



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**CARDIOPROTECCIÓN BASADA EN LA S-NITROSILACIÓN DE
PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL**

**PROYECTO DE MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA**

**ALUMNO: GUSTAVO HERRERA GÁLVEZ
PROFESOR GUIA: DR. DANIEL GONZALEZ REINOSO**

TALCA-CHILE

2018

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

ÍNDICE

| | |
|---|---------------|
| 1. Resumen..... | Pág.1 |
| 2. Introducción..... | Pág.3 |
| 3. Revisión bibliográfica..... | Pág.5 |
| 3.1 S-nitrosilación una mdificación post-traducciona..... | Pág.5 |
| 3.1.1 S-nitrosilacion y su implicancia como vía de transducción intracelular..... | Pág.6 |
| 3.2 Mecanismos de S-nitrosilación a nivel intracelular..... | Pág.7 |
| 3.3 Mecanismos de denitrosilación a nivel intracelular..... | Pág.9 |
| 3.3.1 mecanismos enzimáticos de denitrosilación por GSNOR..... | Pág 10 |
| 3.3.2 Inhibición enzimática de GSNOR..... | Pág.12 |
| 3.4 La señal de S-nitrosilación en la muerte celular..... | Pág.13 |
| 3.5 Señalización del NO en el cardiomiocito..... | Pág.16 |
| 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 |
| 3.6 Propuestas terapéuticas asociadas a la S-nitrosilación proteica en enfermedades cardiacas..... | Pág.24 |
| 3.7 S-nitrosilación de proteínas mitocondriales..... | Pág.25 |
| 3.7.1 transición de permeabilidad mitocondrial..... | Pág.26 |
| 3.8 Detección de proteínas S-nitrosiladas..... | Pág.27 |

| | | |
|-----------|---|----------------|
| 3.8.1 | Técnica del interruptor de biotina (Biotin switch) | Pág.28 |
| 3.8.2 | Limitaciones de la técnica | Pág.31 |
| 4. | Hipótesis y objetivos | Pág.32 |
| 4.1 | Hipótesis | Pág.32 |
| 4.2 | Objetivo general | Pág.32 |
| 4.3 | Objetivos específicos | Pág.32 |
| 5. | Materiales y métodos | Pág.33 |
| 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 |
| 6. | Resultados | Pág.48. |
| 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 |
| 7. | Discusión | Pág.63 |
| 8. | Conclusión | Pág.65 |
| 9. | Bibliografía | Pág.66 |

INDICE DE FIGURAS

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

| | |
|--|--------|
| Figura N°17. 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 |
| Figura N°18. Gráfico del Δ 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 |
| Figura N°19. Tinción de azul de coomasie en geles de poliacrilamida posterior a la corrida electroforética..... | Pág.54 |
| Figura N°20. 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 |
| Figura N°21. 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 |
| Figura N°22. 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 |
| Figura N°23. Gráfico de la intensidad de señal en muestras sometidas a biotin-swicht en presencia de ascorbato y sin ascorbato..... | Pág.58 |
| Figura N°24. 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 |
| Figura N°25. Intensidad de señal de proteínas mitocondriales (ciclofilina D, VDAC-1, C-Va y core-I) evaluadas en el gel 1..... | Pág.61 |
| Figura N°26. 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

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

1. RESUMEN

El óxido nítrico (NO) es una molécula lábil sintetizada por un grupo de isoenzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS). se le considera un mensajero intracelular cuya complejidad en sus mecanismos de transducción de señales ha logrado un alto grado de importancia debido a su capacidad de lograr modificar la actividad, estructura y estabilidad de muchas proteínas, modulando la fisiología de muchos tipos celulares, efecto basado principalmente en dos mecanismos de señalización: uno indirecto (dependiente de GMPc) y otro directo (independiente de GMPc), que es comúnmente conocido como S-nitrosilación (S-NO), una modificación post-traducciona que consiste en la formación de un enlace covalente reversible entre un grupo tiol de cisteína y un grupo NO.

En el presente trabajo se evaluó la S-nitrosilación presente en el corazón de ratas expuesto a un inhibidor farmacológico de la actividad de la S-nitrosoglutatión reductasa (GSNOR), una enzima desnitrosilante que regula negativamente la generación de enlaces nitroso-tioles. Para esto se detectó la S-nitrosilación mediante el método de “Switch de biotina”. Se encontró un aumento de proteínas S-nitrosiladas, principalmente en aquellas que son clave en los procesos de actividad mitocondrial, así como VDCA-1, unidades F₀/F₁ ATPasa o proteínas de la cadena transportadora de electrones. Se observó que la inhibición de GSNOR genera un efecto que tiende al aumento de proteínas-SNO, encontrando que las proteínas mitocondriales tienden a un aumento de esta modificación postraducciona, especialmente de VDCA-1, proteína que puede tener cierta relevancia como factor cardioprotector en procesos isquémicos.

2. INTRODUCCIÓN

La S-nitrosilación es la unión covalente reversible y espontánea entre un residuo tiol de cisteína (contenida en una cadena polipeptídica) y una molécula de óxido nítrico (NO), que se ha relacionado en los procesos de modificación post-traduccionales en las proteínas, regulando así diversas funciones como señalizaciones químicas intracelulares, regulación alostérica, control de la homeostasis intracelular y protección contra el estrés oxidativo (1, 2).

El extenso ámbito fisiológico de la S-nitrosilación queda de manifiesto cuando se describen desbalances en los procesos de nitrosilación/denitrosilación (reacciones de formación y escisión del enlace nitro-tiol respectivamente), donde se asocia a una lista creciente de patologías que incluye endotoxicidad celular, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, hipertensión pulmonar y enfermedades cardiovasculares, donde son estas últimas las que se abordaran con mayor énfasis (3-5).

En algunas de las afecciones cardiacas se producen eventos denominados de isquemia-reperfusión, donde la isquemia se define como aquel periodo en el cual las células están sometidas a una condición de hipoxia, que desencadena una detención de los procesos metabólicos dependientes de oxígeno como la fosforilación oxidativa. Una vez restablecida la circulación sanguínea se denomina perfusión (1, 6). Se ha establecido que el daño celular por los eventos cardiovasculares se debe principalmente al estrés oxidativo a nivel de proteínas clave en el funcionamiento de los cardiomiocitos, por lo que la S-nitrosilación

juega un rol protector contra las modificaciones oxidativas irreversibles a nivel de la estructura proteica disminuyendo la probabilidad de daño tras la reperfusión cardiaca (6-8).

Las proteínas que mayormente se mencionan como un factor protector relacionada con la S-nitrosilación son las involucradas con el manejo del calcio intracelular (canales de calcio tipo L, SERCA2/ATPasa, VDAC-2 y RyR-2) y las mitocondriales (subunidad F₀-F₁ ATPasa mitocondrial, -KGDH, NADH deshidrogenasa, citocromo C oxidasa, ciclofilinas y VDAC-1) (9). Por lo tanto, se pretende evaluar el nivel de S-nitrosilación de proteínas mitocondriales en tejido cardiaco de ratas sometidos a procesos de ischemia-reperfusión y tratados con un inhibidor farmacológico de la nitrosoglutatioión reductasa (GSNOR) (10), enzima que está ampliamente implicada en los procesos de denitrosilación, con la finalidad de dilucidar el aumento de S-nitrosilación de la(s) posibles proteína(s) objetivo(s), empleando la técnica de “Biotin-swicht”(6), correlacionando la S-nitrosilación a su importancia como factor de cardioprotección.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 S-NITROSILACIÓN UNA MODIFICACIÓN POST-TRADUCCIONAL.

