodamine, red. **Figure 1D**), as detected by confocal microscopy (Merged panel, yellow and colocalization pixels panel), while no binding was found in cells incubated with NIL10SC, as NIL10SC is conjugated with a peptide which does not bind to IL10R (**Figure 1E**).

To test for biodistribution, confocal microscopy visualization of NIL10 and NIL10SC in the heart, liver, kidney, pancreas, spleen and lungs of healthy animals revealed a faint accumulation of NIL10 in the heart, kidney and lungs (**Figure 2**).

After selecting a dosage of 1mg/kg, we proceeded to inject 1mg/kg NIL10 or NIL10SC in mice 24 hours after IR (**Figure 3A, B**), resulting that NIL10 improved the LVEF by days 3 and 7 after IR ($41.5\% \pm 4.33$ vs $68\% \pm 7.02$ and $65.6\% \pm 5.11$ respectively (**Figure 3C**). Proof of the effect was obtained by performing the same assay in IL10 null mice, in which NIL10 also exhibited a significant degree of cardioprotection (**Figure 3D**). By contrast, in IL-10 receptor deficient mice subjected to IR, NIL10 had no effect (**Figure 3E**), suggesting that NIL10 induces cardiac protection at least, through activation of IL10 receptor signalling pathway.

Example 2.2. Administration of NIL10 reduces necrosis and fibrosis in mouse hearts subjected to IR

To shed light into the underlying causes by which NIL10 induces cardioprotection, Hematoxylin/Eosin (H/E) staining of heart sections isolated by days 3 and 7 after IR, showed a significant reduction in the inflammatory foci and the extension of myocardial necrosis in response to NIL10 (**Figure 4**). Likewise, the levels of the necrosis marker, matrix metalloproteinase 9 (MMP9), were markedly reduced in the necrotic areas of NIL10-injected mice (**Figure 5A**), including the extension of fibrosis, whereas in the NIL10SC group, fibrotic lesions were widespread in the hearts by day 7 after IR (**Figure 5B**).

Example 2.3. NIL10 improves cardiac function in pigs subjected to IR

To test whether NIL10 may also induce cardiac protection in large animals, we injected 1mg/kg NIL10 or NIL10SC into pigs subjected to IR by angioplasty balloon inflation of the LAD coronary artery (**Figure 3A**). As shown by EvansBlue/TTC staining of left ventricle sections (**Figure 6A**), after 7 days of IR we found a significant reduction of the necrotic area by 47% (NIL10SC 55 ± 7.34 vs NIL10 26.48 ± 4.32 (**Figure 7B**), which contributes to explain the improvement in cardiac function as evidenced by the recovery of LVEF in animals injected with NIL10 (**Figure 6C**). As in mice, HE and Masson's trichrome staining of heart sections from NIL10 injected pigs, indicated a marked reduction of myocardial necrosis (**Figure 6D**) and fibrosis (**Figure 6E**), when compared with the NIL10SC group

Example 2.4. Injection of NIL10 has an impact on macrophage polarization

The observed differences in the number and severity of inflammatory foci led us to consider whether NIL10 might have an impact on macrophage polarization. Indeed, cell extracts obtained from the necrotic areas of mouse hearts indicated that after 3 days of IR, NIL10 promotes the presence of M2-resolving macrophages, while it takes 7 days to detect a similar effect when NIL10SC was injected (**Figure 7A-B**), which may help to explain the reduction of inflammatory foci in animals injected with NIL10. We also assessed the level of 40 cytokines and chemokines in plasma collected from mice and pigs after 3 days of IR (**Figure 8A**). We identified differences in the expression of a significant number of cytokines, highlighting the presence of 4 mouse (5 pig) expression clusters depending on whether the animals have been injected with NIL10 or NIL10SC,

highlighting that in both species, we identified a marked increase in the expression of anti-inflammatory cytokines IL-4, -10, -13, -16, and -27, together with IL-5, and IL-7 in pigs, in response to NIL10 administration (**Figure 8BC**). Taken together, these results suggest that NIL10 may induce cardiac protection by at least, macrophage polarization towards inflammation resolution.

Example 2.5. NIL10 induces phosphorylation of STAT3 in pigs subjected to IR

Cardiac exposure to ischemia triggers activation of specific pro-inflammatory transcription factors, of which NF- κ B plays a major role. Polarization of immune cells through an inflammatory resolving state implies the activation of specific signaling cascades, highlighting the contribution of IL-10-induced JNK signaling pathway that activates STAT3 transcriptional regulation of anti-inflammatory cascades, including prevention of NF- κ B nuclear translocation.

NIL10 led to accumulation of phosphorylated IL-10 receptor subunit IL-10RA and phospho- STAT3 in mice (**Figure 9**) and in pigs subjected to IR (**Figure 10**), indicative that NIL10, but not NIL10SC, induces receptor-agonist complex activation through the IL10-JNK-STAT-3 signaling pathway.

The anti-inflammatory effect NIL10 was further investigated in RAW 264.7 macrophages stimulated with 500 μ M LPS, in which nuclear translocation of pro-inflammatory NF- κ B transcription factor was prevented by NIL10 (**Figure 10A**), at least by suppressing phosphorylation of the NF- κ B cytoplasmic sequestering I κ B- α (**Figure 10B**), required for I κ B- α proteasome-mediated proteolytical degradation.

To further validate the anti-inflammatory effect of NIL10, we stimulated NF- κ B nuclear translocation with 500 μ M LPS in RAW 264.7 cells co-incubated with 5 μ M of STAT3-specific pharmacological inhibitor STATTIC, which prevented NIL10-induced cytoplasmic localization of NF- κ B in LPS-treated cells, indicating that NIL10 inhibits NF- κ B nuclear translocation at least, by STAT-3 activation (**Figure 10C**). The expression of the readout inducible nitric oxide synthase (iNOS) by pro-inflammatory signals was also assayed. As shown, iNOS was expressed by stimulating RAW 264.7 macrophages with 500 μ M LPS, and significantly inhibited by co-incubation with NIL10, while the effect was reversed in the presence of STATTIC (**Figure 11** lower panels). Taken together, NIL10 may act as anti-inflammatory effector through IL-10/STAT3 signaling pathway in myocardial ischemia/reperfusion.

