



Universidad
Francisco de Vitoria
UFV Madrid

Universidad Francisco de Vitoria
Facultad de ciencias experimentales

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Modelo A

**Nanotecnología aplicada a la cardioprotección
mediante la inhibición de la degradación de matriz
extracelular tras un infarto agudo de miocardio**

Janire Cabrejas Correges

Grado en Biomedicina

Director: **Dr. Carlos Zaragoza Sánchez**

Tutora: **Dra. María Jesús Delgado Martos**

Lugar de realización: **Unidad Mixta de Investigación Cardiovascular Hospital Ramón y Cajal –
Universidad Francisco de Vitoria**

2021

RESUMEN

El infarto agudo de miocardio (IAM) es la principal causa de muerte en el mundo, por lo que establecer un diagnóstico preciso y encontrar dianas terapéuticas eficaces, resulta de vital importancia. La causa más frecuente que subyace al infarto es la obstrucción de, al menos, una arteria coronaria, que impide un correcto aporte sanguíneo al tejido miocárdico, dando lugar a la isquemia. Esta disminución del flujo sanguíneo, desencadena un evento de necrosis miocárdica en el área infartada, responsable del remodelado cardiaco. El remodelado cardiaco es un proceso fisiológico del desarrollo, aunque también surge de manera adaptativa ante cambios transitorios del entorno para preservar la función cardiaca, que de no resolverse adecuadamente se convierte en un factor determinante en el desarrollo de la insuficiencia cardíaca (IC). Durante el remodelado, se disparan numerosos cambios bioquímicos, y estructurales, con el fin de mantener la función miocárdica y asegurar un correcto bombeo sanguíneo al corazón. Ante la isquemia miocárdica, la respuesta inflamatoria es la primera gran cascada de señalización para minimizar la falta de oxígeno de los tejidos, aunque como parte del proceso, también se lleva a cabo la síntesis de enzimas proteolíticos de componentes de la matriz extracelular: las metaloproteinasas de matriz extracelular (MEC), ya que en la región promotora de sus genes, se localizan elementos de respuesta a factores de transcripción pro-inflamatorios. No sólo eso, sino que además se produce la síntesis de moléculas entre las que en especial para este trabajo de fin de grado, se encuentra CD147, también denominada EMMPRIN (Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer), debido a su actividad como inductor de las metaloproteinasas de matriz extracelular, en concreto MMP-9 y MMP-13, en el miocardio. Posteriormente, tiene lugar una proliferación excesiva de fibroblastos que reemplazan la matriz degradada por una matriz fundamentalmente de colágeno, produciéndose una cicatrización del tejido. El resultado de un desequilibrio en este proceso, es el de la pérdida de contractilidad en una región del corazón, cuya extensión varía en función del grado de necrosis miocárdica.

Dada la importancia del remodelado cardiaco en relación con la recuperación de la funcionalidad cardiaca del paciente, es importante definir con exactitud los mecanismos moleculares subyacentes para intentar establecer nuevas dianas que nos permitan un mejor diagnóstico y tratamiento frente a las enfermedades del corazón. Por ello, en el presente trabajo nuestro grupo de investigación, en base a la experiencia del laboratorio propone el uso de la nanotecnología aplicada al control del remodelado cardiaco, como herramienta de cardioprotección frente a los daños posteriores al infarto agudo de miocardio. A partir del uso de nanopartículas conjugadas con péptidos de unión específica a EMMPRIN (AP9), pretendimos actuar sobre su dominio Igl causando su inhibición, y por tanto, reduciendo la liberación y activación de metaloproteasas en el tejido miocárdico tras el infarto, para de esta forma preservar en la medida de lo posible, la mayor cantidad de tejido miocárdico contráctil tras el infarto y por tanto, reducir la insuficiencia cardiaca post-infarto.

Palabras clave: EMMPRIN, Metaloproteinasas de Matriz Extracelular (MMPs), Infarto Agudo de Miocardio (IAM), Insuficiencia Cardíaca (IC), nanotecnología, péptido AP9, remodelado cardiaco.

GRAPHICAL ABSTRACT

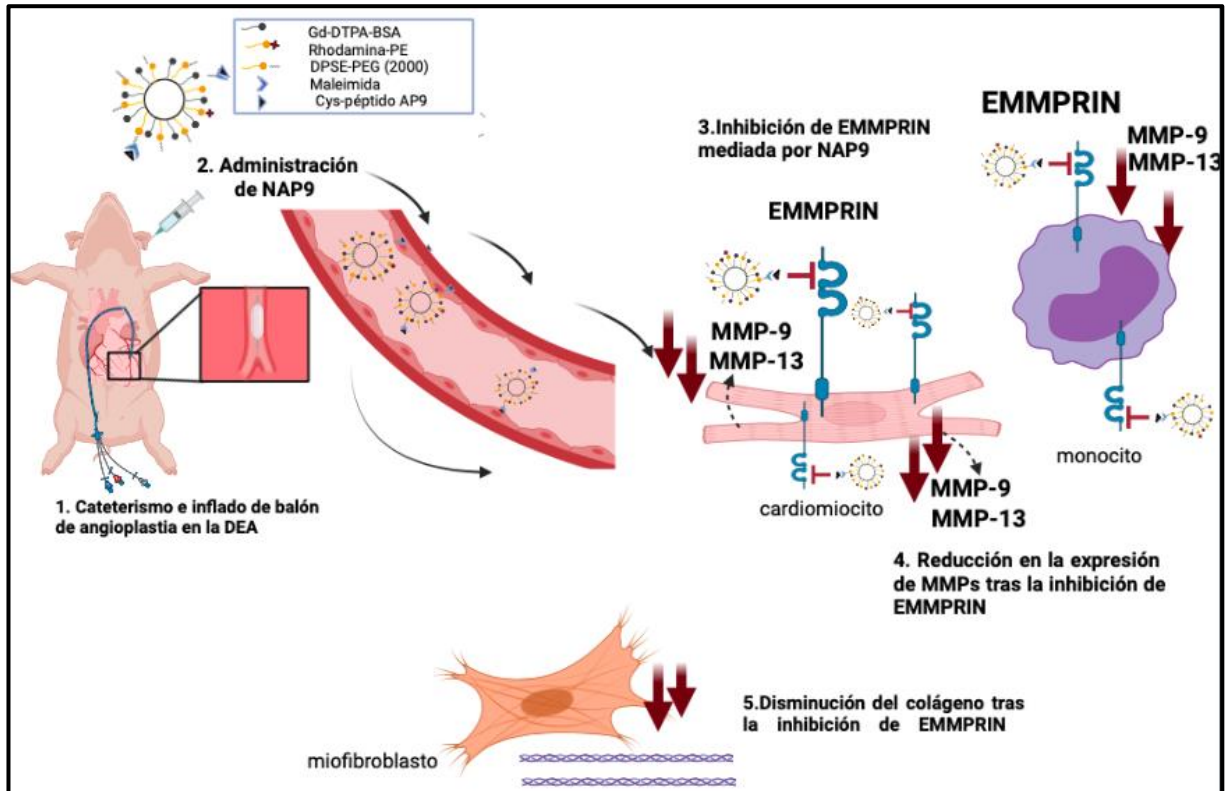


Figura 1. NAP9 posee un efecto cardioprotector mediante la inhibición de EMMPRIN tras un infarto agudo de miocardio. Fuente: Elaboración propia.

Glosario de abreviaturas y acrónimos

Relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En varios casos, se ha mantenido la correspondiente abreviatura en inglés debido a su uso frecuente en el lenguaje científico

- ❖ AER: Área Miocárdica en Riesgo
- ❖ APS: Amonio Persulfato Sódico
- ❖ ATP: Adenosín Trifosfato
- ❖ BSA: Albúmina de Suero Bovino (Bovin Serum Albumin)
- ❖ CI: Cardiopatía Isquémica
- ❖ CypA: Ciclofilina A
- ❖ DC: Desfibrilación cardíaca
- ❖ DEA: Arteria Descendente Anterior
- ❖ ECG: Electrocardiograma
- ❖ ECV: Enfermedades Cardiovasculares
- ❖ EMMPRIN: Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer
- ❖ FEVI: Fracción eyección ventrículo izquierdo
- ❖ IAM: Infarto Agudo de Miocardio
- ❖ IC: Insuficiencia Cardíaca
- ❖ INE: Instituto Nacional de Estadística
- ❖ MEC: Matriz Extracelular
- ❖ MMPs: Metaloproteinasas de Matriz Extracelular
- ❖ NAP9: Nanopartícula AP9
- ❖ NAP9SC: Nanopartícula Scramble
- ❖ ROS: Especies Reactivas de Oxígeno
- ❖ SCA: Síndrome Coronario Agudo
- ❖ SCACEST: Síndrome Coronario Agudo Con Elevación del segmento ST
- ❖ SDS: Dodecilsulfato de Sodio
- ❖ TEMED: Tetrametiletilendiamina
- ❖ T-TBS: Tampón Tris Salino
- ❖ VI: Ventrículo Izquierdo
- ❖ VS: Volumen sistólico

AGRADECIMIENTOS

Durante estos años, han sido muchas las personas que se han cruzado en mi camino y a las que me gustaría poder expresar mi agradecimiento por todo su apoyo y cariño de forma incondicional.

En primer lugar, me gustaría agradecer al Dr. Carlos Zaragoza, director de todo este increíble proyecto, por todo su trabajo, paciencia y por la confianza que depositó en mí para formar parte de esta investigación.

También me gustaría agradecer a mi tutora académica la Dra. María Jesús Delgado Martos, ya que sin sus consejos y su apoyo en este camino, este trabajo no hubiera sido posible.

Mención especial a mis compañeros de laboratorio, por su compañía, su disposición y por soportar todas mis dudas científicas, y sobre todo por haberme hecho sentir una más.

Por supuesto, quería agradecer a toda mi familia y a Henry por su comprensión y sin cuya ayuda no lo podría haber logrado.

Y en especial, gracias a mis padres, por su esfuerzo tanto personal como económico, sin su apoyo y amor incondicional no podría haber llegado hasta aquí.

Janire Cabrejas Correges

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	7
MATERIALES Y MÉTODOS	8
RESULTADOS	15
DISCUSIÓN.....	21
CONCLUSIONES	24
BIBLIOGRAFÍA.....	25

INTRODUCCIÓN

Enfermedades cardiovasculares, el Infarto agudo de miocardio

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son desde el siglo XX la principal causa de mortalidad en los países desarrollados. En España, según datos del Instituto nacional de estadística (INE), causan aproximadamente 121.000 defunciones al año. Dentro de las ECV, la isquemia cardiaca y el infarto agudo de miocardio (IAM) se consideran la primera y segunda causa de muerte respectivamente, lo que representa el 7,3% de todas las defunciones en ambos sexos (Instituto nacional de estadística, 2019).

Dentro de las ECV podemos destacar la cardiopatía isquémica (CI), definida como un trastorno de la función cardíaca, que se produce como consecuencia de las alteraciones fisiopatológicas secundarias a la aparición de un desequilibrio entre la demanda y el aporte de oxígeno del músculo cardíaco; el miocardio. La causa más frecuente que subyace a la aparición de esta patología, es la enfermedad aterosclerótica de las arterias coronarias, tanto en su forma de presentación crónica (placas estables de ateroma en la pared del vaso que disminuyen el diámetro de su luz) como en la forma aguda; síndrome coronario agudo (SCA), siendo el infarto agudo de miocardio (IAM) la patología que se relaciona con la mayor mortalidad y morbilidad. Éste se produce, ante una oclusión transitoria de las arterias coronarias, en donde la rotura de la placa de ateroma y/o un trombo plaquetario asociado, desencadena el episodio isquémico provocando el cese del aporte sanguíneo al tejido cardíaco, que termina por traducirse en necrosis celular (Thygesen et al., 2013).

Durante el desarrollo del infarto agudo de miocardio, el signo más común que experimenta el paciente es una opresión torácica o dolor precordial, al que referimos como una angina de pecho. Este dolor irradia hacia el hombro, cuello y brazo izquierdos con una duración variable, pudiendo catalogar a la angina como estable o inestable en función de si se manifiesta cuando el paciente se encuentra en reposo (angina estable) o si aparece asociada al esfuerzo físico y/o emocional (angina inestable) (Thygesen et al., 2013).

