

## Temas Libres a Premio Dr. Bernardo Houssay

### **0298 - EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN TBX20 EN UN MODELO OVINO DE INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO EXPERIMENTAL**

Modalidad: Tema Libre

Unidad Temática: Investigación Básica

**BAUZÁ, María Del Rosario** (1) | **LÓPEZ, Ayelén Emilce**(1) | **SIMONIN, Alejandro**(2) | **BELAICH, Mariano** Nicolás(2) | **CUNIBERTI, Luis Alberto**(1) | **CROTTIGINI, Alberto José**(1) | **LOCATELLI, Paola**(1) | **OLEA, Fernanda Daniela**(1)

Instituto de Medicina Traslacional, Trasplante y Bioingeniería (IMETTYB)-Universidad Favaloro-CONICET (1); Universidad Nacional de Quilmes (2)

Expresión génica de ARNm	Tbx20	Null	valor p
Tbx20	2.29±1.1	1.08±0.94	* (p<0.05)
Ciclina D1	2.26±1.1	1.22±0.78	ns
p21	0.24±0.40	5.55±8.78	* (p<0.05)
mef2c	10.86±9.13	1.81±2.1	* (p<0.05)
Ciclina A2	2.25±1.33	0.80±0.59	* (p<0.05)
Igf1	8.29±8.96	2.18±2.58	* (p<0.05)
Btg2	1.6±0.9	1.75±1.6	ns
vegf	2.24±1.37	1.1±0.48	* (p<0.05)
angiogenina	2.73±2.91	1.51±1.12	ns
angiopoyetina	2.28±1.63	0.9±0.75	ns
prokr2	3.26±1.83	1.44±1.18	* (p<0.05)
prokr1	2.52±2.37	0.80±0.3	* (p<0.05)
prok2	7.29±4.97	1.32±1.22	* (p<0.05)
gata4	1.37±0.71	1.31±0.78	ns
nkx2.5	2.11±1.37	0.91±0.37	* (p<0.05)
meis	0.88±0.26	1.35±0.82	ns
Inmunohistoquímica			
Arteriolas	143.20±45	92.15±35	* (p<0.05)
Ki67	14.37±7.22	6.32±6.69	* (p<0.05)
Capilares	2329.64±326.65	1684.50±289.96	* (p<0.05)

**Introducción:** Para limitar o reducir el tamaño del infarto de miocardio se han propuesto diferentes estrategias terapéuticas que promuevan regeneración miocárdica a través de la inducción de la miocardiogénesis y/o angioarteriogénesis. Una de las posibles estrategias es sobreexpresar factores que estimulen estos mecanismos a través de la terapia génica. Respecto a esto, el factor Tbx20 ha demostrado estimular la expresión de genes pro-mitóticos, reprimir la expresión de genes anti-mitóticos e inducir angiogénesis. Por lo tanto, la sobreexpresión de Tbx20 sería un posible blanco terapéutico para la regeneración cardíaca.

**Objetivos:** Evaluar los efectos de la administración de un vector baculoviral codificante para Tbx20 (Bv-Tbx20), sobre la inducción de la proliferación celular y angiogénesis, en cultivo de cardiomiocitos (CM) de ratas neonatales y en ovejas con infarto agudo de miocardio (IAM) experimental.

**Materiales y Métodos:** En cultivo de CM transducidos con Bv-Tbx20 (CM-BvTbx20) o con su control (CM-BvNull) se midió a 2 y 5 días post-transducción: a) la proliferación celular (MTS, conteo celular e inmunomarcación de Ki67), b) la expresión génica de genes reguladores del ciclo celular y genes angiogénicos (RT-qPCR), y c) la inducción angiogénica (tubulogénesis). Posteriormente, en ovejas con IAM se administró alrededor del infarto  $10^{10}$  copias de Bv-Tbx20 o Bv-Null. A los 7 días del tratamiento, se evaluó la expresión de genes reguladores del ciclo celular y angiogénicos (RT-qPCR), la inducción de angioarteriogénesis y la reentrada al ciclo celular de los cardiomiocitos por inmunomarcación de la proteína Ki67 (inmunohistoquímica) en tejidos inyectados. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante Test T de Student o Mann-Whitney y expresados como media±desvío estándar, considerando un valor de  $p<0,05$ .

**Resultados:** Tanto a 2 como a 5 días post-transducción, los CM-BvTbx20 tuvieron: a) un aumento significativo en la expresión génica relativa del transgen humano Tbx20, Gata4, Nkx2.5 y de los genes pro-mitóticos (Mef2c,

Ciclina A2 e Igf-1), b) una disminución significativa de la expresión del gen anti-mitótico p21, c) aumento de los genes angiogénicos (Vegf, Angiogenina, Angiopoyetina y ProkR2), y d) aumento de la inducción angiogénica in vitro. En cuanto a la proliferación celular, sólo a 2 días post-transducción hubo un aumento significativo en los CM-BvTbx20. En cuanto a los resultados in vivo, en ovejas tratadas con Bv-Tbx20 hubo: a) un aumento significativo en la expresión del transgen Tbx20, Nkx2.5, Mef2c, Ciclina A2 e Igf-1, b) una disminución en los niveles de p21, c) un aumento en los niveles de expresión de los genes angiogénicos (Vegf, ProkR2, ProkR1 y Prok2), d) un aumento de cardiomiocitos marcados con ki67/mm<sup>2</sup>, y e) un aumento en la densidad capilar y densidad arteriolar (ver Tabla 1).