CLAIMS

1. Nanoparticle conjugated with a peptide consisting of SEQ ID NO: 1, characterized in that the nanoparticle size is comprised between 100 and 150 nm, the Polydispersity Index (PDI) is lower than 0.3 and the ratio between the total amount of the peptide and the total amount of lipids in the nanoparticle is comprised within 1:5 and 1:15.
2. Nanoparticle conjugated with a peptide consisting of SEQ ID NO: 1, according to claim 1, characterized in that it comprises a PEG coating and maleimide linking point, to enhance the pharmacokinetic properties and to enable the linking of SEQ ID NO: 1 peptide, respectively.
3. Nanoparticle conjugated with a peptide consisting of SEQ ID NO: 1, according to any of the previous claims, characterized in that it comprises a dye which allows the visualization of the nanoparticle by fluorescence imaging.
4. Nanoparticle conjugated with a peptide consisting of SEQ ID NO: 1, according to any of the previous claims, characterized in that it comprises a chemical compound or radioisotopes which allows the detection of the nanoparticle by *in vivo* molecular imaging techniques.
5. Nanoparticle conjugated with a peptide consisting of SEQ ID NO: 1, according to any of the previous claims, for use as a medicament.
6. Nanoparticle conjugated with a peptide consisting of SEQ ID NO: 1 for use, according to claim 5, in the prevention and/or treatment of cardiac damage arising after ischemia followed by reperfusion.
7. Nanoparticle conjugated with a peptide consisting of SEQ ID NO: 1 for use, according to claim 6, in the prevention and/or treatment of the inflammatory response following acute myocardial infarction.
8. Pharmaceutical composition comprising the nanoparticle conjugated with a peptide consisting of SEQ ID NO: 1 of any of the claims 1 to 4, and, optionally, pharmaceutically acceptable excipients or carriers.
9. Pharmaceutical composition, according to claim 8, for use in the prevention and/or treatment of cardiac damage arising after ischemia followed by reperfusion.
10. Pharmaceutical composition, according to claim 8, for use, according to claim 9, in the prevention and/or treatment of the inflammatory response following acute myocardial infarction.

ABSTRACT**PREVENTION AND/OR TREATMENT OF CARDIAC DAMAGE.**

The present invention refers to a peptide comprising or consisting of SEQ ID NO: 1 (CAYMTMKIRN), for use as a medicament, preferably in the prevention and/or treatment of cardiac damage arising after ischemia followed by reperfusion, or in the prevention and/or treatment of the inflammatory response following acute myocardial infarction. In a preferred embodiment, the peptide is conjugated with a nanoparticle.

Figure 1 (cont.)

B

SAMPLE	Hydrodynamic Size	z-potential	r_1 ($s^{-1}mM^{-1}$)	r_2 ($s^{-1}mM^{-1}$)	r_2/r_1
Micelle	111,5 nm (PDI: 0.253)	-28.9 mV	28.93	55.21	1.91
NIL-10	135 nm (PDI: 0.280)	-22,7 mV	18	39.07	2.17
NIL-10-SC	132.6 nm (PDI: 0.263)	-26.7 mV	19.53	46.77	2.39

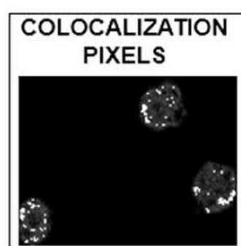
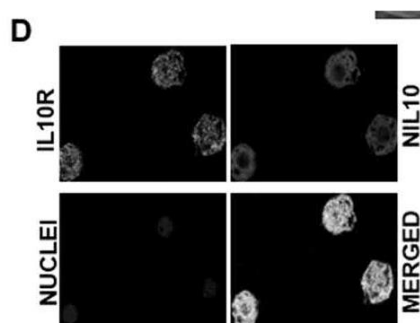
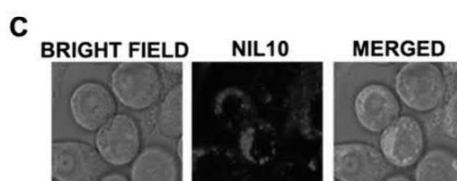


Figure 1 (cont.)

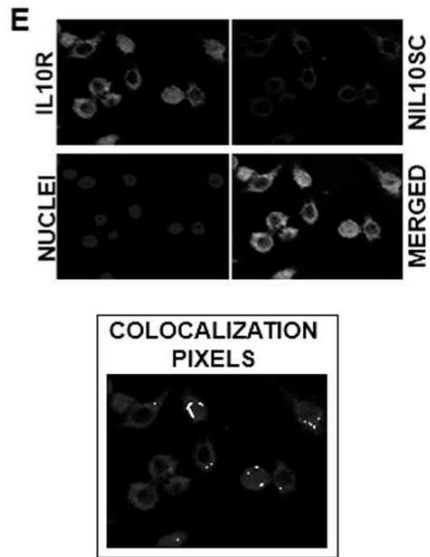


Figure 2

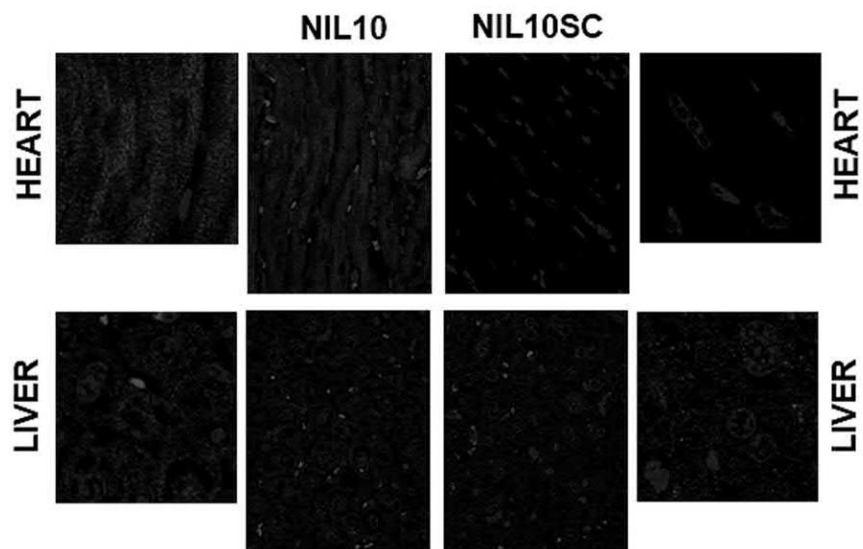


Figure 2B (cont.)