La función del NO como mensajero de señales intracelulares fue establecido por primera vez en la demostración de su función vasodilatadora en la musculatura lisa a nivel del endotelio vascular mediante la activación de guanilato ciclasa soluble (GCs), donde el descubrimiento de las enzimas óxido nítrico sintasas (NOS) (11) permitió ampliar aún más el conocimiento de otras vías de señalización que son iniciadas por esta molécula. La unión del NO al hierro del grupo hemo de la proteína GCs, denominada actualmente como S-nitrosilación, reveló que existían otras formas de interacción entre las proteínas y el NO, conocidas como S-nitrosación, enlaces covalentes reversibles formados mediante el ataque electrofílico NO^+ hacia un grupo tiolato (-S \cdot) de la cisteína y la S-nitración definida químicamente como la adición de NO_2 a las cadenas laterales de residuos de cisteínas de una proteína mediada por ONOO^- (12, 13).

Por lo tanto, en los últimos años el estudio de estas interacciones entre NO y grupos tioles de cisteína ha mostrado un crecimiento tal que la lista de proteínas que presentan sitios tioles reguladores ha aumentado dramáticamente, teniendo como importancia la participación en distintos tipos de señalización intracelular (13). En síntesis, se considera que la S-nitrosilación es una modificación post-traducciona que se regula con precisión en el tiempo y espacio, otorgando especificidad a los efectos mediados por NO, que permiten que funcione como un mecanismo que transmite señales intracelulares basadas en reacciones óxido-reducción (2).

3.1.1 S-NITROSILACIÓN Y SU IMPLICANCIA COMO VÍA DE TRANSDUCCIÓN INTRACELULAR.

La formación de enlaces nitroso-tiol en las proteínas es un evento altamente conservado en la evolución de las células como un mecanismo de señalización intracelular visto en una gran cantidad de proteínas con funciones vitales. Actualmente se considera en muchos estudios que la formación de este enlace es un efector terminal de la señalización mediada por NO y que además contribuye a la homeostasis, puesto que la desregulación de los procesos de nitrosilación/denitrosilación contribuyen en la patogenia de muchas enfermedades. Por ejemplo: enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 1 y 2(14), aterosclerosis (15), lesión isquémica cardiaca (16), hipertrofia (17), sepsis (18), etc.

Por lo tanto, se considera que la S-nitrosilación al igual que la fosforilación, es una modificación post-traducciona estable que media directamente la señalización al alterar la función de las proteínas efectoras finales, sin embargo, ha existido mucho debate al respecto con la “omnipresencia” de este tipo de modificación en estos procesos que hasta el día de hoy se siguen discutiendo. Sin embargo, la importancia de la S-nitrosilación en procesos fisiológicos celulares ha sido claramente establecido (2, 13).

El establecimiento de la S-nitrosilación como una vía de transducción y señalización intracelular queda demostrada por la similitud con una de las vías de señalización más importantes en todos los sistemas biológicos celulares, la fosforilación. Esta presenta muchas de las características que se pueden observar en los procesos implicados en la S-nitrosilación, como: a) tener regulación específica mediada por enzimas con funciones antagonistas (nitrosilasas/denitrosilasas), b) solo ocurre ante determinadas secuencias de consenso de residuos de cisteína presentes en determinadas proteínas (característica de

especificidad) y finalmente, c) los niveles de S-nitrosilación deben estar en cantidades estequiométricamente significativas para generar un efecto en la proteína blanco(2).

De esta manera, todas estas características presentan un alto paralelismo con respecto a las vías de señalización mediadas por fosforilación, mediando procesos tan fundamentales en la homeostasis celular, como por ejemplo la apoptosis.

3.2 MECANISMOS DE S-NITROSILACIÓN A NIVEL INTRACELULAR.

La S-nitrosilación es un proceso que se contrasta con las vías de fosforilación mediadas por quinasas, donde las características basadas en su co-localización con sus sustratos específicos y selectividad adicional en secuencias de consenso de proteínas blancos es similar al comportamiento de las enzimas NO sintasas (NOS). Denominadas generalmente como “nitrosilasas”, median la formación de especies derivadas del nitrógeno, las que pueden ocasionar la S-nitrosilación directa o indirecta (trans-nitrosilación) de varios residuos de cisteína involucrados en sitios de regulación de la actividad proteica(13).

La formación de enlaces S-nitrosotiol (R-SNO) puede ocurrir a través de múltiples vías (Figura N°1). El NO puede reaccionar con metales de transición para formar un intermediario seguido de una transferencia directa de NO al residuo tiol, reaccionar con superóxido para formar ONOO- seguido de la pérdida de •OH para formar NO₂, posteriormente el NO₂ forma especies de donadoras de grupos NO, como N₂O₃ y N₂O₄, que directamente se dirigen a la formación de enlaces S-nitrosotioles. Los intermedios en la vía NO/NO₂ pueden convertir un tiol en un radical tiilo (RS •) que luego reacciona directamente con NO formando un enlace nitrosotiol (S-NO), produciendo que los tioles

sean trans-nitrosilados en un proceso en el cual un S-nitrosotiol transfiere su grupo NO directamente a otro tiol (19).

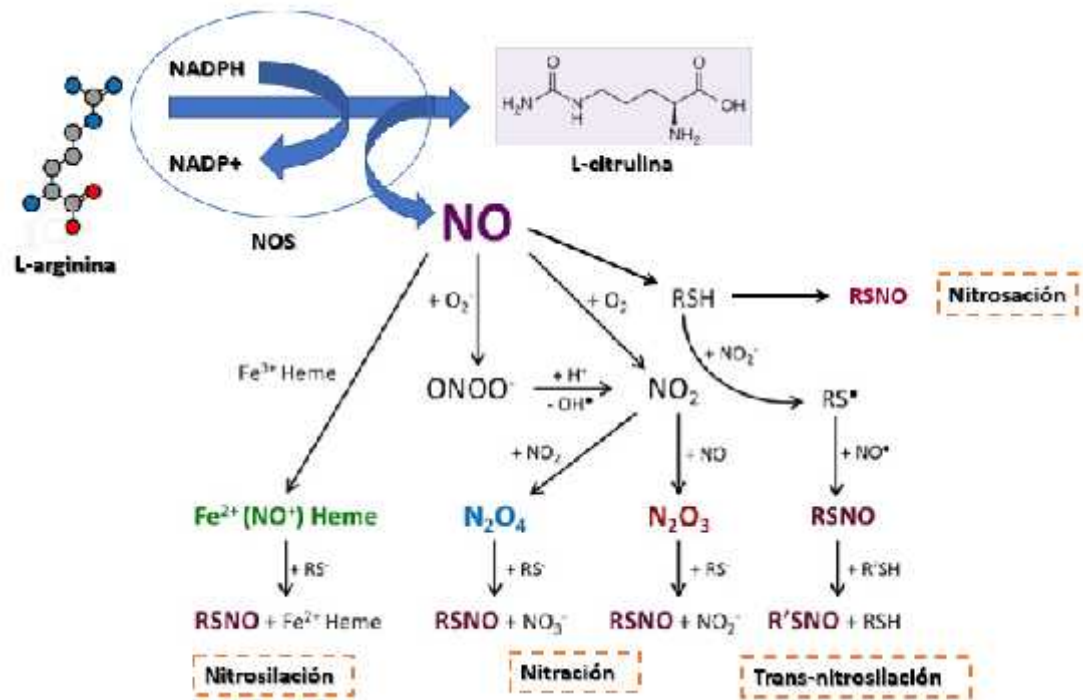


FIGURA N°1: MECANISMOS PROPUESTOS EN LA FORMACIÓN DE ENLACES NITROSO-TIOLES. Partiendo desde la formación de NO a partir de L-arginina en presencia de oxígeno y otros intermediarios como tetrahidrobiopterina (BH₄), calcio-calmodulina, FAD, FMN y NADPH como agentes reductores y la reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS) (13).