Como hemos explicado anteriormente, durante el infarto se produce la necrosis del tejido miocárdico, siendo el grado de este fenómeno el de más impacto en la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes. Entre los mecanismos responsables de la muerte de los cardiomiocitos podemos encontrar la depleción de adenosin trifosfato (ATP), la sobrecarga de Ca^{2+} , permeabilización mitocondrial y la fragilidad del citoesqueleto (producida por la activación de proteasas) (Ruiz-Meana & García-Dorado, 2009).

Aproximadamente 2/3 del ATP en el corazón se usan para la contracción, mientras que 1/3 es usado por la ATPasa de calcio en el retículo sarcoplásmico y otras bombas iónicas (Stanley, 1997). Como ya sabemos, el ATP se genera a partir de la fosforilación oxidativa siendo fundamental un correcto aporte de oxígeno y sustratos para su generación y para el mantenimiento de la homeostasis iónica en los cardiomiocitos.

El principal efecto de la isquemia miocárdica tras un infarto, es la disfunción metabólica de las mitocondrias, debido a la disminución en la entrega de oxígeno y sustratos a los tejidos, causando una depleción de ATP, acidosis intracelular por la síntesis del lactato al realizar la glucólisis anaerobia y formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Además, la alteración de las propiedades eléctricas de las células cardíacas, tiene como consecuencia la ocurrencia de disparos de despolarización incontrolados, generando de esta forma un comportamiento arritmogénico, que en los casos mas extremos ocasiona la muerte del paciente durante el tránsito al hospital (Stanley, 1997).

El daño miocárdico es potencialmente reversible dentro de una ventana de tiempo no superior a 15 minutos, tiempo tras el cual, el área del corazón potencialmente infarctable (área de riesgo) es cada vez menor en detrimento del crecimiento del área infartada, definida como el área de hipoperfusión miocárdica durante la oclusión coronaria aguda en ausencia de circulación colateral (Moral et al., 2012). En otras palabras: la lesión necrótica se extiende a medida que se mantiene la depleción del flujo sanguíneo al tejido.

Como consecuencia de la lesión infartada, se reduce de manera progresiva la capacidad contráctil del corazón para expulsar un volumen sistólico (VS) normal, dando lugar a la disminución de la Fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI), entendiendo como tal, el porcentaje de sangre que el ventrículo izquierdo bombea hacia la arteria aorta (>55%) con cada contracción, ya que nunca permanece totalmente vacío (Frank et al., 2012). De esta forma, el gasto cardiaco: volumen de sangre/minuto que se necesita para una correcta perfusión sanguínea por todos los tejidos del organismo (5 litros/minuto), también se ve afectado por la no contractilidad de una región necrosada del miocardio, lo que da lugar a una disfunción ventricular: insuficiencia cardiaca, que dispara con el tiempo la ocurrencia de mecanismos que tienden a compensar la incapacidad del corazón, haciendo hipertrofia ventricular izquierda, para intentar eyectar la máxima cantidad de sangre. Sin embargo, a medio plazo el problema se agrava, ya que la luz del ventrículo presenta cada vez un volumen menor (McKay et al., 1986). Por todo ello podemos afirmar que la disfunción del ventrículo izquierdo está, por tanto, relacionada con el tamaño del IAM.

Actualmente, el procedimiento clínico más extendido para minimizar el daño por necrosis producido por la isquemia y recuperar la función miocárdica se basa en desocluir mediante un cateterismo la región o regiones de la o las arterias ocluidas, permitiendo de nuevo la correcta perfusión sanguínea al tejido: fenómeno conocido como reperfusión (Frank et al., 2012). Sin embargo, este procedimiento lejos de ser beneficioso, entraña un daño tisular intrínseco ya que la restauración del flujo sanguíneo, viene acompañada de un proceso de superoxigenación (Gottlieb et al., 1994; Ibáñez et al., 2017). Cuando esto ocurre, se generan gran cantidad de radicales libres, principalmente especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan al endotelio vascular, propiciando la activación del sistema inmune, lo que desencadena una respuesta inflamatoria en el área lesionada. Esto, conlleva la llegada masiva de neutrófilos y macrófagos al tejido, y una liberación orquestada de citoquinas proinflamatorias y metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) que se encargarán de degradar la matriz. Posteriormente, tiene lugar una proliferación excesiva de fibroblastos que reemplazan la matriz degradada por una matriz fundamentalmente de colágeno, produciéndose una cicatrización del tejido. El resultado de un desequilibrio en este proceso,

es el de la pérdida de contractilidad en una región del corazón, cuya extensión varía en función del grado de necrosis miocárdica. (Cohn et al., 2000; O'Rourke et al., 2019).

Por todo ello, se considera que el remodelado cardiaco es un factor determinante en el desarrollo de la insuficiencia cardiaca, entendida como la incapacidad del corazón para mantener un correcto gasto cardiaco (Steg et al., 2004).

EMMPRIN

EMMPRIN, por sus siglas en inglés (Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer) o CD147, es una glicoproteína transmembrana, de 58 kDa miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas, descrita por vez primera en 1982 en un ensayo de cocultivo de células tumorales de fibroblastos, como un estimulador de la producción de metaloproteinasa de matriz MMP-1 (Ge et al., 2015). En las décadas posteriores, se ha observado su presencia en diferentes tipos celulares tales como fibroblastos, monocitos, cardiomiocitos y plaquetas (Schmidt et al., 2008). En cuanto a su estructura, se compone de una cola citoplásmica, un dominio transmembrana sobre el cual recae la actividad receptora y otro extracelular que comprende dos dominios similares a IgG (EC1 y EC2). El primer dominio interviene en la activación de metaloproteasas, mientras que el segundo participa en la unión con otras proteínas para las que EMMPRIN actúa como receptor (Cuadrado et al., 2016).

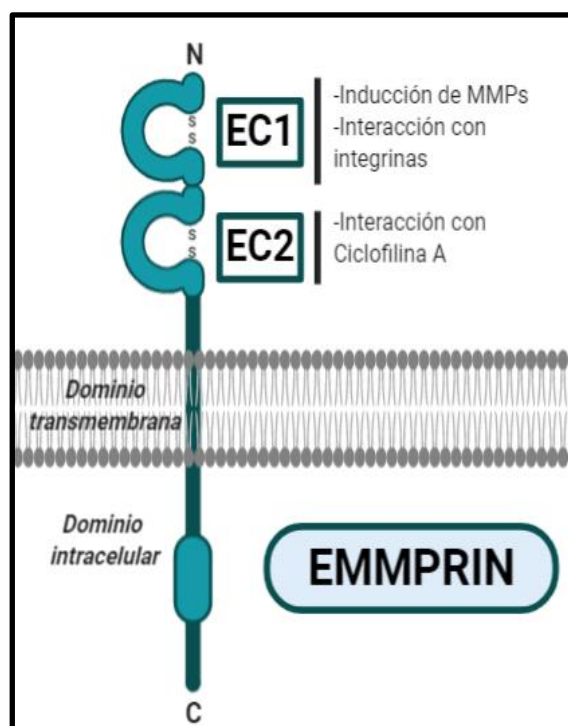


Figura1. Estructura de EMMPRIN. Fuente: Elaboración propia

EMMPRIN O CD147 participa en varios procesos fisiológicos, como la espermatogénesis, fertilización, desarrollo de la retina, además de en la progresión de varias enfermedades entre las cuales se incluyen la aterosclerosis, artritis reumatoide e infecciones, sin embargo, su función más caracterizada es su papel en la metástasis como inductor de metaloproteasas y más recientemente, nuestro grupo de investigación ha demostrado su especial implicación en el desarrollo y progresión de enfermedades cardiovasculares, incluyendo el infarto agudo de miocardio (Cuadrado et al., 2016).

La actividad de EMMPRIN depende de que sufra modificaciones post-transcripcionales; en concreto, su N-glicosilación, lo que supone poder hallar formas altamente (45-65 kDa) o bajamente (en torno a 32 kDa) glicosiladas de la misma, siendo las formas altamente glicosiladas, las que sostienen un mayor nivel de activación proteica (Bai et al., 2014; Von Ungern-Sternberg et al., 2018). Por tanto, la activación de EMMPRIN supone un evento decisivo a la hora de perpetuar la cascada inflamatoria que se dispara tras el periodo de isquemia/reperfusión.

EMMPRIN en enfermedades cardiovasculares

Como nuestro laboratorio ha podido comprobar, en respuesta a un IAM, se produce un aumento notable de las formas altamente glicosiladas de EMMPRIN en monocitos y cardiomiocitos e induce la activación de varias metaloproteinasas de matriz incluidas MMP-9 y MMP-13 (Cuadrado et al., 2016; Lizarbe et al., 2008). Estas enzimas una vez activas, provocan una degradación proteolítica de la matriz, por lo que se consideran como una de las principales moléculas implicadas en el remodelado cardiaco que sucede a un IAM. Como se ha explicado en el apartado anterior, la sobreexpresión de MMPs en respuesta a IAM está asociada a un remodelado adverso lo que se traduce en un peor pronóstico para el paciente post-infarto en forma de una IC más severa y cronificada en el tiempo (Cohn et al., 2000; Cook et al., 2016). Por otra parte, y no por ello menos importante, el incremento en los niveles de expresión de EMMPRIN en los cardiomiocitos y monocitos del tejido afectado se correlaciona con un incremento en la liberación de ROS y citoquinas proinflamatorias, entre las que destaca la interleucina-6 (IL-6), perpetuando la cascada de activación inflamatoria (Ge et al., 2015). Además, también se ha podido observar que la ciclofolina A (CYPA) actúa como el principal ligando a nivel extracelular del receptor EMMPRIN y al unirse a su dominio EC2, pone en marcha y regula cascadas de señalización intracelular de tipo proinflamatorio, como lo es la mediada por la liberación del TNF-alfa, que activa a monocitos los cuales se diferencian a macrófagos y que finalmente liberan las MMPs (Seizer et al., 2010). Todo ello sugiere que EMMPRIN contribuye al infarto a través de la inducción de MMPs, por medio de diferentes vías de señalización, lo cual muestra una regulación compleja aún por estudiar.

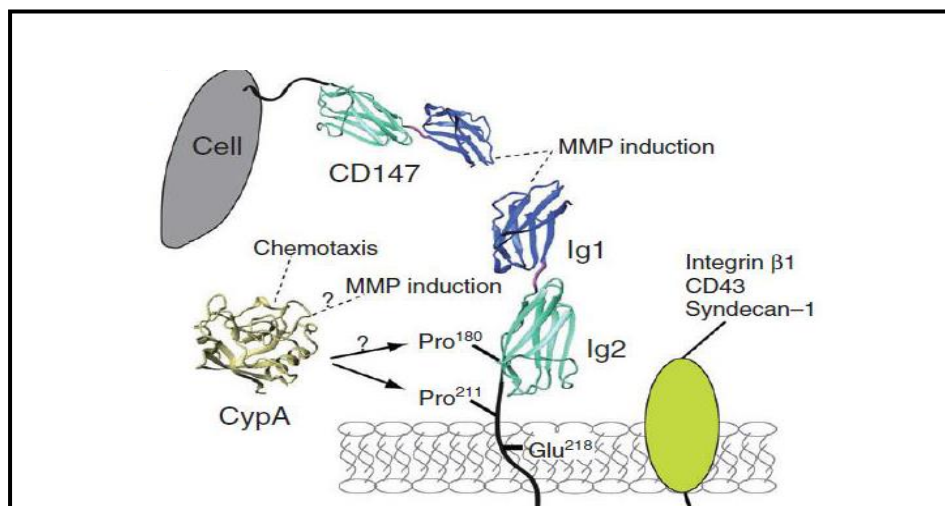


Figura 2. Representación esquemática de la interacción de EMMPRIN (CD147) con MMPs y con la unión a CypA. Fuente: Yurchenko, 20.10

Metaloproteinasas de Matriz Extracelular en Isquemia/Reperfusión miocárdica

Como hemos comentado con anterioridad, las Metaloproteinasas de Matriz Extracelular, son una de las principales moléculas implicadas en el remodelado cardíaco que sucede a un IAM. Las MMPs, son un grupo de enzimas proteolíticas dependientes de Zinc, secretadas por células musculares lisas, endoteliales, monocitos, macrófagos, células T y por los propios cardiomiocitos en forma de proenzimas (zimógenos inactivos) (Visse & Nagase, 2003).