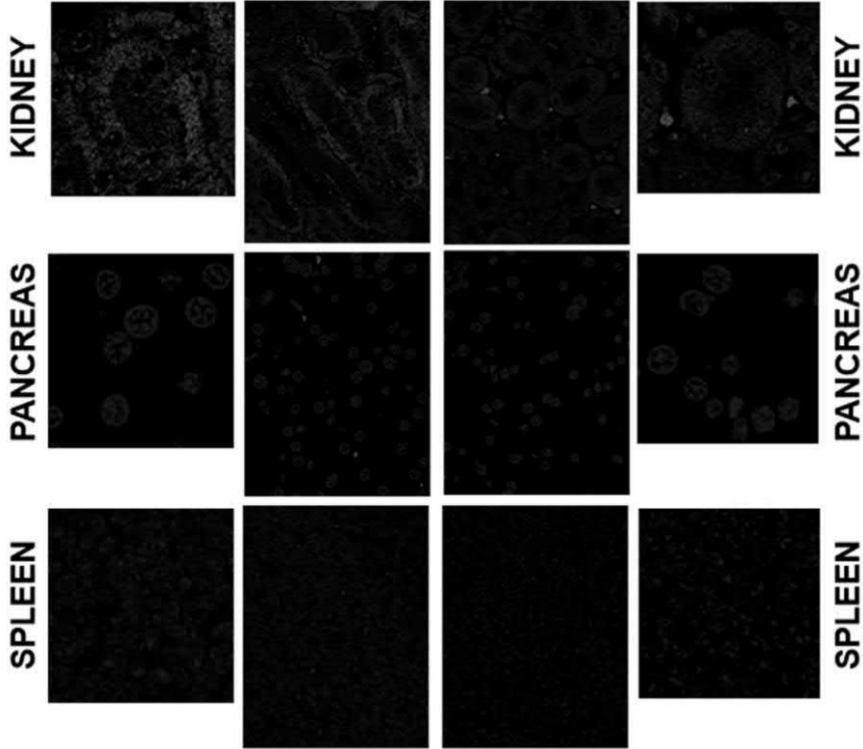


Figure 3

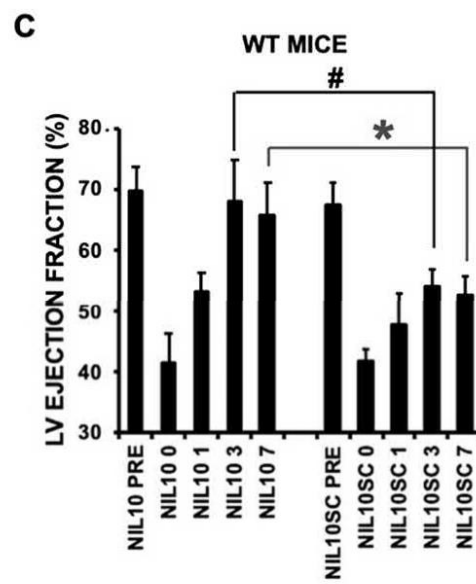
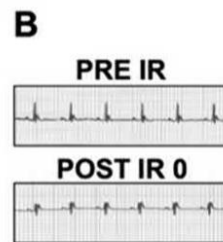
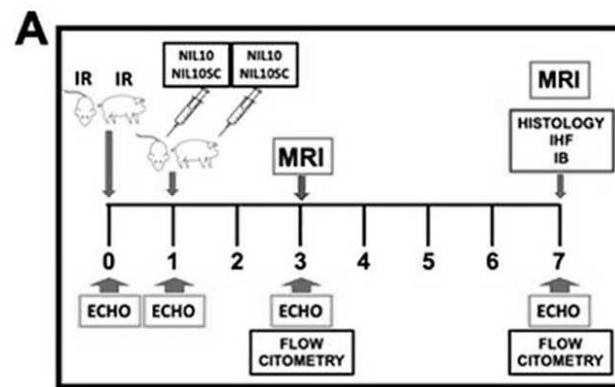


Figure 3 (cont.)

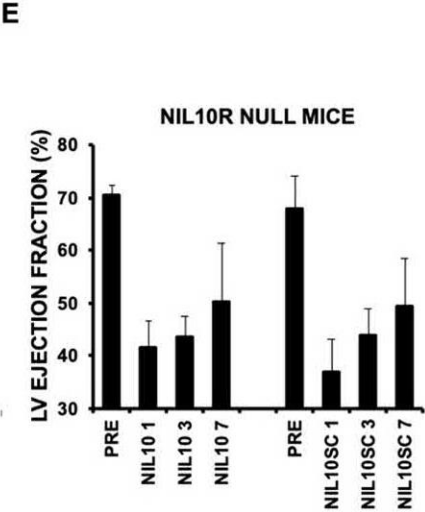
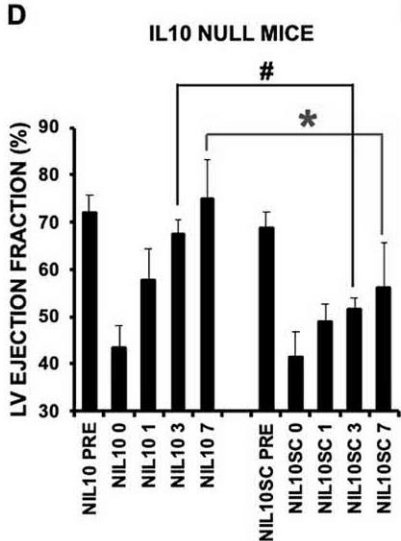
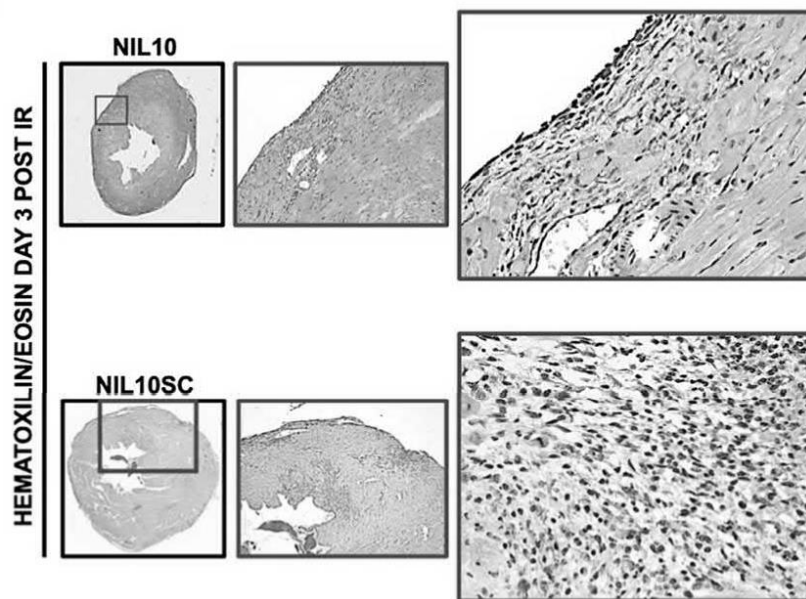