En los sistemas celulares se conoce que muchos de los eventos bioquímicos pueden o no ocurrir, dependiendo del microambiente presente en el medio intracelular, por lo tanto, la S-nitrosilación en un escenario compatible con la fisiología, que estaría mediado principalmente por las NOS, donde la formación de derivados del nitrógeno formarían especies donadoras de grupos NO. Pero en condiciones de hipoxia, generalmente

predominan los procesos de S-nitrosilación mediados por el ONOO⁻, demostrando la variabilidad de rutas que pueden ocasionar el mismo resultado. Sin embargo, existen ciertos factores que son cruciales para que este proceso ocurra, como la cercanía de aminoácidos con carga (ácidos o básicos) con el residuo tiol de cisteína, el ambiente hidrofóbico que solubiliza los derivados del nitrógeno y sus sustratos y la presencia de oxígeno, intermediario fundamental para la función de NOS (2, 13, 20).

3.3 MECANISMOS DE DENITROSILACIÓN A NIVEL INTRACELULAR.

La S-nitrosilación (SNO) *in vivo* no se determina sólo por las tasas de síntesis de NO, o por la generación misma de enlaces S-nitrosotioles, sino que implica un equilibrio entre la SNO y las vías de denitrosilación. La denitrosilación se logra a través de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. El principal mecanismo de reducción de la SNO es la trans-nitrosilación, en que un tiol actúa como receptor para el NO de la proteína S-nitrosilada(13). El ascorbato, utilizado experimentalmente como agente reductor específico para S-nitrosilación, extrae el NO del enlace SNO generando un tiol libre, que actúa como nucleófilo para una reacción de trans-nitrosilación en la cual se transforma en O-nitrosoascorbato. Por contraparte enzimática, destaca el mecanismo de la tiorredoxina (Trx) y de nitrosoglutatión reductasa (GSNOR) (figura 2), siendo este último el más estudiado y sugerentemente el más importante (21). En primer lugar, las Trx1 (citoplasmáticas) y Trx2 (mitocondrial) median la denitrosilación de sustratos múltiples de forma directa, estableciendo un puente disulfuro con los enlaces S-nitrosotioles de la proteína, permitiendo la liberación de NO en forma de HNO, mientras que la GSNOR reduce las proteínas S-nitrosiladas indirectamente a través de la formación de GSNO (22).

3.3.1 MECANISMOS ENZIMÁTICOS DE DENITROSILACIÓN POR GSNOR.

Las células contienen un sistema que comprende de glutatión reducido (GSH), S-nitrosoglutation reductasa (GSNOR) y glutatión reductasa (GR). GSNOR es una enzima clave en la regulación de formación de enlaces S-nitrosotioles vegetales, con evidencia de que juega el mismo papel en mamíferos. Gran parte de la evidencia proviene de ratones GSNOR^{-/-} donde la S-nitrosilación de proteínas en el corazón y el pulmón aumentó durante enfermedades cardiovasculares e insuficiencia pulmonar (23). GSNOR cataliza directamente la eliminación de NO de los tioles proteicos, pero más bien reduce la trans-nitrosilación o el 'pool de NO' mediante la eliminación de GSNO. GSNO es convertido a S-hidroxisulfenamida (GSNHOH) utilizando NADH como cofactor. GSNHOH posteriormente reacciona con GSH formando disulfuro de glutatión (GSSG) e hidroxilamina (NH₂OH). GSSG luego se reduce de nuevo a GSH por GR usando NADPH como cofactor (13). Por ende, la actividad del glutatión reductasa es necesaria para la denitrosilación fisiológica de GSNO (figura N°2). A pesar de que la GSNOR actúa solamente sobre el GSNO, es decir las proteínas SNO no son sustratos, este mecanismo enzimático regula la SNO influyendo en el equilibrio celular de proteínas SNO y GSNO. En comparación con la Trx que carecen de especificidad de sustrato y por lo tanto median la denitrosilación de muchas proteínas SNO (13, 18).

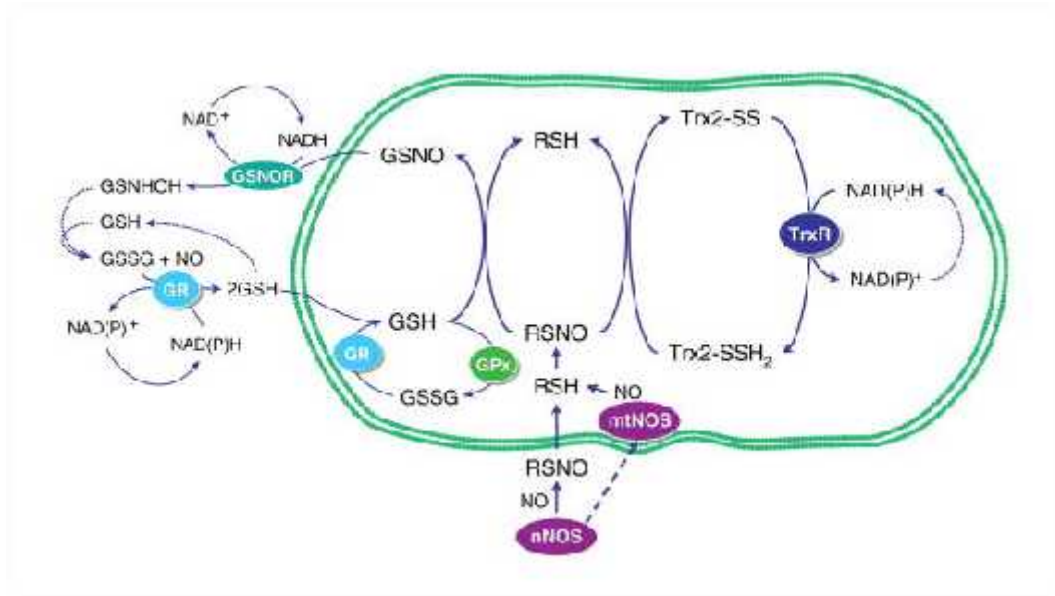


FIGURA N°2: S-NITROSILACIÓN Y DENITROSILACIÓN DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES CON RESIDUOS SH DISPONIBLES. La trans-nitrosilación de glutatión (GSH) por proteínas S-nitrosiladas (RSNO) genera GSNO y una proteína desnitrosilada (RSH). El sistema tiorredoxina-2 (Trx2) se muestra dentro de la mitocondria acoplada a la desnitrosilación de proteínas. Una vez oxidada las Trx2 pueden ser entonces reducidas por al tiorredoxina reductasa (Trx2R), que consume NADH para regenerar las Trx2. El ciclo del GSNO se muestra a nivel del citoplasma vinculado a las proteínas mitocondriales por desnitrosilación en el contexto de reciclar el GSNO, el cual es reducido por GSNOR para generar GSNOH, que reacciona con GSH para generar GSSG. El ciclo se completa con la reducción d GSSG a GSH por GR (24).

3.3.2 INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LA GSNOR.

Mientras que la S-nitrosilación (SNO) media muchos efectos del NO dentro de la célula, las vías de denitrosilación son las que culminan estos efectos. Debido al papel de la GSNOR en el recambio de SNO de proteínas intracelulares se ha convertido en un objetivo importante para el desarrollo de agentes que modulan la bioactividad del NO. Es por ello, que han surgido nuevos inhibidores de la enzima, que excluyen al GSNO desde su sitio de unión e inhiben selectivamente a la GSNOR de entre las demás enzimas de alcohol deshidrogenasas, estos son derivados del ácido dodecanoico. Para efectos de este estudio, se trabajó con C2 ácido 5-cloro-3-{2-[(4-etoxifenil)(etil)amino]-2-oxoetil}-1H-indole-2-carboxilo, un compuesto sintético obtenido desde industrias química-farmacéuticas (figura N°3) (25) .

