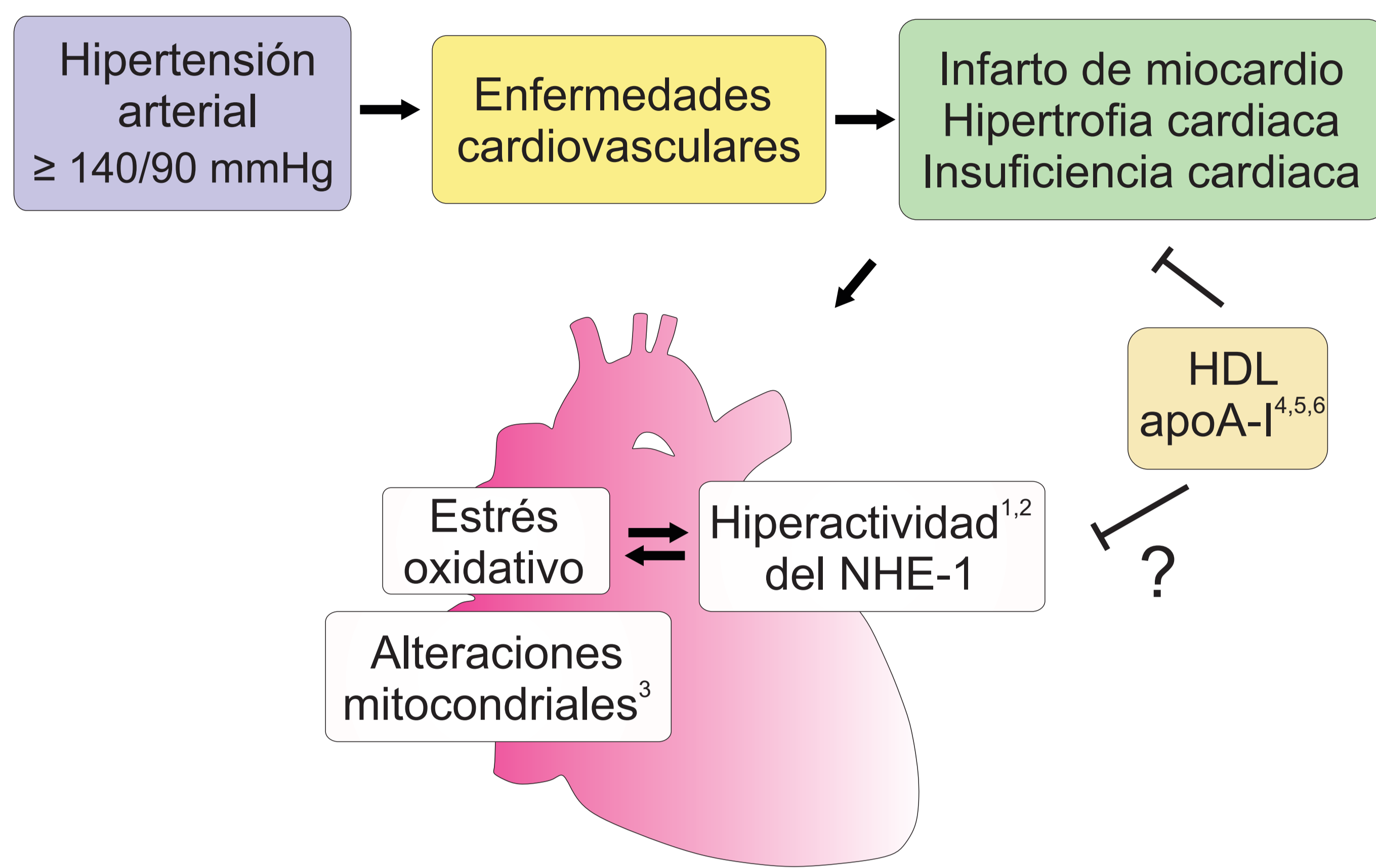


# ¿LA APOLIPOPROTEÍNA A-I (APOA-I) PUEDE REVERTIR LAS ALTERACIONES MIOCÁRDICAS INDUCIDAS POR HIPERTENSIÓN?

Sol Cisneros, Claudia Caldiz<sup>1</sup>, Luisa Gonzalez Arbelaez<sup>1</sup>, Juliana Fantinelli<sup>1</sup>, Nahuel Ramella<sup>2</sup>, Alejandra Tricerri<sup>2</sup>, Irene Ennis<sup>1</sup>, Alejandra Yeves<sup>1</sup>. 1-Centro de Investigaciones Cardiovasculares "Dr Horacio E. Cingolani" (CIC), 2- Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata "Prof. Doctor Rodolfo R. Brenner" (INIBIOLP). ayeves@med.unlp.edu.ar