Como hemos comentado con anterioridad, las Metaloproteinasas de Matriz Extracelular, son una de las principales moléculas implicadas en el remodelado cardíaco que sucede a un IAM. Desde el punto de vista fisiológico, su actividad es esencial durante la embriogénesis, siendo partícipes del desarrollo cardiovascular y óseo, así como de la reparación de heridas. Es fundamental su papel durante procesos como la dentición y juegan un papel decisivo durante la fase folicular tardía del ciclo ovárico (Ge et al., 2015). Sin embargo, cuando escapan del control transcripcional o se exponen en determinados ambientes a procesos que conllevan su activación, dan lugar a la progresión de diversas patologías, entre las que incluimos enfermedades oncológicas y cardiovasculares, habiendo nuestro grupo hecho aportaciones significativas al respecto (Cuadrado et al., 2016; Lizarbe et al., 2008; Ramirez-Carracedo et al., 2018; Tarin et al., 2011).

En cuanto a su activación, requieren de un procesamiento proteolítico, ya que mantienen su estado de proenzima, por medio de la unión de un átomo de Zn^{2+} a un residuo de cisteína impidiendo la interacción de una molécula de agua con el catión. Por lo tanto, es necesaria la hidrólisis de la unión zinc-cisteína para liberar el propéptido y mantener libre el centro catalítico

(Phatharajaree et al., 2007). De entre los distintos mecanismos que intervienen en la activación de las MMPs, destacamos especialmente el papel que ejerce EMMPRIN (Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer).

EMMPRIN, se sintetiza en condiciones inflamatorias y su papel como activador de metaloproteinasas está directamente relacionado con su procesamiento post-transcripcional. En concreto, formas altamente glicosiladas de EMMPRIN suponen la formación de agregados en las membranas, lo que conlleva a su activación como inductores de MMPs (Ramirez-Carracedo et al., 2018).

Como nuestro laboratorio ha podido comprobar, tras un IAM se produce un aumento notable de las formas altamente glicosiladas de EMMPRIN en los cardiomiocitos y monocitos, lo cual explica a su vez el incremento de MMP-9 (gelatinasa) y MMP-13 (colagenasa) que se observan mayoritariamente en el corazón infartado (Cuadrado et al., 2016; Lizarbe et al., 2008; Ramirez-Carracedo et al., 2018). Como se ha explicado en el apartado anterior, durante el infarto, estas enzimas proteolíticas juegan un papel clave en la remodelación vascular actuando durante la fase inflamatoria, digiriendo la matriz y favoreciendo la extravasación de proteínas plasmáticas que dará lugar al infiltrado leucocitario (Liu et al., 2006).

En base a esto, consideramos que es crucial ahondar en estos mecanismos moleculares ya que suponen el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares.

Nanotecnología aplicada a las enfermedades cardiovasculares.

La nanotecnología es hoy en día una de las disciplinas con mayor potencial para el tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo las cardiovasculares, y entre sus múltiples aplicaciones, destaca su uso como agente teragnóstico (doble funcionalidad diagnóstica y tratamiento) en un número significativo de patologías. Nuestro grupo de trabajo ha investigado sobre el uso de EMMPRIN como una diana terapéutica, procediendo inicialmente a su inhibición mediante el uso de anticuerpos específicos antiEMMPRIN en modelos murinos de infarto agudo de miocardio (Tarin et al., 2011).

Sin embargo, debido a la inmunogenicidad que conlleva el uso de estas herramientas en el paciente, y dado el elevado número de efectos secundarios, procedimos a utilizar péptidos con capacidad de unión específica a EMMPRIN, vehiculizándolos en forma de nanopartículas para su correcta distribución. En concreto, utilizamos nanopartículas paramagnéticas basadas en micelas cargadas con gadolinio (reactivo de contraste para la resonancia magnética), conjugadas con rodamina (un flurocromo para poder visualizar la partícula mediante histofluorescencia como mecanismo control) y con un péptido de unión específica a EMMPRIN: AP9 a las que nos referiremos como NAP9 (ver materiales y métodos). Este péptido, posee eficacia demostrada en la inhibición de EMMPRIN en el sistema cardiovascular, como previamente hemos detectado, o en su lugar, un péptido de igual composición aminoacídica pero con distinto orden secuencial (scramble, ver estructura de las NPs en secciones posteriores) (Cuadrado et al., 2016).

Además, estudios previos de nuestro laboratorio, han comprobado empleando un modelo porcino de IR, la citotoxicidad y biodistribución de la nanopartícula, detectándose por un lado, una ausencia total de toxicidad a una dosis de 10 mg/kg y además, se observó que NAP9 se incrementa en el corazón tras el periodo de IR, observándose tras este evento una mejora en la contractilidad del miocardio respecto a los controles, junto con un descenso relativo de diversas metaloproteinasas que también se observa en placas de ateroma tratadas con este péptido (Ramírez et al., 2019).

En base a lo expuesto, el uso de nanopartículas, se presenta como una alternativa eficaz y prometedora ante el uso de anticuerpos, ya que al ser moléculas más pequeñas evitan una reacción inmunológica cruzada. En este trabajo planteamos un diseño experimental basado en el bloqueo selectivo de EMMPRIN mediante el uso de NAP9, analizando la posible cardioprotección que pueda suponer su administración tras un infarto agudo de miocardio.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La inhibición de EMMPRIN, se plantea como un enfoque terapéutico prometedor para el tratamiento de diversas patologías, debido a su actividad como inductor de las metaloproteinasas de matriz extracelular, con todo lo que ello supone.

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha demostrado su especial implicación en el desarrollo y progresión de enfermedades cardiovasculares, incluyendo el infarto agudo de miocardio. EMMPRIN aumenta su expresión en monocitos y cardiomiocitos e induce la activación de varias MMPs, entre ellas MMP9 marcador tisular por excelencia de remodelado adverso, lo que se traduce en un peor pronóstico para el paciente post-infarto en forma de una IC más severa y cronificada en el tiempo. En virtud de todo ello, **nos planteamos como hipótesis de trabajo, si la inhibición de la actividad de EMMPRIN en un modelo porcino de isquemia-reperfusión coronaria a través de nanopartículas conjugadas con AP9 (péptido de 12 aminoácidos) con afinidad de unión a EMMPRIN, poseía un efecto cardioprotector tras un infarto agudo de miocardio.**

Utilizando un modelo porcino de shock cardiogénico e ICA tras un infarto agudo de miocardio y en base a los datos expuestos con anterioridad, **nos planteamos los siguientes objetivos:**

1. Estudiar si el tratamiento con NAP9 presenta un efecto cardioprotector frente a la progresión del infarto de miocardio en un modelo porcino de isquemia/reperfusión coronaria mediante inflado de balón de angioplastia en la arteria coronaria descendente anterior por cateterismo percutáneo femoral.

2. Estudiar si la administración de nanopartículas que contienen el péptido de unión específica a EMMPRIN (AP9), denominadas NAP9 son capaces de inducir o no la mejora de la función cardiaca de animales sometidos a un infarto agudo de miocardio.
3. Estudiar si la administración de NAP9 es capaz de reducir de manera significativa los niveles circulantes de la metaloproteinasa 9, principal enzima proteolítica expresada en respuesta al infarto agudo de miocardio, y responsable en gran medida del remodelado cardiaco adverso, comparando los resultados con el de los mismos animales en los que hemos inyectado la nanopartícula control NAP9SC.
4. Determinar la tipología de las fibras de colágeno que se encuentran en mayor proporción tras un infarto de miocardio en animales tratados con NAP9 o NAP9SC, evidencia del remodelado cardiaco correcto o adverso, indicativo de la diana molecular por la que NAP9 pudiera ejercer un efecto terapéutico frente a esta patología cardiovascular.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MODELO EXPERIMENTAL

1.1 Animales de experimentación

Para el presente estudio, se emplearon 6 cerdos (n=6) (hembras) de la estirpe Large White (36+/- 5 kg) (Agropardal, Cuenca, Spain). Los procedimientos quirúrgicos se han llevado a cabo en el Departamento de Cirugía Experimental del Hospital Universitario La Paz en Madrid, en conformidad con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicada por el Instituto Nacional de Salud (NIH Publicación No.85-23 revisada 1985) y con el Comité de Ética de la Investigación y de Bienestar Animal, en cumplimiento con EU Directive on experimental animals y en base a la legislación española (RD 53/2013). PROEX 138/17.

1.2 Modelo experimental de Isquemia/ Reperusión en coronaria

La investigación se realizó siguiendo un modelo porcino de shock cardiogénico e IC post- IAM mediante la oclusión de la arteria coronaria descendente anterior (DEA), por medio de un cateterismo e inflado de un balón de angioplastia colocado entre la segunda y tercera diagonal, con la finalidad, independientemente de todos los procedimientos técnicos, de personal de apoyo e instrumental quirúrgico de generar un proceso patológico, lo más similar posible a lo que ocurre en el paciente con IC que sobrevive a la isquemia y posterior reperusión miocárdica con una respuesta inflamatoria aguda significativa que pasa a ser una fibrosis miocárdica severa.

De manera previa a la cirugía, los animales se anestesiaron con ketamina intramuscular (10 mg/Kg, Pfizer, Nueva York, EE. UU) y midazolam (0,5 mg/Kg, Braun, Germany). La anestesia se indujo por inhalación de isoflurano (Abbvie, Madrid, Spain) y se mantuvo mediante

infusión continuada de propofol 2mL/kg/h, fentanilo 50 ug/kg/h y diazepam 10 ug/kg/h (Roche, Hoffman, Germany).

Tras el efecto anestésico, los animales fueron monitorizados y sometidos a intubación endotraqueal, manteniendo al animal con ventilación mecánica en todo momento. Antes y durante el periodo de isquemia, se administró noradrenalina (0,4 ug/kg/min Braun, Germany) en perfusión, como soporte activo para evitar la hipotensión del animal infartado. Se realizó una ecocardiografía basal para conocer los valores de volumen final diastólico y sistólico, así como la frecuencia cardíaca y la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) antes de realizar el procedimiento experimental.

Para realizar el protocolo de modelo infarto, se canalizó mediante cateterismo, la arteria femoral con un introductor 6F heparinizado para evitar posibles coágulos. Posteriormente, se introdujo el balón de angioplastia a través de un catéter guía (JL3, 6F, Coordis) hasta llegar a la segunda diagonal de la DEA, donde finalmente se posicionó. Una vez confirmado el correcto posicionamiento del balón, mediante la administración de contraste y visualización por Rayos X, éste se infló a 4-6 atmósferas, sometiendo de manera previa al corazón a un estado de preconditionamiento cardíaco, ocluyendo la DEA en series de isquemia y posterior reperfusión de tiempos: 1, 3 y 5 minutos, con el objetivo de inducir un nivel de cardioprotección suficiente como para que el sujeto no fallezca durante la intervención (Niato et al., 2020). (Ver figura 1 de los anexos). Posteriormente, procedimos a ocluir la DEA durante 45 minutos.

Una vez transcurrido este tiempo, procedimos a la reperfusión coronaria mediante desinflado del balón, momento crítico del procedimiento debido a la superoxigenación inducida, que desencadena comportamientos arrítmicos en muchas ocasiones, los cuales propician que el corazón entre en procesos de taquicardia y posterior fibrilación ventricular, confirmada mediante la monitorización en todo momento del ECG del animal.

En el caso en que se generase un proceso de fibrilación ventricular, procedimos a desfibrilar al animal mediante desfibrilación cardíaca (DC) de 100-300 Julios, combinado con masaje cardíaco si fuere requerido. Tras comprobar que las variables hemodinámicas del animal se encontraban estables, procedimos a la administración intravenosa de la nanopartícula o placebo tras 60 minutos de infarto. Una vez terminado y con los parámetros hemodinámicos estables, se realizó una nueva ecocardiografía para comprobar la funcionalidad cardíaca tras el infarto, y se procedió a la eliminación de la ventilación mecánica.