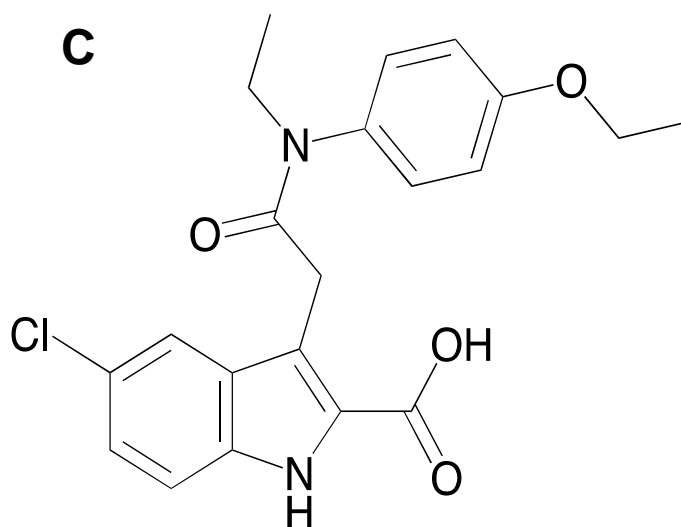


Figura N°3: C2 Ácido 5-cloro-3-{2-[(4-etoxifenil)(etil)amino]-2-oxoetil}-1H-indole-2-carboxilo (25).

La GSNOR tiene un camino convencional a través de la formación del complejo GSNOR-NADH (figura N°4), en su mecanismo de reducción de un aldehído. El GSNO (aldehído) puede unirse a la enzima libre (E), aunque se une preferentemente al complejo GSNOR-NADH y forman el complejo ternario competente E-NADH-GSNO. Dicho complejo sufre catálisis para formar los productos E-NAD⁺-P. Durante la liberación de los productos, cualquiera de ellos puede dejar la enzima. El inhibidor, es capaz de unirse al sitio activo de anclaje del GSNO, siendo capaz de adherirse a la enzima libre (etapa 1), o a los complejos binarios GSNO-NADH (etapa 2) y GSNOR-NAD⁺.

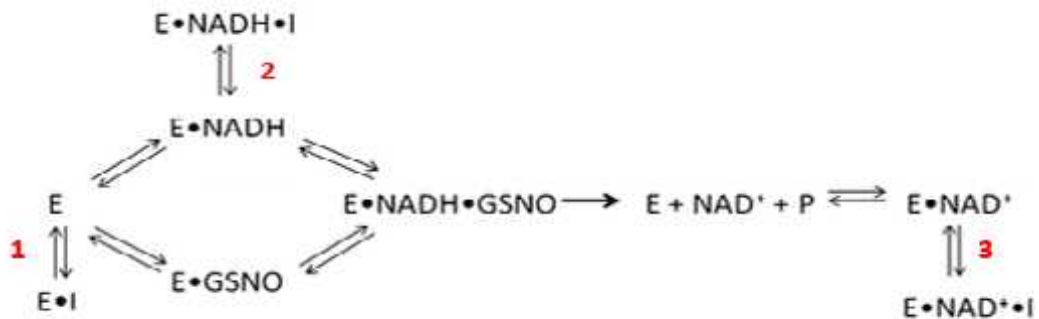


FIGURA N°4: MECANISMO CINÉTICO DE GSNOR Y LOS TIPOS DE COMPLEJOS FORMADOS POR EL ÁCIDO DODECANÓICO Y LOS NUEVOS INHIBIDORES DE LA ENZIMA(22).

C2 en la literatura ha mostrado diferentes tipos de actividad inhibitoria (25). Es capaz de anclarse al sitio de unión del GSNO tal como lo hace un inhibidor competitivo, sin embargo, muestran una actividad inhibitoria de tipo mixta no competitiva hacia GSNO y no competitiva hacia los cofactores NADH y NAD⁺. Esto se explica debido a que su vinculación a GSNOR es en más de un lugar en la vía cinética, una donde efectivamente compite con GSNO para unirse a la enzima (etapa 1, figura N°4) y otras en donde el GSNO normalmente no se une a la vía cinética (etapa 2 y 3, figura N°4).

3.4 SEÑAL DE LA S-NITROSILACIÓN PROTEICA EN LA MUERTE CELULAR.

La homeostasis en los tejidos se mantiene mediante un equilibrio constante entre las señales de supervivencia celular y muerte celular, que son iniciadas y mantenidas predominantemente por familias de distintas proteínas en compartimentos celulares específicos. Durante situaciones fisiológicas y patológicas, los desequilibrios de estas respuestas de señalización dan como resultado el crecimiento del tejido o el deterioro del tejido. Un aumento en las señales de supervivencia y una disminución en las señales de muerte promoverán el crecimiento celular y tisular, pero las señales de crecimiento sostenido a menudo conducen a condiciones patológicas como el cáncer. Por el contrario, el aumento de las señales de muerte y la disminución de las señales de supervivencia conducirán a la destrucción del tejido. Ambos procesos ocurren constantemente para mantener la homeostasis celular y descartar tejido no saludable (26).

La respuesta celular a la acción del NO depende de ciertos factores como el tipo de célula, estado fisiológico o patológico presente, las proteínas intracelulares implicadas y el tipo específico de donante de derivados nitrogenados, los cuales pueden tener una relación significativa tanto con la especificidad de las proteínas del sustrato que pueden verse afectadas como con la respuesta global que se puede observar (26). En este caso la S-nitrosilación mediada por NO puede impulsar la supervivencia celular en algunos casos, como también dirigir la muerte celular. Estos efectos aparentemente contradictorios se deben a las diferencias en las proteínas diana que están siendo S-nitrosiladas (figura N°5), el modelo celular y el tipo específico donante de grupos NO que la efectúa, describiendo un grupo selecto de proteínas implicadas en la regulación de la apoptosis celular asociada a estas modificaciones post-traduccionales en determinados residuos de cisteína. (Tabla N°1)(2, 9).

