

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectos cardioprotectores de la SNO de proteínas.....	Pág. 6
Tabla 2. Protocolo de preparación de geles de poliacrilamida.....	Pág.27
Tabla 3. Composición del reactivo revelador.....	Pág.31
Tabla 4. Composición del reactivo Fijador	Pág.31
Tabla 5. Composición de la solución de tinción.....	Pág.32
Tabla 6. Composición de la solución de lavado.....	Pág.33
Tabla 7. Peso promedio del grupo Control y grupo Prueba.....	Pág.34
Tabla 8. Curva de calibración de albumina de suero bovino medido utilizando el método de BCA.....	Pág.35
Tabla 9. Cuantificación de proteínas totales en los homogenizados cardiacos.....	Pág.36

INDICE

1. RESUMEN	Pág.1
2. INTRODUCCIÓN	Pág.2
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	Pág.3
3.1 Señalización basada en óxido nítrico en el cardiomiocito	Pág.3
3.2 S-nitrosilación de proteínas y su rol cardioprotector	Pág.4
3.2.1 S-nitrosilación de proteínas mitocondriales.....	Pág.7
3.2.2 Transición a permeabilidad mitocondrial.....	Pág.8
3.2.3 SNO regula el manejo de Ca ⁺² intracelular.....	Pág.10
3.2.4 Otros efectos cardioprotectores de SNO en cardiomiocitos.....	Pág.11
3.3 Denitrosilación	Pág.11
3.3.1 Mecanismo enzimático de denitrosilación por GSNOR.....	Pág.12
3.3.2 Inhibición enzimática de la GSNOR.....	Pág.14
3.4 Detección de proteínas S-nitrosiladas	Pág.15
3.4.1 Técnica de cambio de biotina (<i>biotin switch</i>).....	Pág.16
3.4.2 Principales limitaciones de la técnica.....	Pág.19
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	Pág.20
4.1 Hipótesis.....	Pág.20
4.2 Objetivo general.....	Pág.20
4.3 Objetivos específicos.....	Pág.20
5. MATERIALES Y METODO	Pág.21
5.1 Animales	Pág.21
5.2 Eutanasia	Pág.21
5.3 Retroperfusión de corazón aislado de rata	Pág.22
5.4 Nitrosilacion de proteínas	Pág.23

5.5 Determinación de proteínas totales	Pág.24
5.6 Western blot	Pág.25
5.6.1 Electroforesis de proteínas	Pág.26
5.6.2 Electrotransferencia.....	Pág.28
5.6.3 Bloqueo.....	Pág.29
5.6.4 Detección de proteínas nitrosiladas	Pág.29
5.6.5 Revelado.....	Pág.30
5.6.6 Cuantificación de proteínas nitrosiladas.....	Pág.31
5.7 Tinción de proteínas con azul de coomasie	Pág.32
5.8 Análisis estadístico	Pág.33
6. RESULTADOS	Pág.34
6.1 Grupos experimentales	Pág.34
6.2 Cuantificación de proteínas totales	Pág.34
6.2.1 Curva de calibración de albúmina de suero bovino.....	Pág.34
6.2.2 Cuantificación de proteínas totales en homogenizados cardiacos.....	Pág.36
6.3 Retroperfusión de corazón aislado de rata	Pág.36
6.3.1 Presión ventricular desarrollada	Pág.37
6.3.2 Contractilidad cardiaca	Pág.38
6.3.3 Relajación	Pág.39
6.3.4 Presión coronaria.....	Pág.40
6.3.5 Frecuencia cardiaca.....	Pág.41
6.4 Nitrosilación de proteínas	Pág.42
6.5 Tinción de proteínas con azul de coomasie	Pág.48
7. DICUSIÓN	Pág.50
8. CONCLUSIÓN	Pág.55
9. BIBLIOGRAFÍA	Pág.56

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Posibles mecanismos de cardioprotección de las proteínas SNO.....	Pág.5
Figura 2. Mecanismos de muerte celular en mitocondrias durante IR.....	Pág.9
Figura 3. Potenciales mecanismo de SNO que inducen cardioprotección.....	Pág.10
Figura 4. S-nitrosilación y denitrosilación de proteínas mitocondriales con residuos SH disponibles.....	Pág.13
Figura 5. Compuesto utilizado en este estudio: C2.....	Pág.14
Figura 6. Mecanismo cinético de GSNOR y los tipos de complejos formados por el ácido dodecanoico y los nuevos inhibidores de la enzima.....	Pág.15
Figura 7. Métodos comunes de detección de SNO.....	Pág.16
Figura 8. Descripción de la técnica de <i>Biotin Switch</i>	Pág.18
Figura 9. Esquema del montaje de retroperfusión.....	Pág.23
Figura 10. Flujo de trabajo: ensayo de nitrosilaciones.....	Pág.24
Figura 11. Esquema de separación del marcador de peso molecular.....	Pág.27
Figura 12. Esquema de armado de sándwich de transferencia.....	Pág.29
Figura 13. Curva de calibración de albúmina por el método de BCA.....	Pág.35
Figura 14. Comparación de la presión ventricular desarrollada expresada en mmHg entre el grupo Control y grupo tratado con el Inhibidor de GSNOR.....	Pág.37

Figura 15. Comparación de la contractilidad expresada en mmHg /s entre el grupo Control y grupo tratado con el Inhibidor de GSNOR.....	Pág.38
Figura 16. Comparación de la relajación expresada en mmHg/s entre el grupo Control y grupo tratado con Inhibidor de GSNOR.....	Pág39
Figura 17. Comparación de la presión coronaria expresada en mmHg entre el grupo Control y grupo tratado con Inhibidor de GSNOR.....	Pág.40
Figura 18. Comparación de la frecuencia cardiaca registrada, la cual se en latidos por minutos entre el grupo Control y grupo tratado con Inhibidor de GSNOR.....	Pág.41
Figura 19. Nivel de S-nitrosilaciones evaluado por el método de <i>cambio de biotina</i> en homogenizados de proteínas cardiacas.....	Pág.42
Figura 20. Comparación del nivel de S-nitrosilaciones a través de la intensidad de la señal expresada en pixeles para el grupo Control versus el grupo tratado el inhibidor de GSNOR.....	Pág.43
Figura 21. Nivel de S-nitrosilaciones evaluado por el método de <i>cambio de biotina</i> en homogenizados de proteínas cardiacas.....	Pág.44
Figura 22. Comparación del nivel de S-nitrosilaciones a través de la intensidad de la señal expresada en pixeles para el grupo Control versus el grupo tratado el inhibidor de GSNOR.....	Pág.45
Figura 23. Nivel de S-nitrosilaciones evaluado por el método de <i>cambio de biotina</i> en homogenizados de proteínas cardiacas.....	Pág.46
Figura 24. Nivel de S-nitrosilaciones evaluado por el método de <i>cambio de biotina</i> en homogenizados de proteínas cardiacas.....	Pág.46

Figura 25. . Comparación del nivel de S-nitrosilaciones a través de la intensidad de la señal expresada en pixeles para el grupo Control versus el grupo tratado inhibidor de GSNOR..... Pág.47

Figura 26. Visualización del contenido proteico total del homogenizado inicial, teñido con azul de coomasie. Gel 1, primer ensayo de nitrosilacion..... Pág.48

Figura 27. Visualización del contenido proteico total, teñido con azul de coomasie. Gel 2, primer ensayo de nitrosilacion..... Pág.49

*Agradecida siempre de mi familia, sin la cual no podría haber
llegado hasta acá. A mi pololo Jesús y en especial, a la personita que
ha cambiado mi vida: Mi hermosa hija PASCAL*