## ANTECEDENTES



## OBJETIVO

Explorar si la apoA-I administrada de manera aguda ejerce efectos cardioprotectores relacionados a mejorar el estado redox y la bioenergética mitocondrial en el miocardio de ratas espontáneamente hipertensas (SHR).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la apoA-I WT (wild type). Se produjo de manera recombinante expresándola en cultivos de E. Coli. Brevemente, los genes de las apoA-I se clonaron en el plásmido pET30 bajo un promotor inducible por IPTG. La purificación de las proteínas se realizó por cromatografía de afinidad matriz IMAC-sepharosa puesto que la construcción tiene un tag de histidinas en el extremo N-terminal. Se realizaron SDS PAGE para evaluar la pureza de la muestra.

-Animales. Ratas macho SHR (modelo de HC hipertensiva). Se emplearon cardiomiocitos aislados enzimáticamente mediante el método de Langendorff. Empleamos 2 concentraciones de apoWT (0.2ug/ml y 2ug/ml).



-Potencial de membrana mitocondrial y producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Se determinaron la caída del potencial de membrana mitocondrial inducida por  $H_2O_2$  200  $\mu M$  y la producción de especies reactivas del oxígeno por epifluorescencia en cardiomiocitos aislados cargados con TMRE y DCFDA, respectivamente.

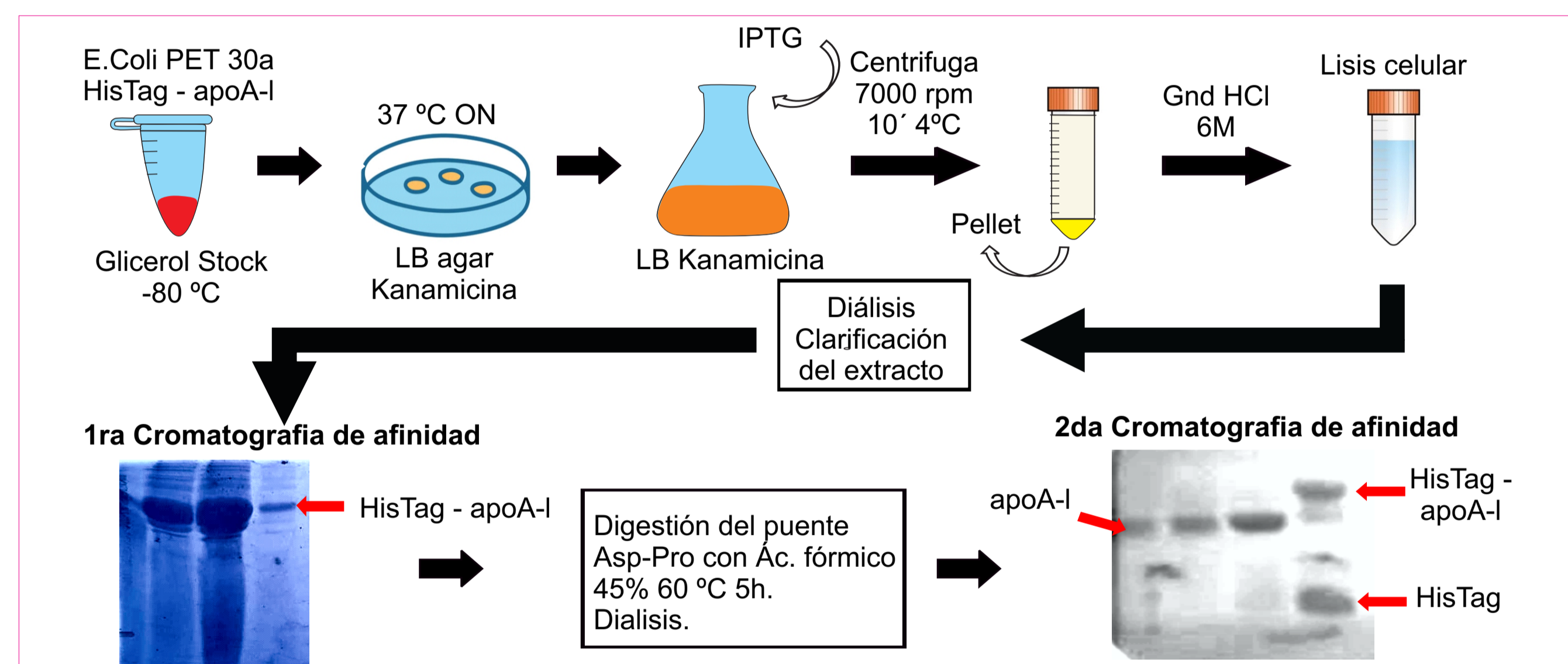
-Protocolo de isquemia-reperfusión. Los corazones se perfundieron con el método de Langendorff. La función miocárdica se evaluó a través de la presión desarrollada en el ventrículo izquierdo (LVDP), obtenida restando el valor de LVDEP a la PVI. La rigidez miocárdica durante la reperfusión y la contractura isquémica se evaluaron a través de la LVEDP. El tamaño del infarto en los corazones se determinó al término de la reperfusión mediante tinción con sales de tripheniltetrazolio. Se determinó el área de infarto como porcentaje del área de riesgo.