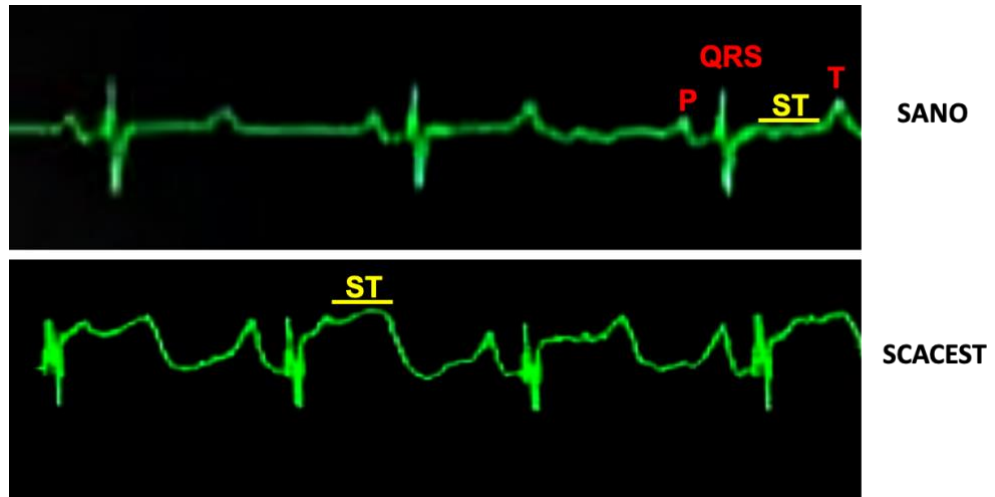


Figura 3. Electrocardiograma durante el procedimiento. Panel superior: electrocardiograma de cerdo sano. Panel inferior: Electrocardiograma del mismo cerdo tras la oclusión de la DEA, observando la elevación del segmento ST, indicativo de sufrir un infarto de miocardio con elevación del segmento ST. Corazón del mismo cerdo con síndrome coronario con elevación del segmento ST (STEMI o SCACEST). Fuente: Elaboración propia



Figura 4. Desfibrilación cardíaca del animal infartado. Fuente: Elaboración propia

A los 21 días de reperfusión, se evaluó nuevamente la función miocárdica mediante ecocardiografía. Tras el análisis de funcionalidad, se re-cateterizó al animal inflando el balón de angioplastia en la misma posición de la arteria coronaria descendente anterior, y paralelamente, se introdujo un catéter Pigtail mediante acceso femoral izquierdo, con el que

se insuflaron 200 ml de colorante Evans Blue 5% (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EE. UU) directamente en el ventrículo. Tras 2 minutos, se sacrificó al animal, mediante la administración de cloruro potásico y se extrajo el corazón mediante estereotomía, el cual se sometió a varios lavados con suero fisiológico para eliminar el exceso de colorante. Los corazones se congelaron a -20°C durante 24h y al día siguiente, los corazones se seccionaron en cortes de 0,5 cm de grosor y se incubaron en una solución de TTC al 1% (Sigma Aldrich, EE. UU) durante 20 minutos a 37°C. Finalizado este tiempo, se incubaron en solución de Paraformaldehído al 10% (Sigma Aldrich, EE.UU).

Se evaluó la morfología y tamaño del infarto considerando la porción teñida con Evans Blue como zona sana, la porción teñida de rojo como zona de riesgo y la zona blanca sin teñir como zona de infarto. El área infartada se midió en forma de porcentaje frente al área de riesgo para evaluar el tamaño y morfología del infarto.

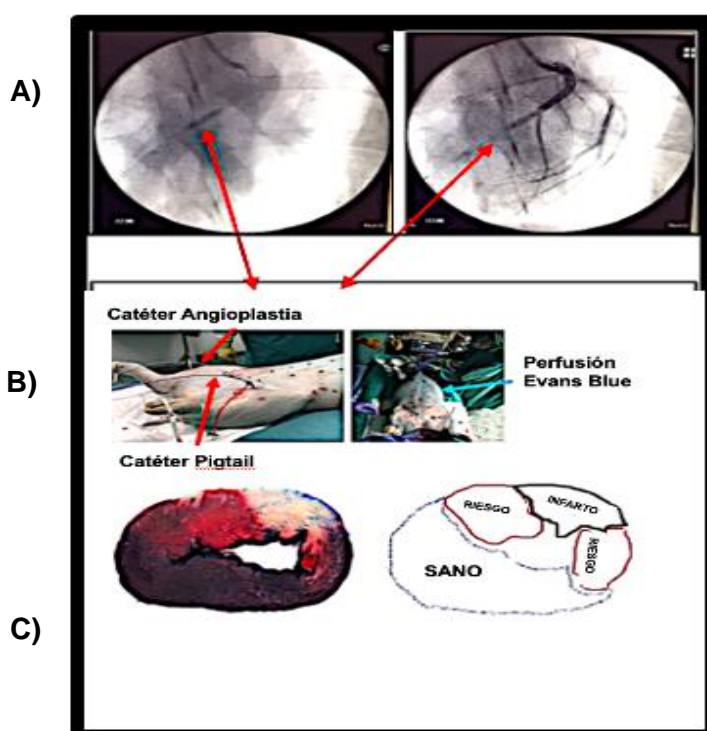


Figura 5 Imágenes del procedimiento quirúrgico. Fuente: Elaboración propia. **Panel superior (A).** Angiografía coronaria porcina mostrando el balón de angioplastia inflado dentro de la arteria coronaria descendente anterior (**izquierda**), insuflando reactivo de contraste (**derecha**) para verificar la ausencia de flujo sanguíneo. **Medio izquierda (B).** Angioplastia de las dos femorales en donde se introduce un catéter de angioplastia por la femoral derecha y un catéter pigtail por la izquierda hasta alcanzar el ventrículo izquierdo. **Medio derecha.** Animal en el que se perfunde EvansBlue a través del pigtail (coloración azul del animal). **Inferior (C).** Sección de 5 mm del ventrículo izquierdo de cerdo sometido a la perfusión con Evans blue. El corazón aislado se somete al corte en secciones de 5 mm y se tiñe con reactivo TTC, gracias a lo cual se detecta la zona sana (azul), zona de riesgo (rojo) y zona necrosada / infartada (blanco).

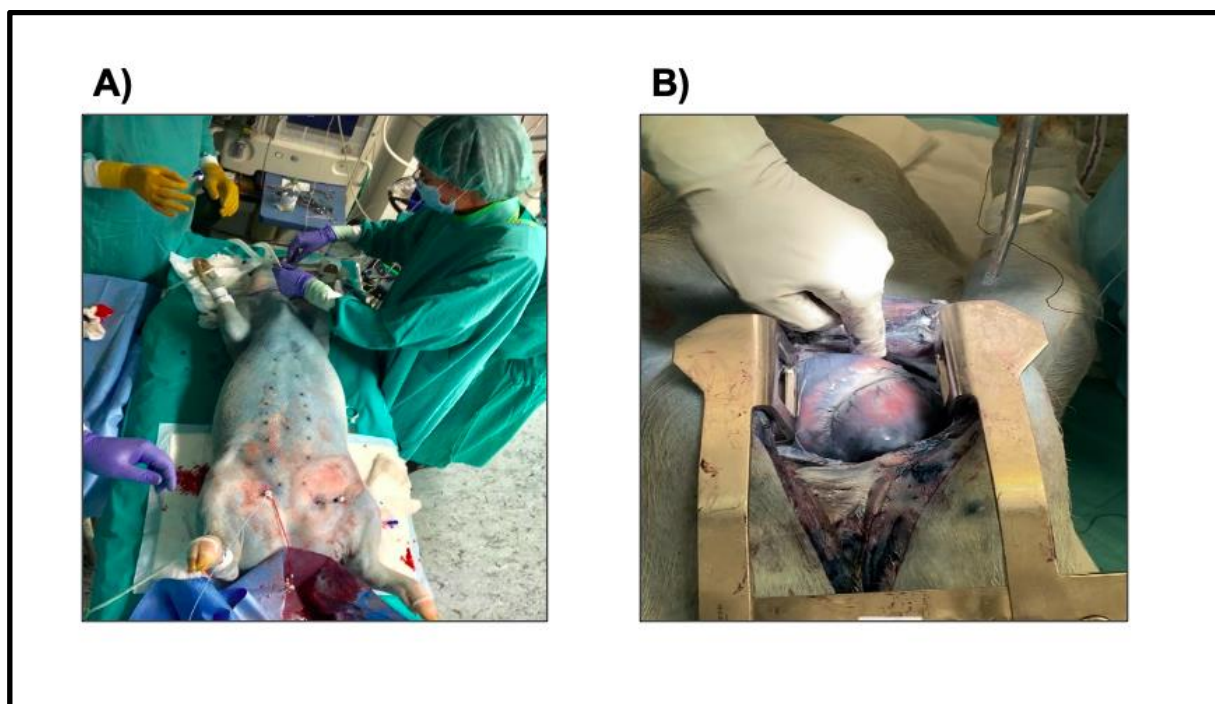


Figura 6 A. Perfusión de Evans Blue por el ventrículo izquierdo. B Estereotomía del corazón infartado. Fuente: Elaboración propia

1.3 Nanopartículas

Para este trabajo utilizamos nanopartículas lipídicas paramagnéticas (NPs). Las NPs se sintetizaron a partir del método de hidratación de una película lipídica, en este caso compuesta por gadolinio como agente de contraste en su forma salina Gd-DTP A-bis (GdDTP A-BSA), 1,2-diestearoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi (polietilenglicol) -2000] (DSPE-MPEG2000), DSPE-PEG2000-maleimida y Rodamina-PE. Los lípidos se disolvieron primero en una solución de cloroformo/metanol para obtener una película lipídica delgada que posteriormente se rehidrató en buffer HEPES. A continuación, se aplicaron técnicas de agitación mecánica a 65°C durante 1 hora para generar las nanovesículas de tamaño nanométrico.

Las NPs obtenidas han de experimentar una segunda etapa de biofuncionalización para poder ser empleadas *in vivo*. Dada su naturaleza hidrofóbica han de encapsularse en estructuras de tipo micelar, para lo que se intercalan los materiales del núcleo magnético con compuestos orgánicos hidrófobos (fosfolípidos) que interactúan con los materiales hidrofílicos de naturaleza polisacárida del surfactante que recubre la nanopartícula, manteniéndolo unido (Salinas, 2013).

El péptido AP9 : YKLPGHHHHYRP o en su defecto el péptido AP9-scramble: HYJLPGHRHPYHK cuentan con un residuo de cisteína que interactúa con la maleimida, la cual permanece unida al polietilenglicol, material que conforma el surfactante (Cuadrado et al., 2016). De esta forma, se logra la biocompatibilidad y estabilización del conjunto a la par de que le es otorgado funcionalidad específica. Para determinar el número aproximado de

péptidos AP9 conjugados por nanopartícula se siguió el método HPLC (High Performance Liquid Chromatography, Cromatografía Líquida de Alta Eficacia). Las partículas con AP9 conjugado se denominaron **NAP9**, mientras que las que se conjugaron con el péptido scramble se denominaron **NAP9SC**.