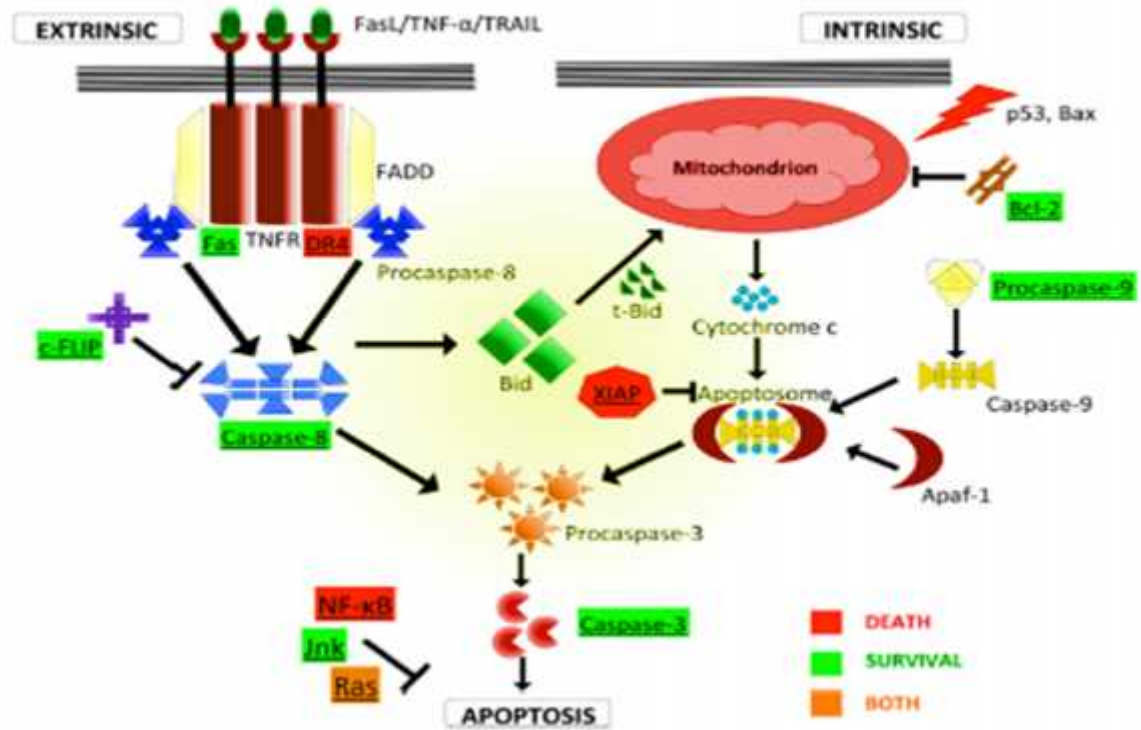


FIGURA N°5. VÍAS DE APOPTOSIS ASOCIADA A LA S-NITROSACIÓN DE PROTEÍNAS. Se observan las rutas intracelulares que dan lugar a la apoptosis celular, ya sea las proteínas que están involucradas tanto en la vía extrínseca como intrínseca, destacando aquellas proteínas que tienen un efecto protector (factores de supervivencia) después de la S-nitrosilación, resaltando con un color verde, mientras que las que tienen efectos pro-apoptóticos tras la S-nitrosilación se resaltan en rojo. Las proteínas que se describen con un efecto dual están indicadas en naranja (26).

TABLA N°1. BLANCOS DE S-NITROSILACIÓN IMPLICADOS EN LA APOPTOSIS CELULAR (26).

| Proteína | Sitio de S-NO | Efactor funcional |
|---------------------------|---|--|
| Caspasas (3,8 y 9) | Cys-163 (Caspasa-3) y Cys-287 (Caspasa 8 y 9) | Disminución de su actividad enzimática |
| Bcl-2 | Cys-158 y Cys-229 | Inhibición de la degradación de Bcl-2 |
| C-FLIP | Cys-254 y Cys259 | Inhibición de la degradación de C-FLIP |
| FAS | Cys-199 y Cys304 | Acumulación de receptores extrínsecos en vesículas lipídicas |
| GAPDH | Cys 150 | incremento de la unión a Siah-1 y translocación nuclear |
| Tiorredoxina | Cys-62, Cys-69 y Cys-73 | Inhibición de la apoptosis e incremento de radicales libres. |

3.5 SEÑALIZACIÓN DEL NO EN EL CARDIOMIOCITO.

El NO es una molécula esencial para el funcionamiento cardiovascular tanto de animales como de humanos, cuya obtención puede ser tanto de fuentes exógenas por medio de la alimentación de frutas y verduras con alto contenido de nitratos, que suele absorberse por la cavidad oral (glándulas salivales) junto con el tracto gastrointestinal, donde pasa por una serie de procesos que producen su reducción describiendo la vía conocida como nitrato-nitrito-óxido nítrico (13, 27). Las fuentes endógenas corresponden a la síntesis catalizada por las enzimas óxido nítrico sintasa (NOS) (Figura N°6). Estas enzimas son homodímeros cuyas subunidades contienen mononucleótidos de flavina (FMN), dinucleótidos de flavina (FAD) (dominio-reductasa), tetrahidrobiopterina y un grupo hem, intermediarios que facilitan la oxidación de la L-arginina dependiente de NADPH y O₂ para producir NO y el aminoácido L-citrulina (dominio-oxidasa), siendo esta reacción dependiente de Ca²⁺-calmodulina para su activación(3, 28).

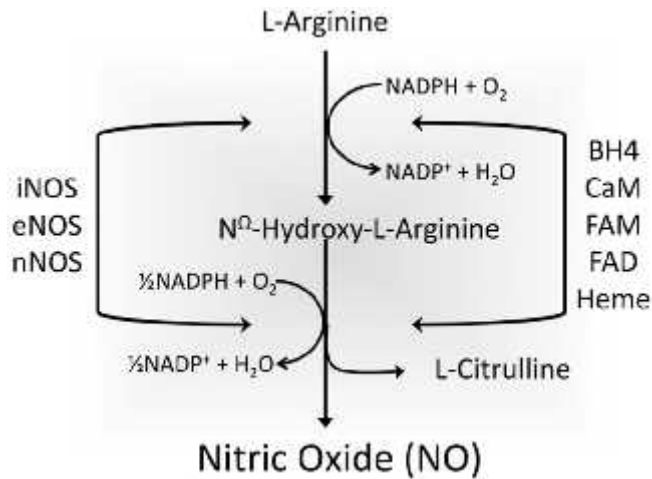


FIGURA N° 6. SÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO. El NO es sintetizado por tres isoformas de óxido nítrico sintasas (NOS) que catalizan la conversión del aminoácido L-arginina a la forma N-hidroxi-L-arginina intermedia, lo que finalmente da como resultado la liberación de L-citrulina. Este proceso involucra varios factores importantes como el

oxígeno molecular y NADPH, y cofactores importantes como flavinmononucleótido (FMN), flavinaminodinucleótido (FAD), tetrahidrobiopterina (BH₄), calcio-calmodulina y hemo unido a la enzima que se requieren para catalizar este proceso (26).

En los sistemas biológicos la producción endógena de NO esta mediado por tres isoformas que son codificadas por genes distintos, conocidas como NOS1 (neuronal), NOS2 (inducible) y NOS3 (endotelial). En los miocitos NOS1 y NOS3 se expresan de forma constitutiva, mientras que NOS2 se expresa mediante la estimulación de citoquinas, además es la única que no depende de Ca²⁺ para realizar su reacción, razón por la que es capaz de producir una mayor cantidad de NO (29).

En el cardiomiocito el NO puede producir efectos intracelulares principalmente por dos vías, una dependiente de GMPc (indirectas), que consiste en la activación directa del guanilato ciclasa soluble (GCs) con el posterior aumento de la cantidad de GMPc, que puede modular la actividad de las fosfodiesterasas-2 (estimulada por GMPc) y fosfodiesterasas-3 (inhibida por GMPc) o activar a la proteína-quinasa-B (PKB), de manera que regula la actividad de un gran cantidad de dianas proteicas. La vía independiente de GMPc (directas), se basa en la modificación post-traducciona mediante la formación de enlaces nitroso-tioles, ya antes mencionada(3, 11, 13, 29). La complejidad con respecto a la señalización del NO a nivel de los cardiomiocitos se explica debido a las variables rutas de transducción e interacción con otros radicales que pueden generar otros mensajeros adicionales, puesto que además de las vías directas e indirectas, también pueden ocurrir situaciones donde los niveles de superóxido (O₂⁻) en los desbalances redox pueden promover a la formación de ONOO⁻, que a bajas concentraciones pueden mediar reacciones de S-nitrosilación de proteínas, mientras que a altas concentraciones puede conducir a la nitración/oxidación irreversible que resulta ser dañina para las proteínas(28, 29).