Estabilización	Isquemia	Reperfusión
20 min	30 min	60 min

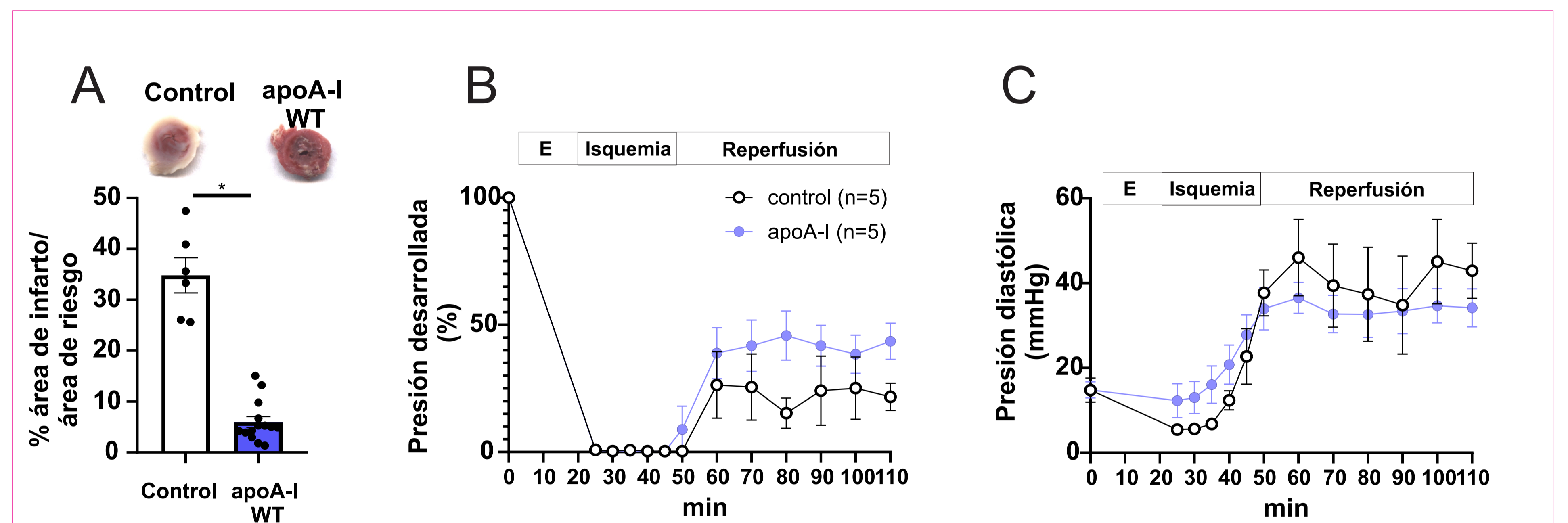
## HIPÓTESIS

Explorar si la apoA-I administrada de manera exógena ejerce efectos cardioprotectores relacionados a mejorar del estado redox y la bioenergética mitocondrial en el miocardio de ratas espontáneamente hipertensas (SHR).