**Conclusiones:** La transducción de cardiomiocitos con Bv-Tbx20 indujo proliferación celular y angiogénesis in vitro. Además, la inyección intramiocárdica de Bv-Tbx20 en ovejas con IAM, indujo angio-arteriogenesis y aumento de células Ki67 positivas a 7 días del tratamiento. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de Tbx20 podría ser una alternativa terapéutica para inducir regeneración miocárdica.

## **0351 - DETERMINACIÓN DE MECANISMOS QUE INDUCEN CARDIOTOXICIDAD MEDIADA POR LA INMUNOTERAPIA CON INHIBIDORES DE PUNTOS DE CONTROL INMUNITARIO (ANTI-CTLA-4 Y ANTI-PD-1) E IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES ASOCIADOS PARA SU POSIBLE USO EN LA TERAPÉUTICA.**

*Modalidad: Tema Libre*

*Unidad Temática: Cardio Oncología*

*Unidad Temática 2: Investigación Básica*

**RUBIO INFANTE, Nestor** | RAMOS, Martín | SALAS TREVIÑO, Daniel | SOTO DOMÍNGUEZ, Adolfo | LOZANO, Omar | GARCÍA RIVAS, Gerardo | TORRE AMIONE, Guillermo

**Áreas SAC: Área de Investigación**

**Introducción:** La inmunoterapia ha cambiado el paradigma moderno del tratamiento contra el cáncer ya que, en lugar de dirigir fármacos hacia el tumor, ahora se centra en mejorar el reconocimiento y activación del sistema inmune para la destrucción de tumores mediante el bloqueo de los puntos de control inmune (immune check points, IC). La terapia con immune check point inhibitors (ICI) se basa en el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos para bloquear los IC (CTLA-4, PD1 o PDL-1) y así permitir la activación duradera de la respuesta inmune antitumoral. A pesar de que la terapia con ICIs aumenta significativamente la sobrevida de los pacientes y el periodo libre de tumores, ciertas reacciones inmunes adversas (irAEs) han sido asociadas al uso de esta terapia. La cardiotoxicidad asociada a ICIs (CirAEs) es una las irAEs que más impacto puede tener en el paciente ya que puede desencadenar principalmente miocarditis con desenlace fatal. Debido a que el uso de la terapia con ICIs seguirá creciendo es imperativo dilucidar los mecanismos involucrados en la cardiotoxicidad asociada a esta terapia.

**Objetivos:** En este proyecto se pretende demostrar por primera vez que el daño al tejido cardiaco es un prerrequisito indispensable para generar la activación del sistema inmune y la cardiotoxicidad al administrar la terapia con ICIs comprometiendo la función del corazón, causando miocarditis e incrementando la mortalidad.

**Materiales y Métodos:** Se utilizó un modelo de insuficiencia cardíaca inducida por angiotensina I (HF) para generar una lesión crónica en ratones. A continuación, se administró semanalmente la terapia combinada de ICI (anti-CTLA-4 + anti-PD-1) en un total de 3 dosis (HF +ICI). Se administró el tratamiento con ICI en ratones control sanos (Ctrl + ICIs). Se constituyó un grupo de ratones solo con insuficiencia cardíaca (HF) y un grupo de ratones control (Ctrl). Después de 4 semanas de los tratamientos con ICI, se analizó la supervivencia de los ratones y el grado de miocarditis. Analizamos en tejido cardíaco los marcadores de remodelación y miocarditis. Finalmente, caracterizamos las células infiltrantes en el corazón mediante inmunohistoquímica (IHQ).

**Resultados:** En comparación con el grupo control, los ratones administrados con ICI solos (Ctrl + ICI) no mostraron diferencias en la supervivencia, células infiltrantes en corazón, ni incremento citocinas inflamatorias locales. Los ratones con HF mostraron una disminución de la sobrevida de un 15%, un aumento de citocinas proinflamatorias locales y aumento en marcadores de daño cardíaco como el BNP y la fibrosis patológica. Cuando los ratones fueron sometidos al modelo de HF más ICI (HF + ICI), se observó que la supervivencia de los ratones disminuyó hasta el 50%, también se observó en este grupo, infiltrando células linfoides, un aumento del TNF- $\alpha$ ; y del BNP en el corazón (mayor al generado en el grupo de HF); las células infiltradas se caracterizaron principalmente como células T CD8<sup>+</sup>. Los autoanticuerpos contra proteínas cardíacas fueron determinados por ELISA y solo se observó un aumento significativo en el grupo de HF+ ICIs.

**Conclusiones:** Nuestros resultados sugieren que un daño crónico cardiovascular es necesario para reducir la supervivencia de los ratones después de la terapia con ICI e inducir miocarditis. También abrimos las perspectivas de las posibles reacciones autoinmunes contra el corazón después de esta terapia.

