

## ÍNDICE

<b>1. Resumen.....</b>	<b>Pág.1</b>
<b>2. Introducción.....</b>	<b>Pág.3</b>
<b>3. Revisión bibliográfica.....</b>	<b>Pág.5</b>
<b>3.1 S-nitrosilación una mdificación post-traducciona.....</b>	<b>Pág.5</b>
3.1.1 S-nitrosilacion y su implicancia como vía de transducción intracelular.....	Pág.6
<b>3.2 Mecanismos de S-nitrosilación a nivel intracelular.....</b>	<b>Pág.7</b>
<b>3.3 Mecanismos de denitrosilación a nivel intracelular.....</b>	<b>Pág.9</b>
3.3.1 mecanismos enzimáticos de denitrosilación por GSNOR.....	Pág 10
3.3.2 Inhibición enzimática de GSNOR.....	Pág.12
<b>3.4 La señal de S-nitrosilación en la muerte celular.....</b>	<b>Pág.13</b>
<b>3.5 Señalización del NO en el cardiomiocito.....</b>	<b>Pág.16</b>
3.5.1 Efectos de las isoformas de NOS en la funcionalidad del miocardio.....	Pág.18
3.5.2 S-nitrosilación proteica como efectores generadores de cardio protección.....	Pág.21
3.5.3 Regulación del calcio intracelular en el cardiomiocito.....	Pág.22
3.5.4 S-nitrosilación implicada en el balance oxido-reducción.....	Pág.23
<b>3.6 Propuestas terapéuticas asociadas a la S-nitrosilación proteica en enfermedades cardiacas.....</b>	<b>Pág.24</b>
<b>3.7 S-nitrosilación de proteínas mitocondriales.....</b>	<b>Pág.25</b>
3.7.1 transición de permeabilidad mitocondrial.....	Pág.26
<b>3.8 Detección de proteínas S-nitrosiladas.....</b>	<b>Pág.27</b>

3.8.1	Técnica del interruptor de biotina (Biotin switch)	Pág.28
3.8.2	Limitaciones de la técnica	Pág.31
<b>4.</b>	<b>Hipótesis y objetivos</b>	<b>Pág.32</b>
4.1	Hipótesis	Pág.32
4.2	Objetivo general	Pág.32
4.3	Objetivos específicos	Pág.32
<b>5.</b>	<b>Materiales y métodos</b>	<b>Pág.33</b>
5.1	Muestras de tejido cardiaco de ratas	Pág.33
5.2	Obtención de homogenizado de ratas	Pág.33
5.3	Determinación de proteínas totales	Pág.34
5.4	Cuantificación de la actividad de GSNOR	Pág.34
5.5	S-nitrosilación de proteínas	Pág.35
5.6	Separación de proteínas biotiniladas con resina	Pág.37
5.7	Electroforesis de proteínas	Pág.38
5.8	Tinción de proteínas con azul de coomasie	Pág.40
5.9	Western-blot	Pág.42
5.10	Bloqueo	Pág.42
5.11	Detección de proteínas S-nitrosiladas	Pág.44
5.12	Revelado	Pág.44
5.13	Cuantificación de proteínas S-nitrosiladas	Pág.47
5.14	Análisis estadístico	Pág.47
<b>6.</b>	<b>Resultados</b>	<b>Pág.48.</b>
6.1	Cuantificación de proteínas basales	Pág.48.
6.2	Cuantificación de proteínas totales en homogenizados de tejido cardiaco	Pág.49
6.3	Determinación de la actividad de GSNOR	Pág.50
6.4	Tinción de geles de poliacrilamida con azul de Coomasie	Pág.53
6.5	S-nitrosilación de proteínas	Pág.55
6.6	Identificación de proteínas S-nitrosilación	Pág.58
<b>7.</b>	<b>Discusión</b>	<b>Pág.63</b>
<b>8.</b>	<b>Conclusión</b>	<b>Pág.65</b>
<b>9.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>Pág.66</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura N°1.</b> Mecanismos propuestos en la formación de enlaces nitrosotioles.....	Pág.8
<b>Figura N°2.</b> S-nitrosilación y denitrosilación de proteínas mitocondriales con residuos SH disponibles.....	Pág.10
<b>Figura N°3.</b> C2 Ácido 5-cloro-3-{2-[(4-etoxifenil)(etil)amino]-2-oxoetil}-1H-indole-2-carboxilo.....	Pág.11
<b>Figura N°4.</b> Mecanismo cinético de GSNOR y los tipos de complejos formados por el ácido dodecanoico y los nuevos inhibidores de la enzima.....	Pág.13
<b>Figura N°5.</b> Vías de apoptosis asociada a la S-nitrosación de proteínas.....	Pág.15
<b>Figura N°6.</b> Síntesis de óxido nítrico.....	Pág.16
<b>Figura N°7.</b> Isozimas NOS y señalización en un cardiomiocito saludable (izquierda) y en situación patológica (derecha).....	Pág.18
<b>Figura N°8.</b> GAPDH actúa como una trans-S-nitrosilasa mitocondrial.....	Pág.26
<b>Figura N°9.</b> Métodos comunes de detección de SON.....	Pág.28
<b>Figura N°10.</b> Descripción de la técnica de “Biotin-Switch”.....	Pág.30
<b>Figura N°11.</b> Reacción catalizada por la enzima GSNOR en la metabolización del GSNO dependiente de NADH.....	Pág.35
<b>Figura N°12.</b> Diagrama del proceso de tres pasos de nitrosotiol de proteínas (S-NO) en el etiquetado con biotina.....	Pág.36
<b>Figura N°13.</b> Esquema de separación del marcador de peso molecular SDS-PAGE - Prism Ultra Protein Ladder (3.5 - 245 kDa) (ab116029). .....	Pág.40
<b>Figura N°14.</b> Esquema de armado de sándwich de transferencia.....	Pág.42
<b>Figura N°15.</b> Análisis de western-blot de membrana mitocondrial en muestras de hígado de rata usando coctel de anticuerpos mononucleares.....	Pág.46
<b>Figura N°16.</b> Curva de calibración de albúmina de suero bovino por el método de BCA Pierce™.....	Pág.48