3.5.1 EFECTOS DE LAS ISOFORMAS DE NOS EN LA FUNCIONALIDAD DEL MIOCARDIO.

Las isoformas de las NOS catalizan la misma reacción que conlleva a la producción de NO, no obstante, estos no generan el mismo efecto o señalizaciones a pesar de que sintetizan el mismo producto, esto es debido a que la funcionalidad o el efecto de las isoformas de NOS va a depender de su localización y tráfico entre los componentes subcelulares, describiendo roles cardioprotectores distintos para cada isoforma (figura N°7)(29).

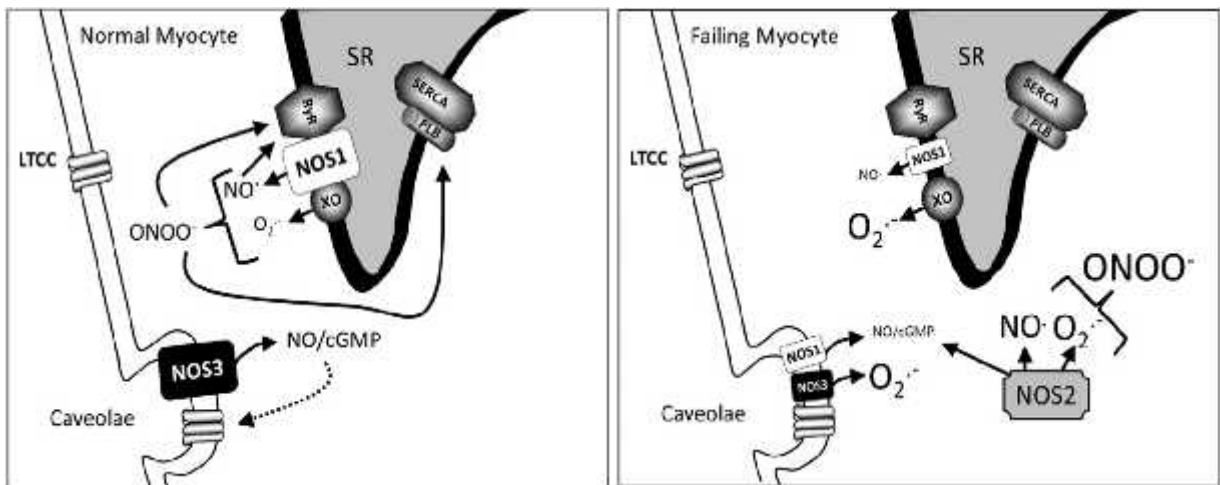


FIGURA N°7. ISOENZIMAS NOS Y SEÑALIZACIÓN EN UN CARDIOMIOCITO SALUDABLE (IZQUIERDA) Y EN SITUACIÓN PATOLÓGICA (DERECHA). La expresión de NOS3 está disminuida, dando lugar a arritmias a través de LTCC y el aumento de la probabilidad de hipertrofia, a través de una señalización mejorada de calcineurina-NFAT. NOS2 regula la contracción / hipertrofia a través de ambas vías dependientes de cGMP e independientes. Además, tanto NOS2 como NOS3 pueden desacoplarse para

producir O_2 y $ONOO$, lo que contribuye al aumento del estrés oxidativo en la insuficiencia cardiaca.(29).

La NOS1 (neuronal) es la isoforma que se considera como la más relevante en cuanto a la modulación y participación de todas las funciones cardiovasculares, pues su nivel de expresión incluye la mayoría de las partes del corazón, sistema nervioso autónomo, arterias de gran calibre (arteria aorta y pulmonar), arterias coronarias, aurículas y miocardio ventricular(28). Su localización principal es a nivel del sarcolema, pero se ha asociado también que puede estar a nivel de las mitocondrias y retículo sarcoplásmico, de manera que mediante la inducción de vías de transducción directas mediadas por la producción de peroxinitrito ($ONOO^-$), puede modular los procesos de homeostasis de Ca^{+2} y controlar la contractilidad cardiaca influyendo en los procesos de electro-excitación, teniendo como blancos principales los canales de tipo L de Ca^{+2} , el receptor de ryanodina (RyR) y la proteína SERCA $Ca^{+2}/ATPasa$ (3), además recientemente se le ha dado mucha importancia a los canales aniones de calcio dependiente de voltaje tipo 1 y 2 (VDCA-1/VDCA-2) con respecto a la modulación de la contracción cardiaca(10).

La NOS2 (inducible) a diferencia de las otras isoformas es una enzima que se encuentra soluble en el citoplasma y es inducible su expresión mediante inductores como citoquinas, comúnmente se sobre expresa en procesos fisiopatológicos como septicemias, diabetes-mellitus, envejecimiento, infartos, lesiones por isquemia-reperfusión e insuficiencia cardiaca(13, 18). El rol cardioprotector de NOS2 puede ser relativo, puesto que puede ocasionar efectos beneficiosos solo cuando el nivel de especies reactivas del oxígeno (ROS) se encuentran disminuidos, sin embargo en las situaciones de isquemia-reperfusión este efecto puede generar toxicidad por aumento de la síntesis de $ONOO^-$, debido a que su función enzimática es independiente de Ca^{+2} se produce una actividad a larga data que ocasiona la disminución de los niveles de L-arginina desencadenando el desacoplamiento de las isoformas de NOS y la producción excesiva de O_2^- (29). Además, se ha documentado

que la expresión aumentada de NOS2 puede inducir la activación del Nf-kB mediante la inducción de vías dependientes de GMPc, que inhiben el factor inhibidor de Nf-kB, generando su intercalación en el núcleo, promoviendo la expresión de genes involucrados en procesos de hipertrofia, complicando aún más la condición de las patologías cardiovasculares (3, 29).

La NOS3 (endotelial) se identificó por primera vez a nivel del endotelio coronario, pero se ha demostrado que presenta un alto grado de expresión en la mayoría de los tejidos, especialmente en el miocardio-ventricular (29). La NOS3 se encuentra localizada en el microdominio-caveolar, unido a la proteína caveolina-3, de manera que la señalización que produce no regula la contracción basal de los miocitos como NOS1, sino solo la contracción estimulada por receptores beta adrenérgicos (R- A), actuando tanto en la regulación de la homeostasis del Ca^{+2} intracelular y la señalización intracelular mediada por adrenalina, además presenta una estrecha cercanía con la enzima superóxido dismutasa (SOD) que degrada el superóxido (O_2^-) (3). Por lo tanto la función de NOS3 como agente cardioprotector está basado principalmente en limitar la afluencia de Ca^{+2} , mediante la inhibición de los CCTL, que consecuentemente induce atenuación de la hipertrofia cardíaca, pues se inhibe el factor nuclear de calcineurina de la vía de células T activadas (NFAT), además prolonga el potencial de acción ante la estimulación del R- A, debido al aumento del flujo del canal $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ (NXC) evitando los episodios de arritmias generados en patologías cardiovasculares (29).

3.5.2 S-NITROSILACIÓN PROTEICA COMO EFECTORES GENERADORES DE CARDIOPROTECCIÓN.

Para que las modificaciones post-traduccionales de S-nitrosación (SNO) logren cumplir sus efectos cardioprotectores, estos pueden tener como blancos proteínas que pueden estar involucradas tanto en los procesos como la electrofisiología cardíaca y homeostasis intracelular de Ca^{+2} , fosforilación oxidativa a nivel de las mitocondrias, balance oxidoreductor del microambiente intracelular, mecanismos de señalización y transducción de señales y los procesos relacionados con la apoptosis celular (27).