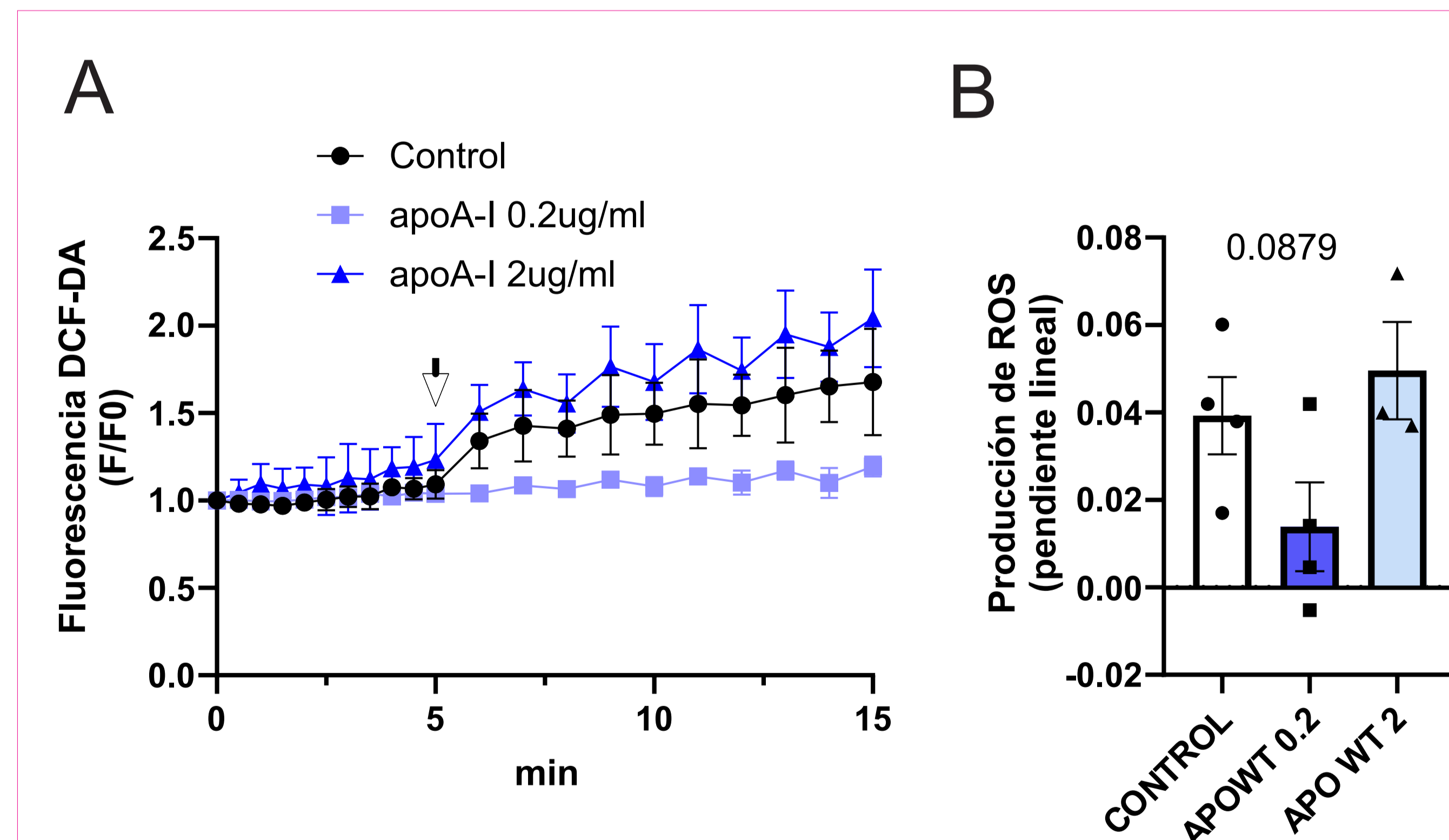
## RESULTADOS



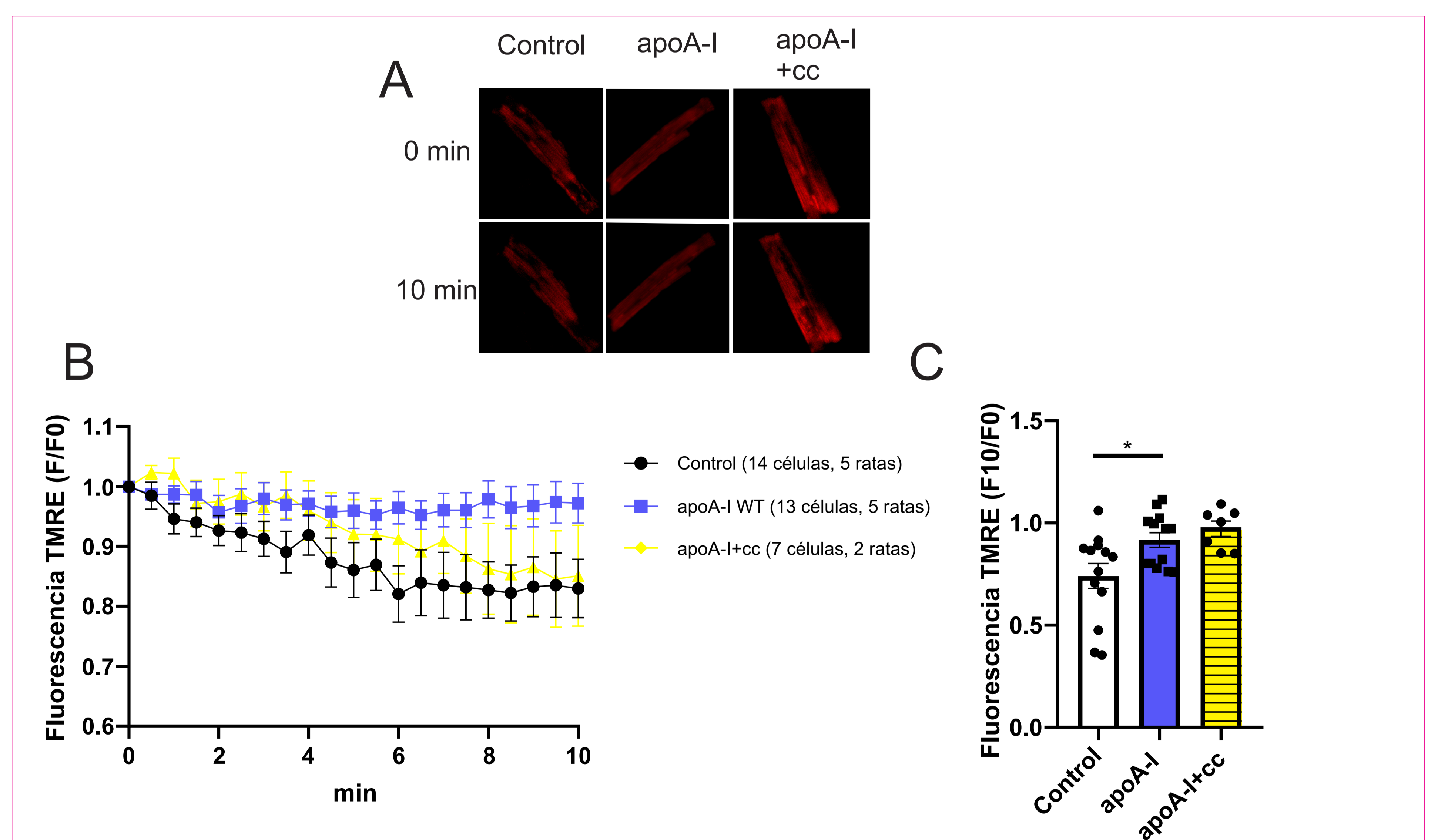
**Figura 1. Expresión y purificación de apoA-I.** Esquema que representa la purificación de la apo recombinante en E. coli. En resumen, la construcción HisTag-apoA1 se encuentra clonada en el pET30a, separadas ambas secuencias por un puente ácido lábil Asp-Pro. Partiendo del stock de glicerol las bacterias se cultivaron en medio LB + kanamicina. Cuando alcanzaron D.O. 600nm= 0,5 se indujo la expresión de HisTag-apoA1 por IPTG. A posterior se cosecharon las bacterias por centrifugación y se lisaron las células con Gnd-HCl 6 M. El extracto se dializó y clarificó para luego ser purificado por cromatografía de afinidad utilizando una columna cargada con Imac Shepharose6 Fast Flow + NiSO4. La fracción de elución con HisTag-apoA1 pura se trató con  $\text{Ac. fórmico}$  45%  $60^\circ C$  5h. Dialisis. Luego de dializar exhaustivamente (Tris 20 mM pH 8 ClNa 150 mM) la muestra se purificó nuevamente por cromatografía de afinidad para separar HisTag de apoA1. Ambas cromatografías se chequearon por SDS PAGE 14%. Por último, la fracción conteniendo apoA1 pura se dializó y cuantificó por Bradford para luego ser alícuotada y almacenada a  $-80^\circ C$ .