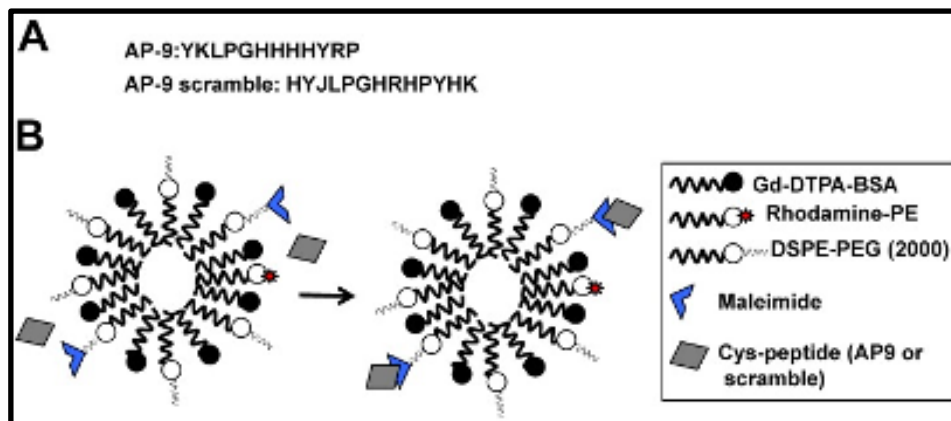


Figura 7. A Secuencia peptídica de AP9 y del péptido control AP9-Scramble. **B** Estructura de las Nanopartículas NAP9 y NAP9SC. Fuente: (Cuadrado et al., 2016)

Para el tratamiento con las nanopartículas, procedimos a la administración de NAP9 o NAP9SC por vía intravenosa a la dosis de 0,1 mg/kg de peso del animal. Este volumen, se diluyó en un total de 40 ml de suero fisiológico, administrándolas en dos bolos de un minuto de duración cada uno. **La administración de la nanopartícula o scramble, se realizó a los 60 minutos post IAM, a los 7 y a los 14 días de reperfusión.**

1.4 Ecocardiografía

La ecocardiografía se llevó a cabo para determinar la funcionalidad del ventrículo izquierdo, usando el ecógrafo Vivid Q ultrasound de GE, equipado con una sonda de entre 1.9 - 4 MHz. Cada animal se analizó en los siguientes tiempos: basal previo al infarto, tras el mismo y a los 7, 14 y 21 días posteriores a la reperfusión coronaria.

Para realizar el procedimiento, se captaron imágenes del eje parasternal, siendo evaluados los siguientes parámetros: Grosor del tabique intraventricular diastólico (IVS), Diámetro interno de sístole y diástole en ventrículo izquierdo (LVID), Grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo en sístole y diástole (LVPW), Fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI), Fracción de acortamiento del ventrículo izquierdo (FS), Frecuencia cardiaca (FC) y Gasto cardíaco (GC). El mismo operador se encargó de la adquisición y el análisis de datos para evitar el error inter-observador.

1.5 Recogida de Muestras

Plasma sanguíneo

Se extrajo de cada cerdo un total de 10 ml de sangre venosa aislada de manera previa al procedimiento quirúrgico, tras el procedimiento, y a los 7, 14 y 21 días posteriores al mismo.

Se centrifugó la sangre en tubos con EDTA a 3000 rpm durante 10 minutos para obtener el sobrenadante que corresponde al plasma y se prescinde del hematocrito. Una vez centrifugada la sangre, las muestras se almacenan en tubos Eppendorf y se congelan a -4°C para su posterior utilización.

Tejido cardiaco

Recogimos muestras de secciones de corazón obtenidas a los 21 días del procedimiento quirúrgico. Para ello distinguimos zona sana de zona de riesgo (tejido no necrótico pero que queda bajo el punto arterial ocluido) y zona necrosada (tejido necrótico en el que se aprecia fibrosis miocárdica debido a la isquemia). Además, se utilizaron 12 bloques de tejido correspondientes a 6 corazones de cerdos infartados, embebidos en parafina y fijados en Formalina al 4 % (Sigma Aldrich, EE.UU.).

2. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Tinción Rojo Sirio y visualización por Microscopía de Luz Polarizada

Para identificar la tipología de fibras de colágeno presentes en el corazón tras el IAM, se realizó una tinción con rojo sirio (Sigma Aldrich, EE.UU.) y se observaron los 12 cortes de tejido correspondientes a los 6 corazones de cerdo infartado en un microscopio con filtro de luz polarizada. Los cortes embebidos en parafina, se tiñeron durante 1 hora con rojo sirio a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con etanol, se deshidrataron con xilol durante 5 minutos y se montaron con resina acrílica con base de xileno (DPX).

En el microscopio a campo claro, el colágeno se aprecia de un color rojizo, inmerso en el resto de tejido que se verá de color amarillo. Sin embargo, mediante la visualización por microscopía de luz polarizada, se puede diferenciar en las muestras el tipo de fibras de colágeno presentes en el tejido.

3. WESTERN BLOT

Para determinar la expresión de MMP9 en plasma sanguíneo, se emplearon las técnicas de electroforesis en gel de acrilamida, transferencia de proteínas a membranas de Polifluoruro de Vinilideno (PVDF), y para la detección de la proteína se llevó a cabo el procedimiento correspondiente al western blot con anticuerpos específicos.

Para la correspondiente separación de las muestras mediante electroforesis se empleó 1 µl de plasma sanguíneo junto con un tampón de carga compuesto por B- Mercaptoetanol 1x y tampón Laemli 9x (Bio Rad, California, EE.UU.). Los geles de acrilamida utilizados estaban compuestos de dos fases: fase de concentración (Stacking) y fase de corrida (Running). La composición del gel concentrador fue de 6,72 ml H₂O, 1,2 ml Acrilamida 30:1 (Bio Rad, EE.UU), 1,2 ml de tampón Stack (1x Sigma Aldrich, EE.UU), 120 µl de Persulfato de Amonio 1x (APS) (Bio Rad, EE.UU), y 3,88 l de Tetrametiletildiamina 1x (TEMED) (Bio Rad, EE.UU) y la composición del gel de corrida fue: 8,80 ml de H₂O, 6,33 ml de acrilamida 30:1 (Bio Rad, EE.UU), 85 µl de detergente dodecilsulfato sódico (SDS 20%) (Bio Rad, EE.UU), 2,24 ml de tampón Run 1x (Sigma Aldrich, EE.UU) 3,88 µl de Tetrametiletildiamina 1x (TEMED) (Bio Rad, EE.UU). El porcentaje de acrilamida del gel de corrida fue de 7,5%. La electroforesis se llevó a cabo en un tampón de electroforesis con Tris Glicina 10x y SDS 20% (Bio Rad, EE.UU) a 100 Voltios constantes. Una vez finalizada, los geles fueron transferidos a un equipo de

electrovoltaje a membranas de fluoruro de polivinilo PVDF (Thermo Fisher, EE. UU) previamente hidratadas con metanol, a voltaje constante de 25 Voltios durante 10 minutos, en un tampón de transferencia compuesto por 150 ml de H₂O, 50 ml de metanol y 50 ml tampón de electrotransferencia Tris Glicina 10x (Bio Rad, EE. UU).

Una vez que nuestra proteína se transfiere a la membrana, se incubó durante 2 horas con Albúmina Suero Bovina (BSA) (Thermo Fisher, EE. UU), con el objetivo de bloquear al máximo los epítomos de proteínas que pudieran unirse inespecíficamente al anticuerpo utilizado de manera posterior. Posteriormente se incubó con el correspondiente anticuerpo primario disuelto en un tampón compuesto de albúmina de suero Bovino, fracción V (BSA) (Thermo Fisher, EE. UU) al 3% en tampón T-TBS (Thermo Fisher, EE. UU), durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se procedió a eliminar el exceso de anticuerpo no unido, para ello la membrana se lavó 3 veces con T-TBS (Thermo Fisher, EE.UU.), para posteriormente incubarse con el anticuerpo secundario (Abcam, Cambridge, UK) conjugado con BSA y T-TBS (Thermo Fisher, EE. UU) durante 1 hora. Una vez finalizado este tiempo, la membrana se incubó con los reactivos de quimioluminiscencia ECL (Thermo Fisher, EE. UU) durante 1 minuto, para poder llevar a cabo la detección quimioluminiscente en el sistema de análisis de imagen Fusion Solo- S, con el software Fusion-Capt (Vilber Lourmant, Collégien, France) para su análisis.

4. ANÁLISIS DE IMÁGENES

Para el análisis, cuantificación y procesamiento de las imágenes correspondientes a las tinciones de sirius red, westernblot y los corazones de cerdo sometidos a EvansBlue/TTC empleamos el programa ImageJ. Este programa, permite calcular áreas, analizar valores, así como crear histogramas de densidad.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos se analizaron con el paquete de software estadístico (SPSS 22.0, SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). Los valores los hemos expresado como media \pm desviación estándar de la muestra, marcando un nivel de significación al 5%. La significación de las diferencias se comprobó mediante un análisis de la varianza seguido de la modificación de Dunnett de la prueba t de Student.

RESULTADOS

1. El tratamiento con NAP9 contribuye a preservar la función cardiaca al aumentar los valores de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo tras un infarto agudo de miocardio.

Uno de los parámetros más importantes a la hora de evaluar la función cardiaca de una persona es la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI), que mide la cantidad de sangre que el corazón bombea con cada latido. Este parámetro permite conocer el grado de afectación del ventrículo izquierdo, en cuanto a su capacidad contráctil y funcionalidad miocárdica, debido a que cuantifica el porcentaje de sangre eyectada, en este caso a través

del ventrículo izquierdo hacia la arteria aorta durante la sístole ventricular, respecto del total de sangre que permanece en la cavidad sin ser expulsada. Así, la evidencia científica nos ayuda a afirmar que valores de FEVI superiores al 50% se consideran dentro del rango fisiológico.

Por tanto, para evaluar la función miocárdica realizamos un estudio ecocardiográfico, midiendo la FEVI antes del procedimiento quirúrgico (preIR), tras la IR (Tiempo 0), y pasados 7, 14, y 21 días postIR. Como se puede observar en la Figura 8, la inyección intravenosa de 0.1 mg/kg NAP9, fue capaz de recuperar de manera significativa la FEVI a lo largo del tiempo, en comparación con los animales a los que se procedió a la inyección de NAP9SC. A los 14 y 21 días post infarto, se volvió a medir la FEVI detectándose, una recuperación significativa de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo en los cerdos en los que fue inyectado NAP9, en comparación con aquellos en los que se administró NAP9SC.

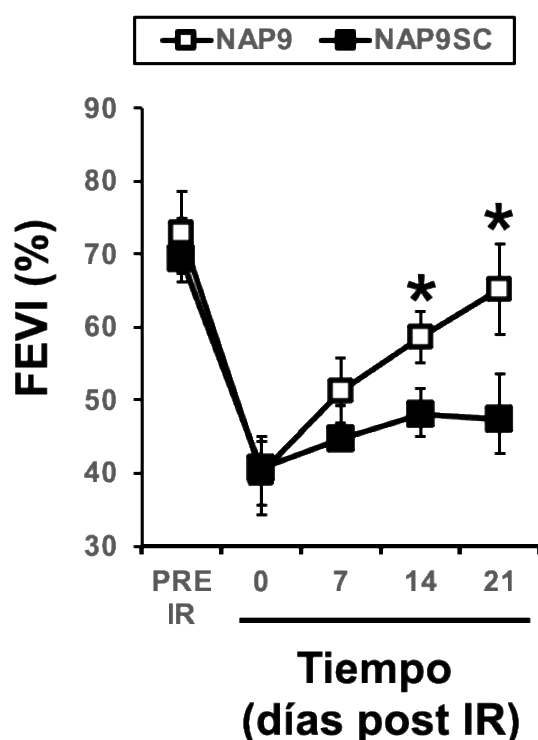


Figura 8. Evaluación de la función cardíaca en cerdos infartados según el tratamiento con NAP9. Representación gráfica de la FEVI a lo largo del tiempo, tras la isquemia/reperfusión (IR) coronaria de los cerdos sometidos a la inyección de 0.1 mg/kg NAP9 (cuadrados con fondo blanco) o NAP9SC (cuadrados con fondo negro) tras la IR. (N=6 cerdos). Valores expresados como media \pm desviación estándar de la muestra. $P < 0.001$ NAP9 vs NAP9SC 14 y 21 días post IR.

2. El tratamiento con NAP9 posee un efecto cardioprotector reduciendo el tamaño del infarto de miocardio.

Tras el análisis de la funcionalidad del miocardio, parámetro más importante del presente Trabajo de Fin de Grado, quisimos comprobar si el posible efecto cardioprotector de NAP9, sucedía a través de la prevención de la necrosis miocárdica, ya que, en muchas ocasiones, pacientes con FEVI deprimida presentan una estructura anatómica hiperfuncional como mecanismo compensatorio a corto plazo de la pérdida de contractilidad.

Por este motivo, quisimos analizar especialmente el porcentaje de necrosis que sucede a los 21 días después del infarto de miocardio, en función del tratamiento recibido.