<b>Figura N°17.</b> Gráficos que muestran la disminución de la absorbancia leída a 340 nm en el tiempo en homogenizados de corazón tratados con inhibidor de GSNO (P), controles (C) y homogenizado de hígado (Control +) en un medio con NADH y GSNO.....	Pág.52
<b>Figura N°18.</b> Gráfico del $\Delta$ absorbancia ( $Abs_{inicial}-Abs_{final}$ ), a los 0 y 10 minutos respectivamente transcurrida la reacción en medios que contienen NADH/GSNO, solo GSNO (S/GSNO) y solo NADH (S/NADH).....	Pág.53
<b>Figura N°19.</b> Tinción de azul de coomasie en geles de poliacrilamida posterior a la corrida electroforética.....	Pág.54
<b>Figura N°20.</b> Nivel de S-nitrosilación de proteínas de homogenizado de corazón de rata sometidos a tratamiento inhibición enzimática de GSNOR y los no tratados.....	Pág.56
<b>Figura N°21.</b> Comparación del nivel de S-nitrosilación por medio de la intensidad de señal expresada en pixeles para el grupo control y el grupo tratado con el inhibidor de GSNOR.....	Pág.56
<b>Figura N°22.</b> Nivel de S-nitrosilación de proteínas de homogenizado de corazón de rata expuestos a ascorbato y no expuestos a ascorbato durante la realización del ensayo “Biotin-swicht”.....	Pág.57
<b>Figura N°23.</b> Gráfico de la intensidad de señal en muestras sometidas a biotin-swicht en presencia de ascorbato y sin ascorbato.....	Pág.58
<b>Figura N°24.</b> Gel 1 (superior) y gel 2 (inferior), Proteínas mitocondriales obtenidas de un homogenizado de corazón de rata, sometido a separación con Streptoavidina-agarosa posterior al “biotin-swicht”.....	Pág.59
<b>Figura N°25.</b> Intensidad de señal de proteínas mitocondriales (ciclofilina D, VDAC-1, C-Va y core-I) evaluadas en el gel 1.....	Pág.61
<b>Figura N°26.</b> Intensidad de la señal de proteínas mitocondriales (ciclofilina D, core-I, VDAC-1 y C-Va) evaluadas en gel 2.....	Pág.62

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla N°1.</b> Blancos de S-nitrosilación implicados en la apoptosis celular.....	Pág.23
<b>Tabla N°2.</b> Protocolo de preparación de geles de poliacrilamida.....	Pág.39
<b>Tabla N°3.</b> Composición de solución de tinción.....	Pág.41
<b>Tabla N°4.</b> Composición de la solución de lavado.....	Pág.41
<b>Tabla N°5.</b> Composición del reactivo revelador.....	Pág.46
<b>Tabla N°6.</b> Composición del reactivo fijador.....	Pág.46
<b>Tabla N°7.</b> Curva de calibración de albumina de suero bovino medido utilizando el método de BCA Pierce <sup>TM</sup> .....	Pág.48
<b>Tabla N°8.</b> Cuantificación de proteínas totales en homogenizados de tejido cardiaco.....	Pág.50