**Figura 2. La exposición aguda a apo A-I disminuye el tamaño del infarto (A), tiende a mejorar la función contráctil (B) y a disminuir la contractura inducida por la isquemia-reperfusión (C).** \* indica  $p < 0.05$  vs control, test de T.



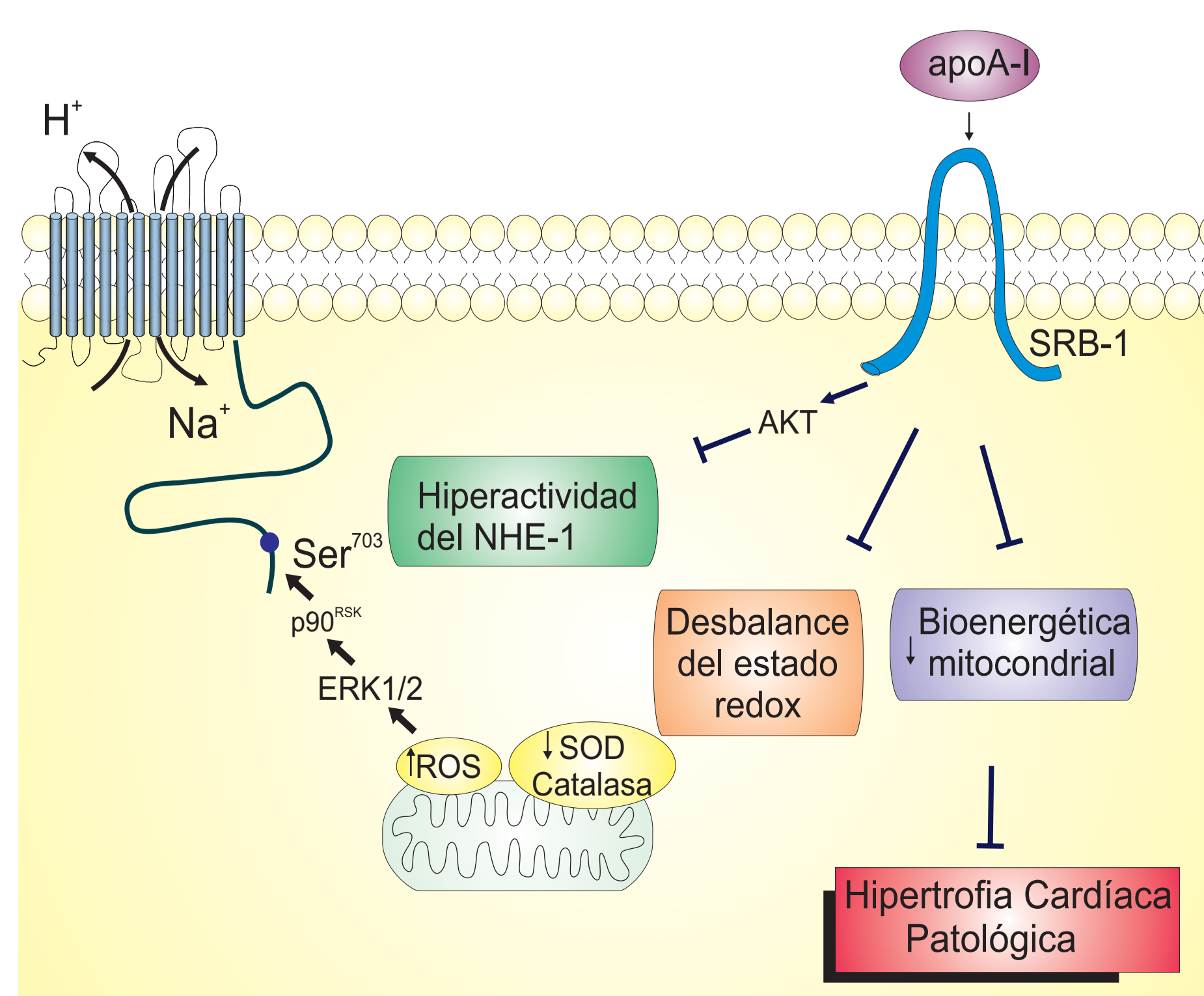
**Figura 3. La exposición aguda a apoA-1 disminuye la producción de ROS en cardiocitos aislados de SHR.** Se muestran resultados promedio de la actividad enzimática al cabo de 15 min en corazones perfundidos. \* indica  $p < 0.05$  vs control. Test ANOVA.