Para ello, se re-cateterizó nuevamente al animal inflando el balón de angioplastia en la misma posición inicial de la arteria coronaria, e introduciendo en esta ocasión por la arteria femoral izquierda, un segundo catéter en el ventrículo izquierdo (Fig 5B, catéter Pigtail), por el que se insufló directamente al ventrículo, colorante de Evans Blue, el cual perfunde intracelularmente a los tejidos sanos.

Como se aprecia en el corazón presente (la oclusión de la arteria coronaria descendente anterior de la figura 9, se practicó en el mismo punto durante el infarto original), el Evansblue no perfunde a toda la zona bajo la oclusión, aun siendo una parte del corazón todavía viable (área de riesgo).

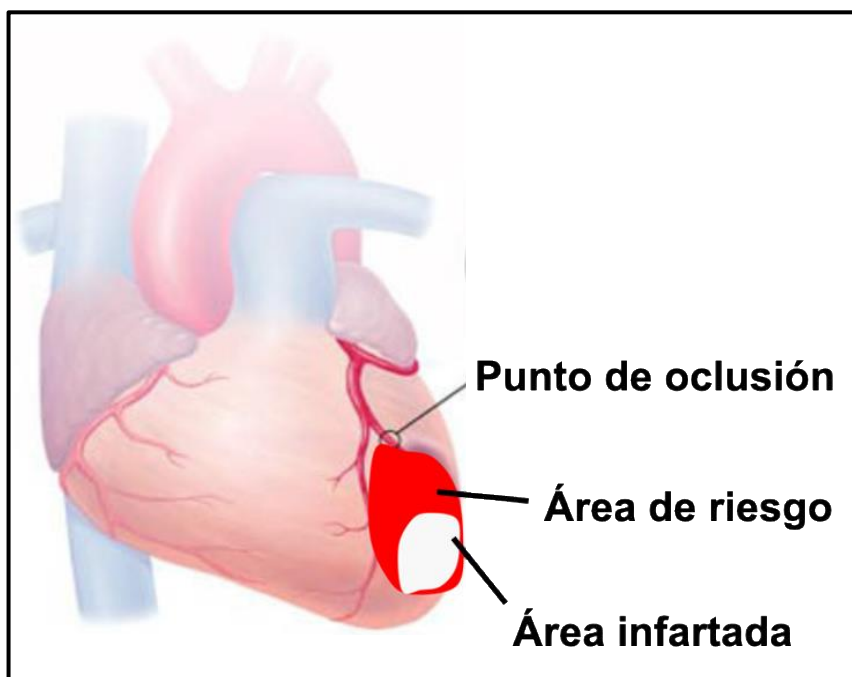


Figura 9. Representación gráfica del corazón tomado tras el sacrificio del animal en el que se distingue el área de riesgo y área infartada. Fuente: Elaboración propia

Tras la perfusión del Evans Blue, se procedió al sacrificio del animal mediante la administración de cloruro potásico, para que se pueda producir la detención del corazón en

diástole ventricular. A continuación se extrajo el corazón mediante estereotomía (Fig 6B) y se llevó a cabo la evaluación morfológica de la extensión del infarto. Para ello, procedimos a la obtención de secciones de 0.5 cm de grosor del corazón de los animales para su tinción con el reactivo de TTC (Ver métodos). En este caso, el TTC penetrará en aquellas células que no se encontraban necrosadas, aportando una coloración rojiza, distinguiendo de esta manera el área de riesgo respecto al área necrosada (en la que no penetra el TTC y por tanto no nos aporta ninguna coloración).

Gracias a esta técnica, evitamos los sesgos anatómicos en cuanto al tamaño de los corazones y a la distancia del ápex con respecto a las diagonales utilizadas como referencia de la oclusión, ya que los datos los hemos representado como porcentaje respecto al área de riesgo. Así, la doble tinción Evans Blue /TTC (Figura 5 C), nos permitió confirmar que **el efecto cardioprotector de NAP9 se debe a la preservación del tejido miocárdico vivo en una superficie mayor a la de los cerdos tratados con NAP9SC** (Figura 10).

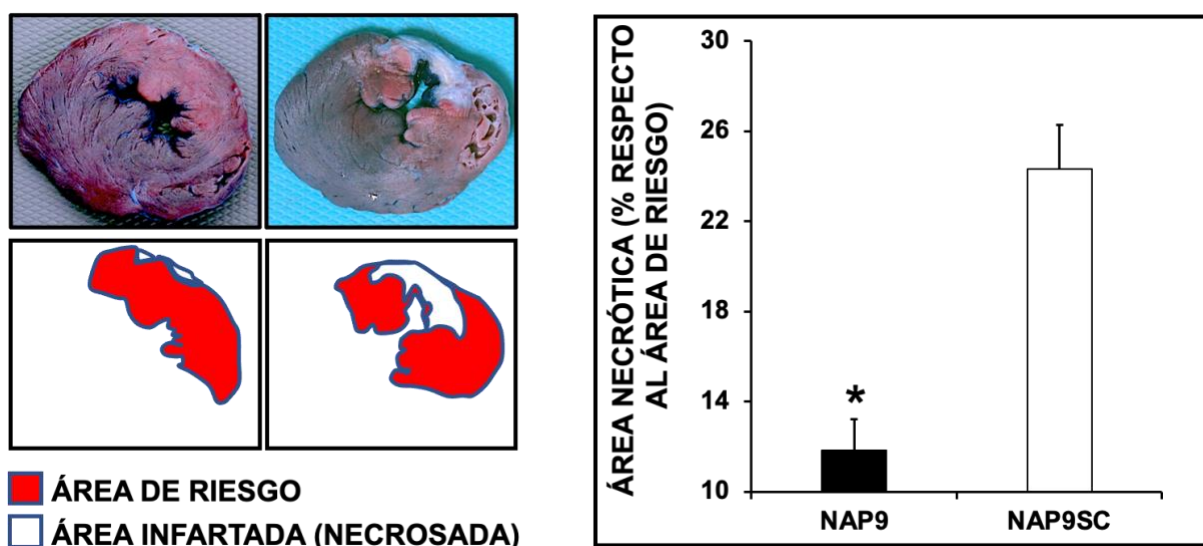


Figura 10. Efecto de NAP9 sobre el tamaño del infarto. Paneles de la izquierda. Secciones de corazones sometidos a IR y tratados mediante inyección IV con 0.1 mg/kg NAP9 o NAP9SC. Pasados 21 días los animales fueron sometidos a la perfusión con Evansblue (ver metodología) y tras el sacrificio, aislamos los corazones que fueron cortados en secciones de 0.5 cm y teñidos con el reactivo de TTC, para calcular el área infartada (blanco) respecto al área de riesgo (rojo). **Panel derecho:** representación gráfica de los valores medios del área infartada de los corazones (N=6) cerdos. Valores expresados como media \pm desviación estándar de la muestra. $P < 0.001$ NAP9 vs NAP9SC).

3. El tratamiento con NAP9 disminuye la expresión de MMP9 en plasma sanguíneo de animales infartados.

MMP9 es una metaloproteinasa que se expresa de manera muy significativa tanto por cardiomiocitos como por infiltrados leucocitarios en respuesta a la isquemia miocárdica, participando de manera decisiva en el remodelado cardiaco que tiene lugar durante el infarto. La expresión incontrolada de **MMP-9 es un claro indicativo de remodelado adverso** que

desencadena un proceso de insuficiencia cardiaca, lo que hace que su cuantificación suponga una herramienta de diagnóstico tisular muy eficaz para evaluar la extensión del remodelado post-infarto. Por este motivo, procedimos a la detección en el plasma de los niveles de esta proteína como marcador de progresión de remodelado, observando cómo la administración de NAP9 redujo de manera significativa los niveles plasmáticos de esta metaloproteínasa a los 21 días posteriores al infarto agudo de miocardio, lo que sugiere que el efecto cardioprotector de NAP9 puede estar mediado a través de la inhibición de la actividad proteolítica, la cual está implicada en la degradación de la matriz extracelular del tejido contráctil (Figura 11).

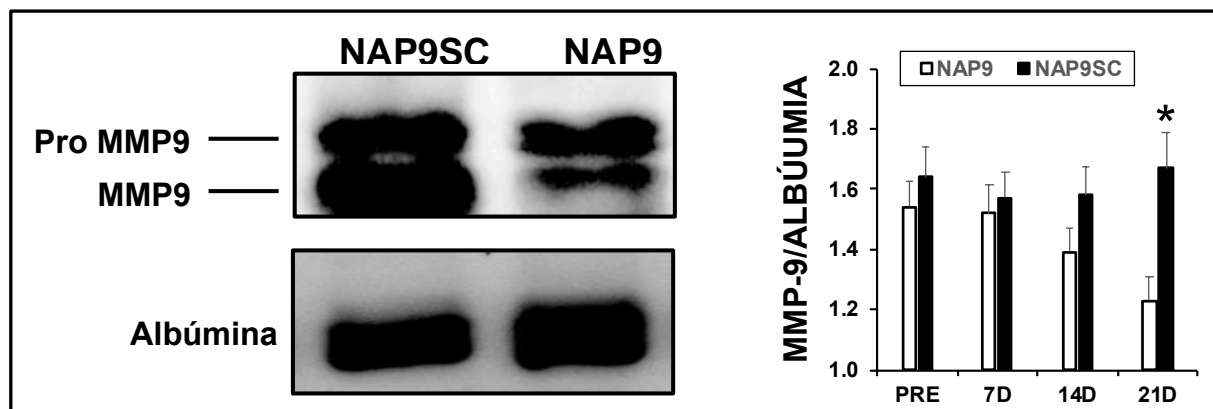


Figura 11. Detección de MMP-9 en plasma. Paneles de la izquierda. Detección mediante inmunoblot de la presencia de MMP-9 (tanto la proforma como la enzimáticamente activa), en el plasma aislado a los 21 días a partir de la sangre obtenida de los animales sometidos a IR y tratados mediante inyección intravenosa de 0.1 mg/kg de NAP9 o NAP9SC. **Panel derecho:** Representación gráfica de los valores medios de MMP-9 presente en el plasma de los animales de forma previa al tratamiento (PRE) y a los 7, 14 y 21 días posteriores a la IR (N=6 cerdos). Valores expresados como media \pm desviación estándar de la muestra. $P < 0.03$ NAP9 vs NAP9SC 21 días post IR.

4. NAP9 reduce el colágeno total y las fibras de colágeno de tipo 1 en el IAM.

Uno de los indicadores mas precisos de daño en los tejidos es el contenido en colágeno, y mas concretamente el cambio en la composición de este elemento estructural, en función del entorno donde el órgano se encuentra. En función del efecto de NAP9 sobre la expresión de MMP-9, gelatinasa con capacidad para degradar colágeno desnaturalizado, quisimos averiguar, si de alguna forma NAP9 pudiera preservar también la composición de la matriz extracelular en respuesta al infarto. Para ello, realizamos primeramente una tinción con el reactivo “Rojo Sirio” en los cortes histológicos de los corazones, el cual tiñe de color rojizo todo el colágeno presente en cualquier tejido, detectando que en aquellos animales que habían sido sometidos al tratamiento con NAP9, éstos presentaron un contenido en colágeno total menor en comparación con los animales NAP9SC utilizados como control (Fig. 12A)

Además, continuando con el estudio, se investigó qué tipo de fibras de colágeno abundaban en mayor proporción en los corazones de cerdo infartados en virtud del tratamiento. Para ello procedimos con la observación de las secciones teñidas con Rojo Sirio en un microscopio de luz polarizada, que refracta la luz en un color amarillento en el caso de colágeno tipo I, o verde

si el contenido es preferentemente colágeno tipo III. Observamos que en los animales tratados con NAP9SC, las fibras de colágeno tipo I estaban más presentes que las de tipo III, ya que se observa una mayor intensidad de color rojizo-amarillento (Fig.12B). Sin embargo, en aquellos animales que fueron tratados con NAP9, pudimos evidenciar una mayor cantidad de fibras de colágeno de tipo III (Fig.12B).