Figure 4

A



B

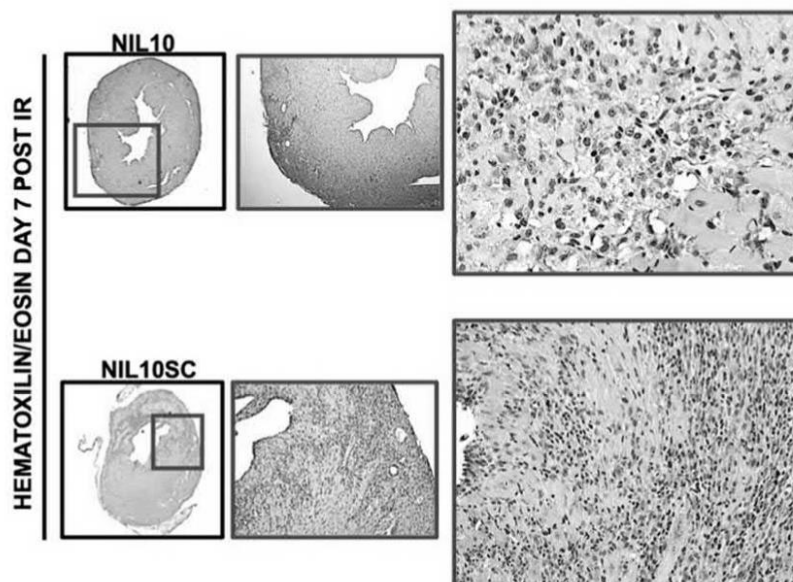
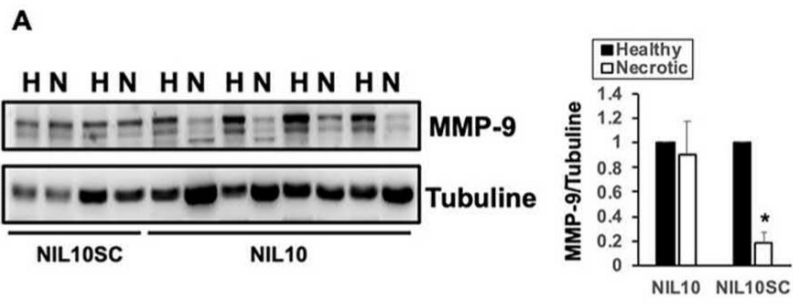


Figure 5



B

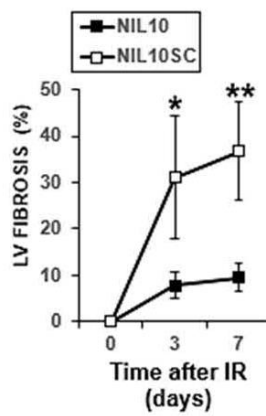
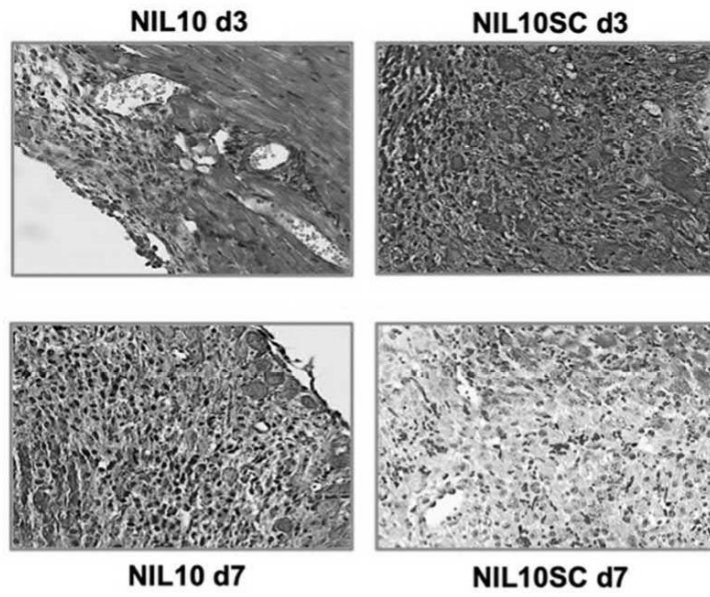
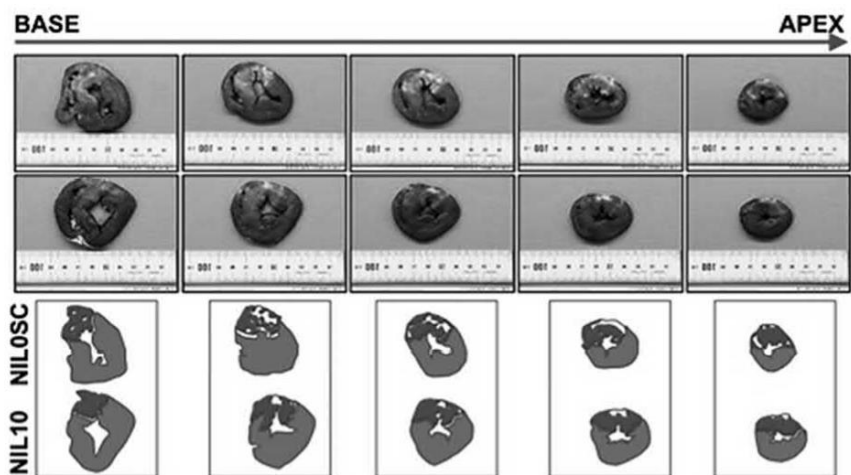
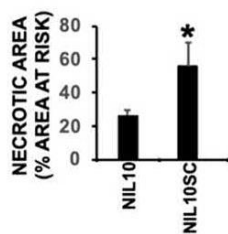


Figure 6

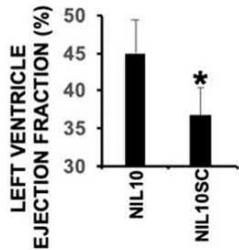
A



B



C



D

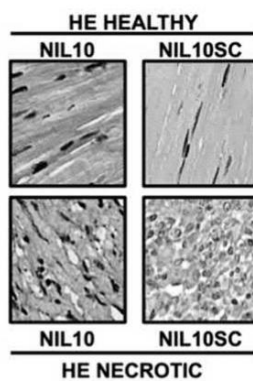


Figure 6 (cont.)