**Figura 4. La preincubación con apoA-1 de los cardiomiocitos aislados evitó la caída del potencial de membrana mitocondrial inducida por  $H_2O_2$ .** A. Micrografías representativas de los cardiomiocitos cargados con TMRE. B. Curso en el tiempo del potencial de membrana mitocondrial en presencia de  $H_2O_2$ . C. Resultados promedio a los 10 min respecto al tiempo cero. \* indica  $p < 0.05$  vs control, Test ANOVA.

## CONCLUSIÓN

Nuestros resultados preliminares demuestran que la apoA-I tiene efectos cardioprotectores, ya que disminuyó el tamaño del infarto y tendió a aumentar la función contráctil luego de un protocolo de isquemia-reperfusión. Estos efectos podrían deberse a una disminución de la producción de especies reactivas del oxígeno y mejora del estado mitocondrial en el miocardio de ratas espontáneamente hipertensas.



## BIBLIOGRAFIA

- 1-Garciarena, C.D., et al., Myocardial reperfusion injury: reactive oxygen species vs. NHE-1 reactivation. Cell Physiol Biochem, 2011.
- 2-Karmazyn M, S, Pierce GN, Fliegel L, The Remaining Conundrum of the Role of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Isoform 1 (NHE1) in Cardiac Physiology and Pathology: Can It Be Rectified? 2022.
- 3-Godoy Coto, J., et al., Exercise-induced cardiac mitochondrial reorganization and enhancement in spontaneously hypertensive rats. Pflugers Arch, 2024.
- 4- Van Linthout, S et al. Human Apolipoprotein A-I Gene Transfer Reduces the Development of Experimental Diabetic Cardiomyopathy. Molecular Cardiology 2008.
- 5- Al-Jarallah, A. and Babiker, F., High density liprotein reduces blood pressure and protects spontaneously hypertensive rats against myocardial ischemia-reperfusion injury in an SR-B1 dependent manner. Frontiers in Cardiovascular Medicine, 2022.
- 6- Mishra, m., et al., Administration of apoA-I (Milano) nanoparticles reverses pathological remodeling, cardiac dysfunction, and heart failure in a murine model of HF pEF associated with hypertension. Scientific reports, 2020.