Con todos los datos obtenidos, tras su análisis confirmamos que en el grupo tratado con NAP9, existe una reducción significativa del colágeno tipo I en comparación con el grupo NAP9SC. Teniendo en cuenta que el cambio en la composición del colágeno estructural hacia la forma de tipo I, es indicativo de patología cardiovascular, todos los datos obtenidos apuntan hacia el efecto cardioprotector de NAP9 como herramienta implicada en el mantenimiento de la matriz extracelular del corazón, evitando de esta manera la pérdida de contractilidad miocárdica (Fig. 12C)

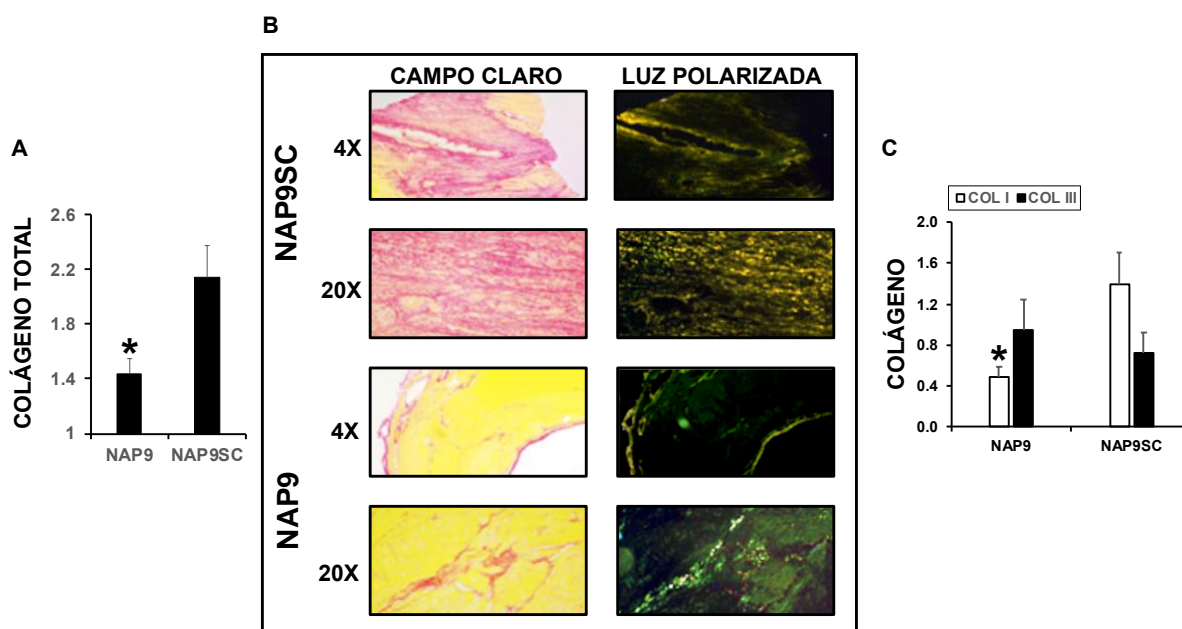


Figura 12. La inyección IV de NAP9 reduce los niveles de colágeno tipo I en los corazones de los cerdos infartados. A) Representación gráfica de los valores medios del colágeno total a partir de tinción de rojo sirio (N=6 cerdos). Valores expresados como media ± desviación estándar de la muestra. $P < 0.01$ NAP9 vs NAP9SC. **B)** Análisis mediante tinción de rojo sirio y microscopía de luz polarizada de la tipología de las fibras de colágeno en cerdos infartados tras 21 días de isquemia/reperfusión coronaria, comparando el grupo control con el de los cerdos tratados con 0.1 mg/kg de NAP9. Las fibras de colágeno tipo I refractan en color rojizo-amarillento y las fibras de colágeno tipo III refractan en color verde. **C)** Representación gráfica de los valores medios de la figura B (N=6 cerdos). Valores expresados como media ± desviación estándar de la muestra. $P < 0.01$ Col I, NAP9 vs Col I NAP9SC.

DISCUSIÓN

Debido al impacto que las enfermedades cardiovasculares (principalmente el infarto agudo de miocardio) ejercen en la tasa de mortalidad mundial, y en concreto en España, resulta crucial establecer un diagnóstico preciso y encontrar dianas terapéuticas eficaces que logren aumentar la tasa de supervivencia de estos pacientes. Actualmente, el procedimiento clínico más extendido para el tratamiento del infarto se dirige a conseguir la reperfusión coronaria, permitiendo de nuevo la correcta perfusión sanguínea al tejido, sin embargo, este procedimiento lejos de ser beneficioso entraña un daño tisular intrínseco debido a la superoxigenación (Gottlieb et al., 1994; Ibáñez et al., 2017), que conduce en última instancia a una desestabilización de la matriz extracelular (Cook et al., 2016). Por ello, el uso de la nanotecnología como herramienta terapéutica se plantea como una alternativa eficaz debido a su capacidad cardioprotectora ante un infarto agudo de miocardio. No sólo eso, si no que además, puede emplearse como método de diagnóstico por imagen mediante resonancia magnética (Ramirez-Carracedo et al., 2018).

En base a los resultados prometedores de nuestro grupo de laboratorio, acerca del uso de nanopartículas paramagnéticas para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca en modelos murinos (Cuadrado et al., 2016), en este trabajo quisimos dar un paso más, planteando el uso de nanopartículas lipídicas basadas en micelas de gadolinio, conjugadas con el péptido AP9 como un nuevo enfoque terapéutico, al inhibir de manera específica a EMMPRIN (NAP9) sirviéndonos para ello de un modelo porcino de shock cardiogénico.

Mediante el presente trabajo, hemos podido confirmar y ahondar en el efecto cardioprotector de las nanopartículas conjugadas con el péptido AP9 (NAP9), aunque estudios previos llevados a cabo por nuestro laboratorio, ya habían demostrado que tras un infarto, NAP9 se localiza preferentemente en el tejido miocárdico, debido a su unión específica a EMMPRIN, diana molecular del péptido AP9. EMMPRIN, juega un papel fundamental en diversas patologías, entre las que se encuentra el infarto agudo de miocardio, teniendo nuestro grupo amplia experiencia al respecto (Cuadrado et al., 2016 ; Ramirez-Carracedo et al., 2018). Tras un infarto, EMMPRIN incrementa su expresión en cardiomiocitos y monocitos, desempeñando un papel fundamental en el disparo de la respuesta inflamatoria post isquemia/reperfusión, debido a su actividad como inductor de las metaloproteinasas de matriz extracelular. Sin embargo, para poder ejercer esta actividad, EMMPRIN debe mantener un estado de alta glicosilación (HG-EMMPRIIN), ya que un estado de baja glicosilación (LG-EMMPRIIN), supone una inactivación de la proteína. Como nuestro laboratorio ha podido comprobar, en respuesta al IAM se produce un aumento notable de las formas altamente glicosiladas de EMMPRIN, lo cual explica a su vez el incremento de metaloproteinasas en el miocardio, en concreto MMP-9 (gelatinasa) y MMP-13 (colagenasa) (Ramirez-Carracedo et al., 2018). Será esta sobreexpresión de MMPs la causante en gran medida del remodelado adverso que acontece al infarto, ya que al ser enzimas proteolíticas, producen una degradación descontrolada de la matriz extracelular. Esta matriz, es posteriormente reemplazada gracias a los miofibroblastos, por una nueva matriz fundamentalmente de colágeno (Cohn et al., 2000; Frangogiannis, 2017).

A pesar de que esta cicatriz estabiliza el tejido, el resultado final es la pérdida de contractilidad del corazón, disminuyendo así la funcionalidad cardíaca, que finalmente degenera en una insuficiencia cardíaca más severa. Es por ello, que EMMPRIN se presenta no sólo como un marcador de inflamación tras el evento isquémico, sino también como una posible diana terapéutica (Toole, 2003).

En el trabajo realizado por parte de nuestro grupo de investigación (Cuadrado et al., 2016), se comprobó en modelos murinos la cardioprotección ejercida por NAP9 al inhibir a EMMPRIN, a través de la medición de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (parámetro que refleja el grado de funcionalidad miocárdica), hallando un incremento significativo de la misma. En base a estos excelentes resultados, nuestro trabajo planteó analizar este mismo parámetro, en cerdos tratados con NAP9, comparando los resultados con respecto a los controles tratados con NAP9SC. Pudimos observar, como los animales pertenecientes al grupo tratado, mostraron un incremento significativo de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, lo que de nuevo se traduce en una mejora de la funcionalidad cardíaca tras el evento de isquemia/reperusión. En continuación con el estudio, quisimos ahondar en el papel cardioprotector de la nanopartícula, analizando si la recuperación cardíaca ejercida por NAP9, sucedía a través de la prevención de la necrosis miocárdica, por lo que nuestro trabajo estudió también el efecto del tratamiento sobre el porcentaje de necrosis que sucede a los 21 días después del infarto de miocardio, lo que nos permitió confirmar que el efecto cardioprotector de NAP9 se debe a la preservación del tejido miocárdico vivo en una superficie significativamente mayor a la de los cerdos tratados con NAP9SC.

En base al estudio llevado a cabo por Ramírez- Carracedo (2018), comprobamos que la reducción en el tamaño del infarto, era debida al efecto inhibitor que NAP9 ejercía sobre EMMPRIN, para ello, en nuestro trabajo, analizamos los niveles plasmáticos de expresión de metaloproteasas (MMP-9) tras la IR, hallando una reducción significativa a los 21 días del procedimiento en los animales sometidos al tratamiento con NAP9, lo que sugiere, que como se esperaba, a través del bloqueo selectivo de EMMPRIN, se inhibe su actividad como inductor de metaloproteinasas de matriz extracelular, reduciéndose por tanto la cantidad de metaloproteasas circulantes, y por tanto, produciéndose un freno en la degradación de la matriz extracelular. Este resultado, es muy puntero de cara a plantear futuros tratamientos dirigidos a preservar la matriz extracelular tras el infarto.

Una de las mayores incógnitas del tratamiento fue cómo NAP9 pudiera estar afectando a la composición de la matriz extracelular, y mas concretamente si pudiera ejercer efecto sobre la composición de los colágenos presentes en ésta, ya que como hemos citado anteriormente, tras la degradación de la matriz, ésta es sustituida por una matriz fundamentalmente de colágeno, produciéndose una cicatrización del área infartada, lo que supone la pérdida de contractilidad en una región del corazón. Por ello, quisimos evaluar si de alguna forma NAP9 preservaba también la composición de la matriz extracelular en respuesta al infarto, esto nos llevó a analizar los efectos de la inhibición de EMMPRIN sobre la cantidad de colágeno total depositado en el tejido miocárdico tras el infarto. Comprobamos, que aquellos animales tratados con NAP9 poseían una reducción significativa del colágeno total en comparación con los animales scramble y que además, en los corazones de los animales tratados, las fibras de colágeno tipo I se encontraban en menor proporción que el colágeno tipo III, lo que supone un gran hallazgo ya que, el colágeno tipo I es el mayoritario en el proceso de fibrosis

miocárdica (Jiménez-Navarro et al., 2005), indicativo de patología cardiovascular, por lo que los datos obtenidos apuntan hacia el efecto cardioprotector de NAP9 como herramienta implicada en el mantenimiento de la matriz extracelular del corazón, evitando de esta manera la pérdida de contractilidad miocárdica. Sin embargo, sería necesario continuar investigando sobre la implicación de las diferentes fibras de colágeno en la insuficiencia cardíaca, para poder profundizar en su significancia clínica, por lo que este resultado se considera muy prometedor en cuanto a su apertura a nuevas líneas de investigación.

Por todo lo argumentado y junto a los resultados obtenidos, las nanopartículas NAP9 se consideran una nueva herramienta terapéutica para las enfermedades cardiovasculares, gracias a su unión específica a EMMPRIN, evitando el remodelado adverso y sirviendo además como método de diagnóstico, pudiéndose obtener imágenes precisas mediante resonancia magnética.