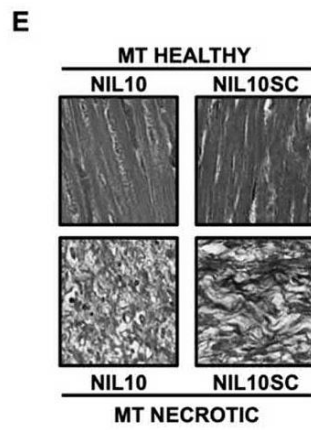


Figure 7

A

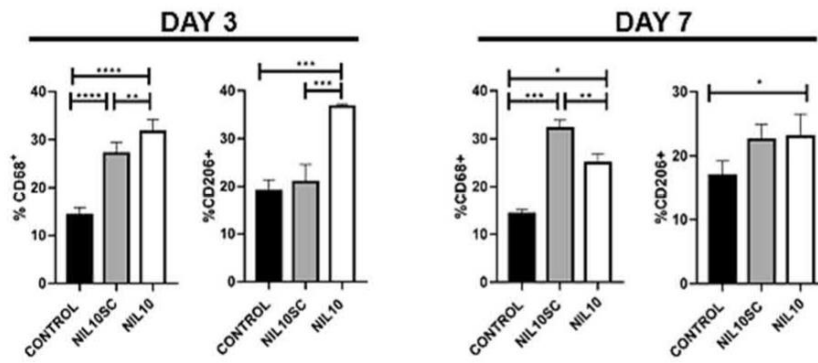


Figure 7 (cont.)

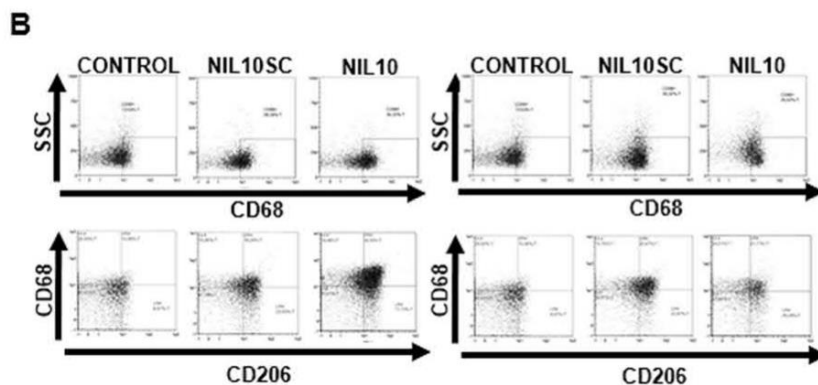


Figure 8

A

Inflammatory	Anti-inflammatory	Chemokines
C5a	IL1-RA	CXCL1
G-CSF	IL-4	CXCL2
GM-CSF	IL-5	CXCL3
CCL1	IL-7	CXCL9
CCL11	IL-10	CXCL10
sICAM-1	IL-11	CXCL11
IFN-gamma	IL-13	CXCL12
IL1-alpha	IL-16	CCL2
IL1-beta	IL27	CCL3
IL-2		CCL4
IL-3		CCL5 (RANTES)
IL-6		CCL12
IL12-P70		CCL17
IL-17		
IL-23		
TNF-ALPHA		
TREM-1		
MCSF		

Figure 8 (cont.)

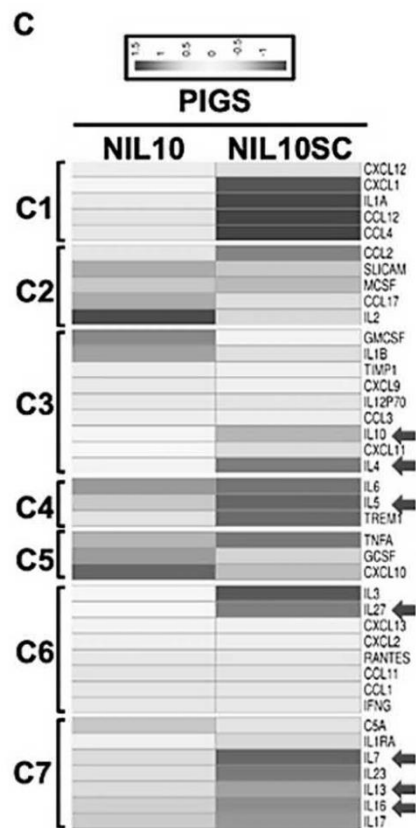
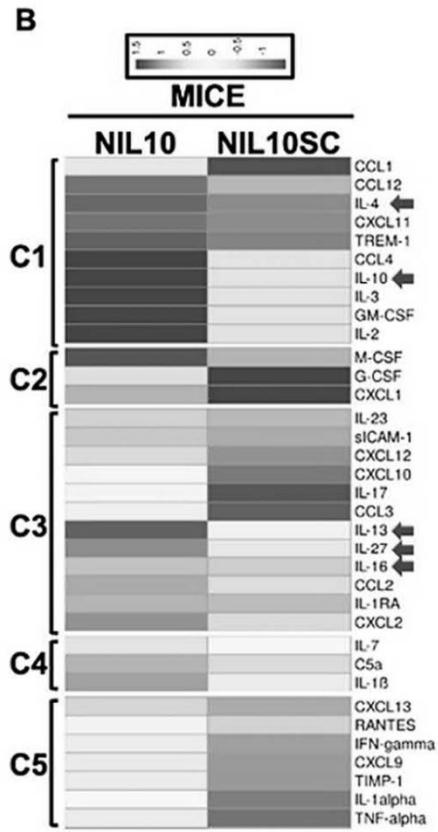