3.5.3 REGULACIÓN DEL CALCIO INTRACELULAR EN EL CARDIOMIOCITO.

Las proteínas implicadas en la regulación del Ca^{2+} intracelular que actúan a nivel del proceso de excitación/contracción cardíaca son el receptor de ryanodina (RyR), canal de Ca^{+2} tipo L (CCTL), la bomba Ca^{+2} /ATPasa denominada SERCA y fosfolamban (PLN)(29).

La S-nitrosilación de RyR promueve la actividad de este canal aumentando el flujo de Ca^{+2} , donde la forma cardíaca de RyR (RyR-2) está siempre S-nitrosilada en condiciones basales, por ende, la abertura de RyR2 implica una disminución de la filtración diastólica de Ca^{+2} , de manera favorece la contracción de miocitos cardíacos (3). Los efectos del NO en cuanto a la actividad de la SERCA Ca^{+2} /ATPasa provocan un aumento de la recaptación del Ca^{2+} citosólico fomentando los periodos de relajación cardiovascular. No obstante la señalización indirecta mediada por la PKA, también puede modular su actividad mediante

la fosforilación de PLN, por medio de mecanismos dependientes de GMPc, evitando que este inhiba la actividad de SERCA (10). Finalmente el CCLT ante procesos de S-nitrosilación y fosforilación mediados por PKG se ve susceptible a la inhibición, previendo así un aumento del Ca^{+2} intracelular con una desensibilización concomitante de los miofilamentos dependientes de NOS1, por lo que la S-nitrosilación de estas proteínas disminuye la contracción cardíaca en situaciones de estrés oxidativo(3, 28).

3.5.4 S-NITROSILACIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN EL BALANCE OXIDO-REDUCCIÓN.

El balance NO-redox consiste en un completo equilibrio en cuanto a las especies reactivas del oxígeno y el NO, puesto que cualquier desequilibrio en cuanto a la cantidad de uno o el otro puede desencadenar en un desacoplamiento de la estructura de las isoformas de NOS y promover la generación de O_2^- y la consecuente formación de ONOO^- implicando un “estrés nitrosativo” que puede ocasionar la pérdida de la función de muchas proteínas de gran implicancia en la función cardiovascular (13, 28). Las proteínas que pueden estar implicadas en los procesos de generación de radicales libres son la aldolasa reductasa, xantina oxido-reductasa (XOR) y NADPH oxidasa. Estas enzimas están implicadas en los incrementos de O_2^- tras un evento de isquemia-reperfusión (I/R), donde aldolasa reductasa actúa disminuyendo los agentes reductores como el NADPH, afectando la funcionalidad de los mecanismos antioxidantes intracelulares, mientras que xantina oxido-reductasa ve incrementada su actividad tras una sobreexpresión de NOS2 (inducible) o elevada translocación de NOS1 desde el retículo sarcoplásmico hacia las caveolas, disminuyendo la actividad inhibitoria que esta ejerce al localizarse en su cercanía junto con la proteína RyR-2 (7). Además, el estrés oxidativo en el interior del miocito se ve exacerbado por la liberación de radicales libres provenientes de la mitocondrias tras un evento de I/R, por lo que la S-nitrosilación de estas proteínas ha demostrado funcionar como interruptor de apagado evitando que aumente el ambiente oxidativo en el

microambiente intracelular, evitando alteraciones oxidativas en proteínas implicadas en la contractibilidad cardiaca.(29, 30).

3.6 PROPUESTAS TERAPÉUTICAS ASOCIADAS A LA SNO-PROTEICAS EN ENFERMEDADES CARDIACAS.

En la actualidad se ha dado mucha importancia a la disminución biodisponibilidad del NO y al aumento del estrés oxidativo que tiene como consecuencia disfunciones en la fisiología cardiaca, ocasionando problemas como arritmias, hipertrofia y remodelación a tejido fibrótico, por lo que los estudios se enfocan principalmente en reparar la señalización mediada por NO en las diversas formas de enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, no se ha tenido mucho éxito, por lo que hasta el día de hoy los tratamientos que más se ponen a prueba son: la inhibición de NOS2 con la finalidad de disminuir los niveles de ONOO⁻ durante el estrés oxidativo, administración de derivados de nitrógenos exógenos con la finalidad de tratar las sintomatologías de la angina de pecho y la insuficiencia cardiaca congestiva, uso de fármacos suplementarios que incrementen las concentraciones de BH₄, entre otros(3, 28, 29).

De todos las posibles terapias ya antes mencionadas, todas presentaron una efectividad poco significativa o duradera en el tiempo, debido a este hecho es que se está intentando modular la vías de señalización mediadas por NO mediante inductores que no derivan de especies del nitrógeno, sino que suelen fomentar el aumento del GMPc, como el cinacigat, que activa la guanilato ciclasa soluble y los inhibidores específicos de la fosfodiesterasa-5 como udenafil, vardenafil y sildenafil, puesto que como se mencionó anteriormente las vías de transducción/señalización del NO son bastante complejas para modularla mediante intervención farmacológica (29). Por lo tanto, un enfoque prometedor en el uso de la ruta

de NOS para tratar pacientes con insuficiencia cardíaca es manipular los componentes que se encuentran aguas abajo de la cascada de señalización (específicamente inhibiendo la fosfodiesterasa-5 para aumentar los niveles de GMPc).

3.7 S-NITROSILACIÓN DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES.

La S-nitrosilación de las proteínas mitocondriales ha sido un tema de debate que trata de indagar como se lleva a cabo esta modificación post-traducciona, pues se sabe que no existe una fuente endógena de NO a este nivel. Sin embargo, muchos informes relatan que es la enzima NOS1 quien desempeña un rol fundamental en los procesos de modulación del metabolismo mitocondrial, principalmente a nivel de la cadena transportadora de electrones, compitiendo por el consumo de O₂ en la síntesis de NO, evitando la generación de radicales libres en situaciones de isquemia y así evitar el estrés oxidativo (3). Por lo tanto, se especula que NOS1 se transloca en la mitocondria permitiendo actuar en las cercanías de la membrana mitocondrial interna, inhibiendo las proteínas que participan activamente en la fosforilación oxidativa como citocromo C oxidasa (Complejo IV), NADH-deshidrogenasa (Complejo I)(31) y el complejo III(30).

Recientemente se ha descrito que el proceso de S-nitrosilación puede ocurrir mediante procesos de trans-S-nitrosilación, mediados por la gliceraldeído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH), que además de actuar en la vía de la glicólisis tiene la particularidad de internalizarse tanto en el núcleo como en las mitocondrias para realizar procesos de trans-S-nitrosilación (figura N°8). Los principales blancos para este proceso son el canal aniónico dependiente de voltaje 1 (VCDA-1), la proteína de shock térmico 60 (Hsp60) y la acetil-CoA acetiltransferasa. Además otra proteína fundamental en los procesos de síntesis de ATP es el complejo V o complejo ATP-sintasa, específicamente entre las subunidades F₀-F₁(32), se ha demostrado que puede presentar modificaciones de S-nitrosilación durante

eventos isquémicos, evitando la depleción de ATP (factor inductor de apoptosis) y servir como efecto cardioprotector(33).