CONCLUSIONES

De los resultados expuestos en el presente trabajo se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- I. El tratamiento con nanopartículas lipídicas conjugadas con el péptido AP9 de unión específica a EMMPRIN (NAP9) en un modelo porcino de infarto agudo de miocardio ejerce un efecto cardioprotector frente a la isquemia miocárdica, al aumentar de manera significativa, los valores de fracción de eyección del ventrículo izquierdo induciendo una mejora en la función cardíaca.
- II. La administración de NAP9 en un modelo porcino de shock cardiogénico e ICA post infarto agudo de miocardio previene la progresión del mismo, al haber detectado una reducción significativa del área infartada en comparación con la nanopartícula scramble.
- III. El tratamiento con NAP9 disminuye los niveles de expresión de MMP-9 a los 21 días de reperfusión, en el plasma de animales infartados, frenándose el proceso de degradación de la matriz extracelular, posiblemente como consecuencia de la inhibición de uno de sus principales inductores. Por lo tanto, el empleo de NAP9, podría ejercer un papel cardioprotector, evitando un remodelado adverso del ventrículo izquierdo, al conservar la integridad de la matriz extracelular.
- IV. La administración de NAP9, reduce de manera significativa el número de fibras de colágeno tipo I en comparación con las fibras de tipo III en un modelo porcino de infarto agudo de miocardio, lo que indica un posible efecto terapéutico de NAP9, ya que el colágeno de tipo I es el mayoritario en la fibrosis miocárdica. Sin embargo, es necesario seguir investigando sobre la tipología de las fibras de colágeno tras un infarto, ya que su significancia clínica sigue siendo desconocida, por lo que se abre camino a futuras líneas de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bai, Yang, et al. «Importance of N-Glycosylation on CD147 for Its Biological Functions». *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 15, n.o 4, abril de 2014, pp. 6356-77. PubMed Central. doi:10.3390/ijms15046356.
2. Cohn, J. N., Ferrari, R. and Sharpe, N. (2000) ' Cardiac remodeling – concepts and clinical implicatios: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling', *Journal of the American College of Cardiology*, 35(3), pp. 569–82. doi: 10.1016/s0735-1097(99)006300.
3. Cook, Jennifer C., et al. «Evolving therapies for the management of chronic and acute decompensated heart failure». *American Journal of Health-System Pharmacy*, vol. 73, n.o 21, noviembre de 2016, pp. 1745-54. Silverchairdoi:10.2146/ajhp150635.
4. Cuadrado, I., Piedras, M. J. G. M., Herruzo, I., Turpin, M. C., Castejón, B, Reventun, P., Martin, A., Saura, M., Zamorano, J. L. and Zaragoza, C. (2016)'EMMPRIN-Targeted magnetic nanoparticles for in vivo visualization and regression of acute myocardial infarction', *Theranostics*, 6(4), pp. 545–557.doi:10.7150/thno.13352.
5. Frangogiannis, Nikolaos G. «The Extracellular Matrix in Myocardial Injury, Repair, and Remodeling». *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 127, n.o 5, mayo de 2017, pp. 1600-12. PubMed, doi:10.1172/JCI87491.
6. Frank, Anja, et al. «Myocardial Ischemia Reperfusion Injury: From Basic Science to Clinical Bedside». *Seminars in Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, vol. 16, n.o 3, septiembre de 2012, pp. 123-32. SAGE Journals. doi:10.1177/1089253211436350.
7. Ge, H., Yuan, W., Liu, J., He, Q., Ding, S., Pu, J. and He, B. (2015) 'Functional relevance of protein glycosylation to the pro-inflammatory effects of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) on monocytes/macrophages', *PLoS ONE*, 10(2), pp. 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0117463.
8. Gottlieb, R. A., Burlison, K. O., Kloner, R. A., Babior, B. M. and Engler, R. L. (1994) 'Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes', *The Journal of Clinical Investigation*, 94, pp. 1621-1628. doi: 10.1172/JCI117504.
9. Ibáñez, Borja, et al. «Guía ESC 2017 sobre el tratamiento del infarto agudo de miocardio en pacientes con elevación del segmento ST». *Revista Española de Cardiología*, vol. 70, n.o 12, diciembre de 2017, p. 1082.e1-1082.e61. doi:10.1016/j.recesp.2017.10.048.
10. Jiménez-Navarro, M. F., Gómez-Doblas, J. J., Cabrera-Bueno, F., Cruz-Ocaña, E., Rodríguez-Bailón, I., Ruiz-Galdón, M., Morell, M., Molero, E., & de Teresa-Galván, E.

- (2005). Síntesis de colágeno e insuficiencia cardíaca. *Revista Española de Cardiología*, 58(8), 975-978. doi:10.1157/13078135.
11. Liu, Peter, et al. «Matrix Metalloproteinases in Cardiovascular Disease». *The Canadian Journal of Cardiology*, vol. 22 Suppl B, febrero de 2006, pp. 25B-30B. PubMed, doi:10.1016/s0828-282x(06)70983-7.
 12. Lizarbe, T. R., García-Rama, C., Tarín, C., Saura, M., Calvo, E., Lopez, J. A., López-Otín, C., Folgueras, A. R., Lamas, S. and Zaragoza, C. (2008), 'Nitric oxide elicits functional MMP-13 protein-tyrosine nitration during wound repair', *Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB)*, 22(9), pp.3207–3215. doi: 10.1096/fj.07-103804
 13. McKay, R. G., et al. «Left Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction: A Corollary to Infarct Expansion». *Circulation*, vol. 74, n.o 4, octubre de 1986, pp. 693-702. PubMed, doi:10.1161/01.cir.74.4.693.
 14. Moral, S., Rodríguez-Palomares, J. F., Descalzo, M., Martí, G., Pineda, V., Otaegui, I., García del Blanco, B., Evangelista, A., & García-Dorado, D. (2012). Cuantificación del área miocárdica en riesgo: Validación de puntuaciones angiográficas coronarias con métodos de resonancia magnética cardiovascular. *Revista Española de Cardiología*, 65(11), pp.1010-1017. doi: 10.1016/J.RECESP.2012.04.020
 15. Niato, N., Nojima, T., Fujisaki, N., Tsukahara, K., Yamamoto, H., Yamada, T., Aokage, T., Yumoto, T., Osako, T. and Nakao, A. (2020), 'Therapeutic strategies for ischemia reperfusion injury in emergency medicine', *Acute Medicine and Surgery*, 7, 501. doi: 10.1002/ams2.501.
 16. O'Rourke, S. A., Dunne, A., & Monaghan, M. G. (2019). The Role of Macrophages in the Infarcted Myocardium: Orchestrators of ECM Remodeling. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 6, 101. doi.org/10.3389/fcvm.2019.00101.
 17. Phatharajaree, Wannakorn, et al. «Matrix Metalloproteinases and Myocardial Infarction». *The Canadian Journal of Cardiology*, vol. 23, n.o 9, julio de 2007, pp. 727-33. PubMed, doi:10.1016/s0828-282x(07)70818-8.
 18. Ramírez, R., Díez, J., Sanmartín, M., Saura, M., Zamorano, J. L., & Zaragoza, C. (2019). Nanotecnología aplicada a conservar la matriz extracelular como herramienta terapéutica en el infarto agudo de miocardio. *Revista Española de Cardiología*, 72(2), 171-174. doi: 10.1016/j.recesp.2017.12.004
 19. Ramirez-Carracedo, R., Tesoro, L., Hernández, I., Díez-Mata, J., Filice, M., Toro, R., Rodríguez-Piñero, M., Zamorano, J. L., Saura, M. a Zaragoza, C. (2018) 'Noni nvasive

detection of extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN, a new therapeutic target against atherosclerosis, inhibited by endothelial nitric oxide', International Journal of Molecular Sciences, 19(10). doi:10.3390/ijms19103248.

20. Ruiz-Meana, Marisol, y David García-Dorado. «Fisiopatología del daño miocárdico por isquemia-reperfusión: nuevas oportunidades terapéuticas en el infarto agudo de miocardio». Revista Española de Cardiología, vol. 62, n.o 2, febrero de 2009, pp. 199-209. doi:10.1016/S0300-8932(09)70162-9.
21. Salinas, B. (2013) 'Síntesis y funcionalización covalente de nanopartículas superparamagnéticas para imagen biomédica', pp. 1–167.
22. Schmidt, Roland, Andreas Bültmann, Sina Fischel, et al. «Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (CD147) Is a Novel Receptor on Platelets, Activates Platelets, and Augments Nuclear Factor KappaB-Dependent Inflammation in Monocytes». Circulation Research, vol. 102, n.o 3, febrero de 2008, pp. 302-09. PubMed, doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.157990.
23. Seizer, Peter, et al. «EMMPRIN and Its Ligand Cyclophilin A Regulate MT1-MMP, MMP-9 and M-CSF during Foam Cell Formation». Atherosclerosis, vol. 209, n.o 1, marzo de 2010, pp. 51-57. PubMed, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.08.029.
24. Steg, P.G., Dabbous, O. H., Feldman, L. J., Cohen-Solat, A., Aumont, MC., López-Sendón, J., Budaj, A., Goldberg, R. J., Klein, W. and Anderson, F. A. (2004) 'Determinants and prognostic impact of heart failure complicating acute coronary syndromes', Revista Española de Cardiología, 68(4), pp. 331-337. doi:10.1161/01.CIR.0000109691.16944.DA.
25. Tarin, C., Lavin, B., Gómez, M., Saura, M., Diez-Juan, A. and Zaragoza, C.(2011) 'The extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN is a target of nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion', Free Radical Biology and Medicine. Elsevier Inc., 51(2), pp. 387–395. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.021.
26. Thygesen, Kristian, et al. «Universal Definition of Myocardial Infarction». Journal of the American College of Cardiology, vol. 50, n.o 22, noviembre de 2007, pp. 2173-95. PubMed, doi:10.1016/j.jacc.2007.09.011.
27. Toole, B. P. (2003). Emmpirin (Cd147), a cell surface regulator of matrix metalloproteinase production and function. En *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 54, pp. 371-389). Elsevier. doi:10.1016/S0070-2153(03)54015
28. Visse, R. and Nagase, H (2003) 'Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function and biochemistry', Circulation Research, 92(8), pp. 827 – 839. doi: 10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D

29. von Ungern-Sternberg, Saskia N. I., et al. «Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer EMMPRIN (CD147) in Cardiovascular Disease». *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, n.o 2, febrero de 2018. PubMed, doi:10.3390/ijms19020507.
30. Yurchenko, V., Constant, S., Eisenmesser, E., & Bukrinsky, M. (2010). Cyclophilin-CD147 interactions: A new target for anti-inflammatory therapeutics: CD147-cyclophilin interactions. *Clinical & Experimental Immunology*, 160(3),305-317. doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04115.x

ANEXO I

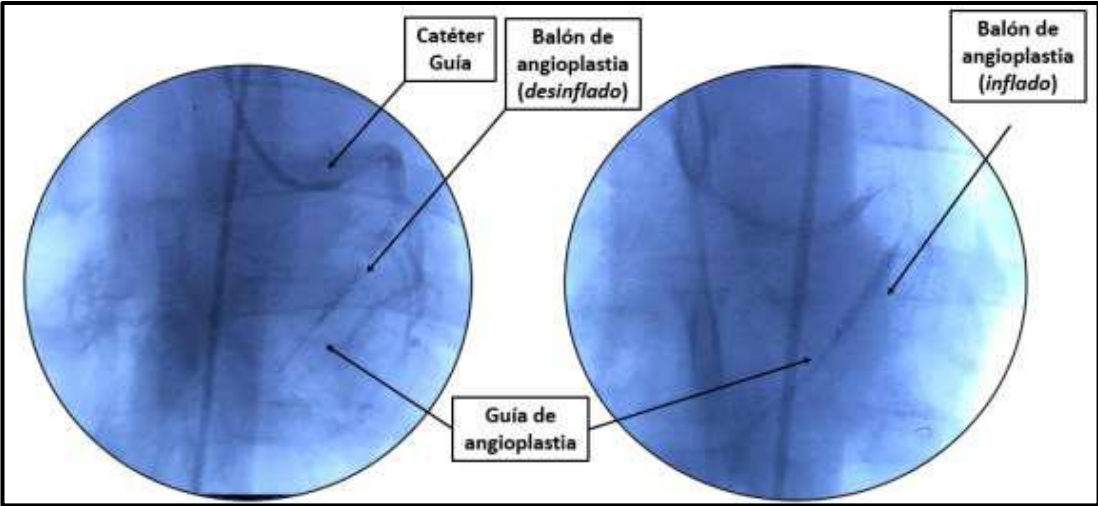


Figura 1: Imagen de rayos X que refleja el inflado del balón de angioplastia durante el cateterismo cardiaco. Fuente: Elaboración propia