Figure 9

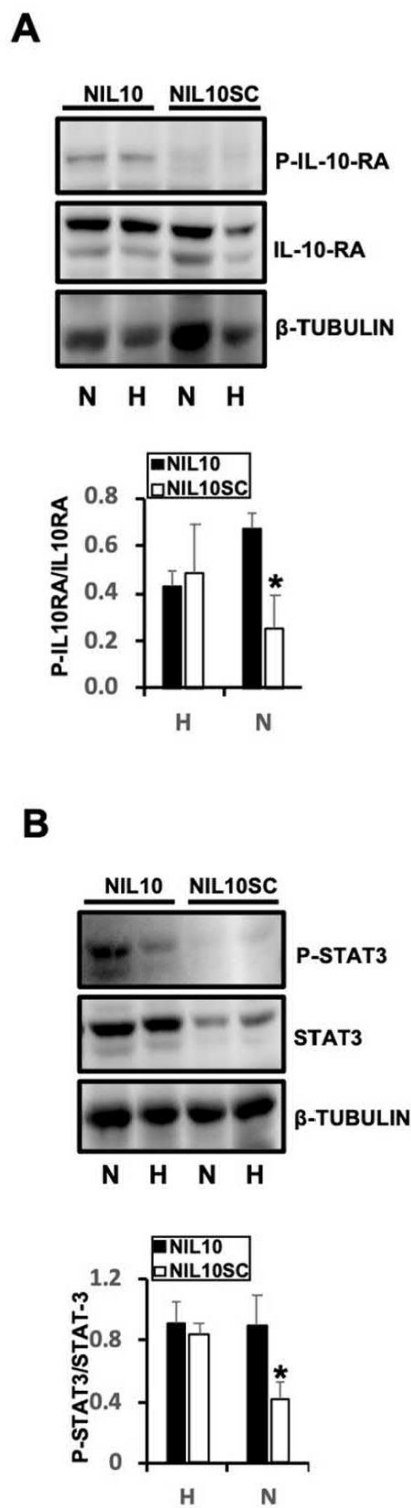


Figure 10

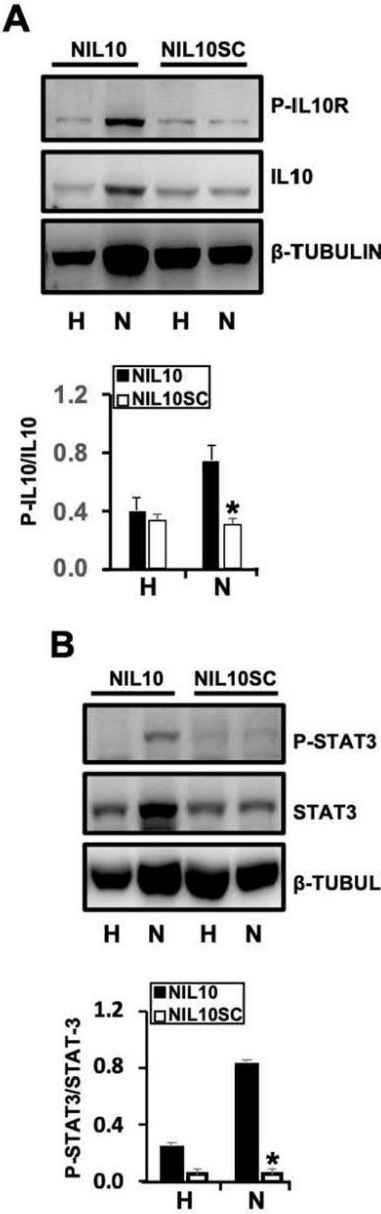
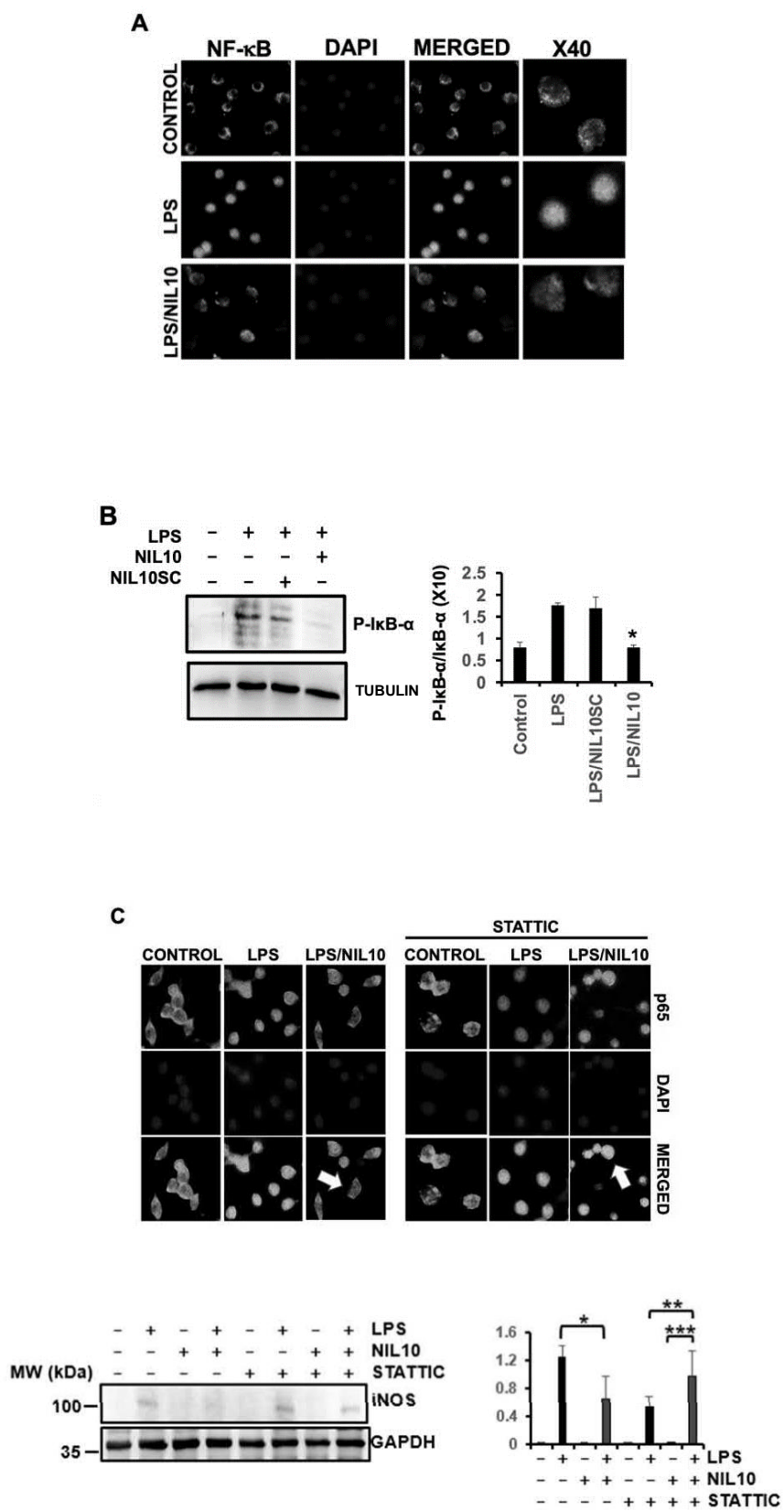


Figure 11



Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for the processing of an international application according to the Patent Cooperation Treaty as follows:

Submission number	11063201	
PCT application number	PCT/EP2022/067242	
Date of receipt	23 June 2022	
Receiving Office	European Patent Office, The Hague	
Your reference	906 111	
Applicant	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD FRANCISCO DE VITORIA	
Number of applicants	3	
Country	ES	
Title	PREVENTION AND/OR TREATMENT OF CARDIAC DAMAGE	
Documents submitted	eolf-pkda.xml eolf-appb.xml eolf-fees.xml eolf-appb-P000001.pdf (16 p.) eolf-appb-P000003.pdf (1 p.) eolf-othd-000001.zip	eolf-requ.xml eolf-seql.txt eolf-vlog.xml eolf-appb-P000002.pdf (1 p.) eolf-appb-P000004.pdf (21 p.) eolf-othd-000002.pdf (1 p.)
Submitted by	CN=Miguel Martinez 64077	
Method of submission	Online	
Date and time receipt generated	23 June 2022, 15:54 (CEST)	

Message Digest

C9:6A:19:AF:B4:6F:CB:E3:67:F1:8C:1B:78:12:CC:58:E2:6B:06:C0

/European Patent Office/

DAS access code

The access code generated for this application and used to retrieve the priority documents from WIPO's Digital Access Service (DAS) is indicated in the document appended to this acknowledgement of receipt. Please note that the appended document is non-public and will not be published.

/European Patent Office/



DAS access code

To access and retrieve the priority document from WIPO's Digital Access Service (DAS) in respect of

Application number

PCT/EP2022/067242

Applicant

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD
FRANCISCO DE VITORIA

the European Patent Office has generated the following code:

DAS access code

B6C2

For further information, see OJ EPO 03/2019.

Date and time
receipt generated

23 June 2022, 15:54 (CEST)

This unique access code allows the applicant to authorise participating intellectual property offices to retrieve a certified copy of the present application (as priority document) via WIPO DAS.
The code will only be valid if the requirements for according a date of filing are met (see OJ EPO 03/2019).

PCT REQUEST

(Original in Electronic Form)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT Online Filing Version 3.51.000.274e MT/FOP 20141031/0.20.5.24
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	European Patent Office (EPO) (RO/EP)
0-7	Applicant's or agent's file reference	906 111
I	Title of Invention	PREVENTION AND/OR TREATMENT OF CARDIAC DAMAGE
II	Applicant	
II-1	This person is	Applicant only
II-2	Applicant for	All designated States
II-4	Name	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD FRANCISCO DE VITORIA
II-5	Address	Carretera M-515 de Pozuelo a Majadahonda, km 1,800 28223 Pozuelo de Alarcón Spain
II-6	State of nationality	ES
II-7	State of residence	ES
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is	Applicant only
III-1-2	Applicant for	All designated States
III-1-4	Name	FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO RAMÓN Y CAJAL
III-1-5	Address	Carretera de Colmenar Viejo Km. 9.100 28034 Madrid Spain
III-1-6	State of nationality	ES
III-1-7	State of residence	ES

PCT REQUEST

(Original in Electronic Form)

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is	Applicant only
III-2-2	Applicant for	All designated States
III-2-4	Name	UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
III-2-5	Address	Facultad de Medicina, Edificio Entrepabellones 7 y 8. c/ Dr. Severo Ochoa, 7, Ciudad Universitaria 28040 MADRID Spain
III-2-6	State of nationality	ES
III-2-7	State of residence	ES
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is	Inventor only
III-3-3	Inventor for	All designated States
III-3-4	Name (LAST, First)	ZARAGOZA SÁNCHEZ, Carlos
III-3-5	Address	Fundación para la investigación biomédica del Hospital Universitario Ramón y Cajal Carretera de Colmenar Viejo Km 9,100 28034 Madrid Spain
III-4	Applicant and/or inventor	
III-4-1	This person is	Inventor only
III-4-3	Inventor for	All designated States
III-4-4	Name (LAST, First)	FILICE, Marco
III-4-5	Address	Universidad Complutense de Madrid Facultad de Medicina, Edificio Entrepabellones 7 y 8 c/ Dr. Severo Ochoa, 7, Ciudad Universitaria 28040 Madrid Spain
III-5	Applicant and/or inventor	
III-5-1	This person is	Inventor only
III-5-3	Inventor for	All designated States
III-5-4	Name (LAST, First)	TESORO SANTOS, Laura
III-5-5	Address	Fundación Universidad Francisco de Vitoria Carretera M-515 de Pozuelo a Majadahonda, km 1,800 28223 Pozuelo de Alarcón Spain

PCT REQUEST

(Original in Electronic Form)

III-6	Applicant and/or inventor	
III-6-1	This person is	Inventor only
III-6-3	Inventor for	All designated States
III-6-4	Name (LAST, First)	HERNÁNDEZ NAVARRO, Ignacio
III-6-5	Address	Fundación Universidad Francisco de Vitoria Carretera M-515 de Pozuelo a Majadahonda, km 1,800 28223 Pozuelo de Alarcón Spain
III-7	Applicant and/or inventor	
III-7-1	This person is	Inventor only
III-7-3	Inventor for	All designated States
III-7-4	Name (LAST, First)	RAMÍREZ-CARRACEDO, Rafael
III-7-5	Address	Fundación Universidad Francisco de Vitoria Carretera M-515 de Pozuelo a Majadahonda, km 1,800 28223 Pozuelo de Alarcón Spain
III-8	Applicant and/or inventor	
III-8-1	This person is	Inventor only
III-8-3	Inventor for	All designated States
III-8-4	Name (LAST, First)	BOTANA VEGUILLAS, Laura
III-8-5	Address	Fundación Universidad Francisco de Vitoria Carretera M-515 de Pozuelo a Majadahonda, km 1,800 28223 Pozuelo de Alarcón Spain
III-9	Applicant and/or inventor	
III-9-1	This person is	Inventor only
III-9-3	Inventor for	All designated States
III-9-4	Name (LAST, First)	DÍEZ-MATA, Javier
III-9-5	Address	Fundación Universidad Francisco de Vitoria Carretera M-515 de Pozuelo a Majadahonda, km 1,800 28223 Pozuelo de Alarcón Spain

PCT REQUEST

(Original in Electronic Form)

III-10	Applicant and/or inventor	
III-10-1	This person is	Inventor only
III-10-3	Inventor for	All designated States
III-10-4	Name (LAST, First)	OVEJERO-PAREDES, Karina
III-10-5	Address	Universidad Complutense de Madrid Facultad de Medicina, Edificio Entrepabellones 7 y 8 c/ Dr. Severo Ochoa, 7, Ciudad Universitaria 28040 Madrid Spain
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence	
	The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	Agent
IV-1-1	Name	HOFFMANN EITLE S.L.U.
IV-1-2	Address	Paseo de la Castellana 140 3^a Planta, Edificio Lima 28046 Madrid Spain
IV-1-3	Telephone No.	+34917822780
IV-1-4	Facsimile No.	+4989918356
IV-1-5	e-mail	mmartinez@hoffmanneitle.com
IV-1-5(a)	E-mail authorization) The receiving Office, the International Searching Authority, the International Bureau and the International Preliminary Examining Authority are authorized to use this e-mail address, if the Office or Authority so wishes, to send notifications issued in respect of this international application:	as advance copies followed by paper notifications
IV-1-6	Agent's registration No.	151
V	DESIGNATIONS	
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.	
VI-1	Priority Claim	NONE
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)

PCT REQUEST

(Original in Electronic Form)

VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
IX	Check list	Number of sheets	Electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	6	✓
IX-2	Description	16	✓
IX-3	Claims	1	✓
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	21	✓
IX-6a	Sequence listing part of the description (also to be used for the purposes of international search)	-	✓
IX-7	TOTAL	45	
	Accompanying Items	Paper document(s) attached	Electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	-	✓
IX-19	Other	Pre-conversion archive Statement (Section 706): This is a complete and accurate copy of the international application prior to its conversion into the electronic document format in which it is filed.	✓
IX-19	Other	Authorization defense SPTO	✓
IX-20	Figure of the drawings which should accompany the abstract	0	
IX-21	Language of filing of the international application	English	

PCT REQUEST

(Original in Electronic Form)

X-1	Signature of applicant, agent or common representative	(PKCS7 Digital Signature)
X-1-1	Name	HOFFMANN EITLE S.L.U.
X-1-2	Name of signatory	Miguel Martinez 64077
X-1-3	Capacity (if such capacity is not obvious from reading the request)	(Representative)

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
-------------	---	--

PCT (ANNEX - FEE CALCULATION SHEET)

(Original in Electronic Form)

(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

0	For receiving Office use only		
0-1	International Application No.		
0-2	Date stamp of the receiving Office		
0-4	Form PCT/RO/101 (Annex) PCT Fee Calculation Sheet		
0-4-1	Prepared Using	PCT Online Filing Version 3.51.000.274e MT/FOP 20141031/0.20.5.24	
0-9	Applicant's or agent's file reference	906 111	
2	Applicant	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD FRANCISCO DE VITORIA	
12	Calculation of prescribed fees	Fee amount/multiplier	Total amounts (EUR)
12-1	Transmittal fee T	↔	140
12-2-1	Search fee S	↔	1775
12-2-2	International search to be carried out by	EP	
12-3	International filing fee (first 30 sheets) i1	1235	
12-4	Remaining sheets	15	
12-5	Additional amount (X)	14	
12-6	Total additional amount i2	210	
12-7	i1 + i2 = i	1445	
12-12	Electronic Filing reduction (Image) R	-186	
12-13	Total International filing fee (i-R) I	↔	1259
12-14	Fee for priority document		
	Number of priority documents requested	0	
12-15	Fee per document (X)	110	
12-16	Total priority document fee: P	↔	
12-17	Fee for restoration of priority rights RP		
	Number of requests for restoration of priority rights	0	
	Total amount of fees for restoration of priority rights		
12-19	TOTAL FEES PAYABLE (T+S+I+P+RP)	↔	3174
12-21	Mode of payment	Authorization to charge deposit or current account	
12-22	Deposit or current account instructions		
	The receiving Office	European Patent Office (EPO) (RO/EP)	
12-22-1	Authorization to charge the total fees indicated above	✓	
12-22-2	Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above	✓	
12-22-3	Authorization to charge the fee for priority document	✓	

PCT (ANNEX - FEE CALCULATION SHEET)

(Original in Electronic Form)

(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

12-23	Deposit or current account No.	28120316
12-24	Date	23 June 2022 (23.06.2022)
12-25	Name and signature	GUSTAVO FUSTER, /FUSTER, Gustavo/
12-26	Reimbursement instructions	
12-26-1-1	Office processing the reimbursement	EP
12-26-1-2	Reimbursement, if any, to be made to the deposit or current account No.	28120316
12-26-1-3	Account holder	Gustavo Fuster
12-26-1-4	Date	23 June 2022 (23.06.2022)



D^a M^a José de Concepción Sánchez, a la vista de la copia de la documentación aportada en fecha **22/03/2022**, de conformidad con lo previsto en el art. 50 del Real Decreto 316/2017, de 31 de marzo, por el que se aprueba el Reglamento para la Ejecución de la Ley 24/2015, de 24 de julio, de Patentes,

AUTORIZO

A la **Fundación para la investigación biomédica del Hospital Universitario Ramón y Cajal** y a la **Fundación Universidad Francisco de Vitoria** o sus causahabientes para la presentación en el extranjero de una primera solicitud de patente o modelo de utilidad y de conformidad con la documentación aportada con fecha **22/03/2022**, con número de entrada **21/2022**, título **“Prevención y/o tratamiento del daño cardiaco”** y que consta de 16 páginas, por considerar que no es de interés para la defensa nacional.

Madrid, 22 de marzo de 2022

P.O. Leopoldo Belda Soriano
Jefe de Área de Patentes de Mecánica General y Construcción.

Firmado por BELDA SORIANO LEOPOLDO - ***7108** el día
22/03/2022 con un certificado emitido por AC FNMT Usuarios