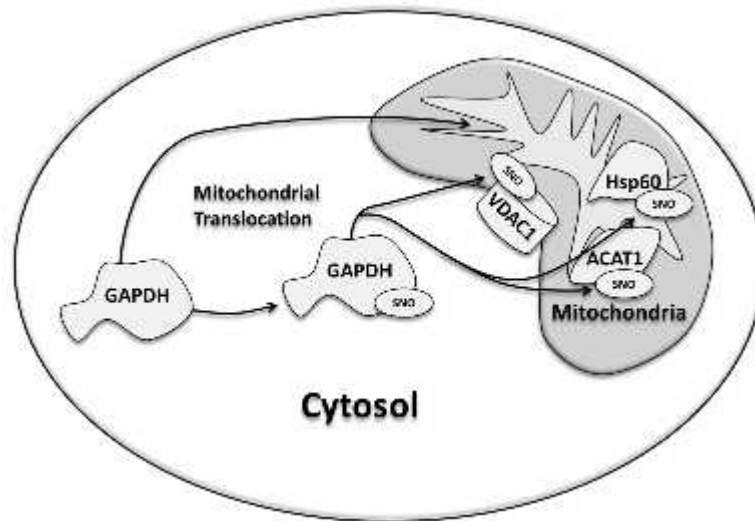


FIGURA N° 8. GAPDH ACTÚA COMO UNA TRANS-S-NITROSILASA MITOCONDRIAL. GAPDH y SNO-GAPDH se pueden importar a las mitocondrias, donde SNO-GAPDH se dirige a Hsp60, ACAT-1 y VDCA-1 como una trans-*S*-nitrosilasa mitocondrial.(33)

3.7.1 TRANSICIÓN DE PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL.

La transición de permeabilidad mitocondrial se considera un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna (MMI), que en situaciones normales presenta una baja permeabilidad, de manera que en situaciones patológicas o anormales esta se vuelve permeable a moléculas con tamaño de 15 kD o menor, debido a la apertura de un sistema no selectivo. La apertura del poro de transición mitocondrial (PTP) ocurre tras la reperfusión del corazón en isquemia o en condiciones como el incremento de fosfato, agotamiento de nucleótidos de adenina, excesiva concentración de Ca^{+2} y/o la oxidación de grupos tiol de cisteína de las proteínas asociadas a este poro. De esta manera la apertura del poro ocasiona efectos como despolarización de la membrana mitocondrial junto con el cese de la síntesis de ATP por inversión de la ATPasa que genera la degradación del ATP citosólico generado en la glicolisis, liberación de Ca^{+2} , liberación de mediadores de la apoptosis como citocromo c y ROS que terminan conduciendo a la muerte celular por apoptosis culminando en necrosis del miocardio (34, 35).

Dentro de los agentes que modulan de forma indirecta la apertura del poro se encuentra la S-nitrosilación de proteínas que intervienen a través de la homeostasis de Ca^{+2} sarcoplasmico/endoplásmico, modificando la actividad de las proteínas claves como SERCA, canales de Ca^{+2} tipo L y RyR2, además de la inhibición del modo inverso de la ATPasa F1, impidiendo la ruptura del ATP, manteniendo estables sus concentraciones. Otro blanco terapéutico diferente de la S-nitrosilación proteica es el empleo de ciclosporina A, sustancia que genera una mayor insensibilidad de los poros de transición mitocondrial (PTM) evitando los efectos ya descritos, siendo el más perjudicial la inducción de la apoptosis(36, 37).

3.8 DETECCIÓN DE PROTEÍNAS S-NITROSILADAS

El enlace nitroso-tiol involucrado en la S-nitrosilación es particularmente lábil a las condiciones ambientales como a agentes reductores, exposición a elevadas temperaturas, fotosensibilidad y al ultrasonido, por lo que es de suma importancia el lograr procesar las muestras con todas las medidas de rigurosidad para lograr su efectiva identificación. Sin embargo, es esta labilidad la que nos permite emplear diversas técnicas de identificación basada en distintos fundamentos químicos (figura N°9). Actualmente existen cinco métodos que son muy utilizados para la detección de S-nitrosilación proteica: quimioluminiscencia, colorimetría/fluorimetría, electroquímica/amperométrica, anticuerpos anti-S-nitrosocisteína y espectrometría de masa, teniendo para cada uno sus respectivas limitancias (38, 39).

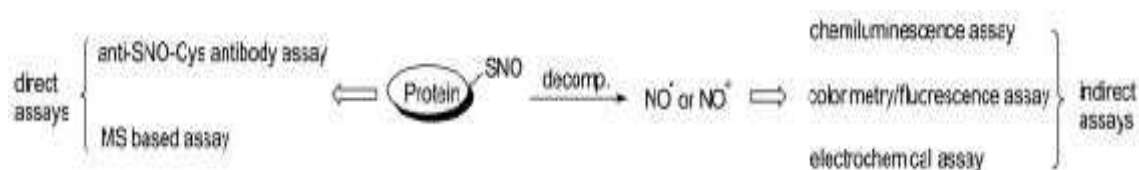


FIGURA N°9. MÉTODOS COMUNES DE DETECCIÓN DE SNO(38)

Los métodos directos de detección como los ensayos inmunológicos que emplean anticuerpos anti-SNO/Cisteína y espectrometría de masas no suelen ser muy útiles para diferenciar entre las proteínas S-nitrosiladas y las no S-nitrosiladas, mientras que en los métodos indirectos de detección suelen presentar interferentes relacionados con otros derivados de nitrógeno como el nitrito (NO_2^-), pues estos se basan en la detección del radical nitrosonio (NO^+), sin embargo estos métodos son muy sensibles pues pueden detectar cantidades del orden nanomolar de enlaces nitroso-tioles, permitiendo obtener la cantidad absoluta de S-nitrosotioles por muestra.

3.8.1 TÉCNICA DEL INTERRUPTOR DE BIOTINA (BIOTIN SWITCH)

El método del “biotin switch” emplea el átomo de azufre del enlace nitroso-tiol como blanco sin tener en cuenta el destino del derivado de nitrógeno de NO del cual se pudiese generar, por lo que se considera una estrategia basada en el azufre del grupo tiol. Como emplea el marcaje covalente de la proteínas, se puede detectar además S-nitrosotioles individuales en una mezcla compleja, ya que este marcaje se adosa a una proteína de interés (39).

Esta técnica consta de tres pasos principales: (1) el bloqueo de tioles de cisteínas libres por metil-tiolación con S-metiltiosulfonato de metano (MMTS, un tiosulfonato reactivo), (2) la conversión de los S-nitrosotioles a tioles mediante la trans-nitrosación con ascorbato y (3) la S-biotinilación de los tioles nacientes mediante biotina HPDP (N-[6-(biotinamido) hexyl]-3´-(2´-pyridyldithio-propionamide), un disulfuro mixto reactivo. El grado de biotinilación (y por lo tanto de S-nitrosilación) se determina por inmunoblot, con anticuerpos anti-biotina seguido de inmunotransferencia de la(s) proteína(s) de interés (figura N°10)(39). La etapa de bloqueo se inicia mediante la adición de dodecil sulfato de sodio y MMTS, seguido de calentamiento a 50°C y separación del exceso de proteínas con MMTS por precipitación con acetona. La combinación de calor y SDS funciona para tioles proteicos. El bloqueo efectivo de los tioles es requerido para maximizar la sensibilidad del ensayo. El segundo paso convierte los S-nitrosotioles en tioles libres para que puedan ser biotinilados. Esto se consigue permitiendo que el ascorbato experimente una trans-nitrosación con la proteína S-NO, en donde se produce la transferencia del grupo nitroso, por el cual, el S-nitrosotiol es convertido a un tiol libre y el ascorbato se transforma en O-nitrosoascorbato. La especificidad de la técnica de “biotin switch” para la detección de proteínas-S-NO se basa en la capacidad del ascorbato para genera un tiol a partir de un S-nitrosotiol, pero no a partir de tioles alternativamente S-oxidados. La tercera etapa de la técnica implica la biotinilación del tiol naciente (es decir, el S-NO anterior). El exceso de

biotina HPDP se elimina con precipitación con acetona. El nivel de biotilación es evaluado por diversas rutas. De allí que esta técnica sea utilizada, pues es compatible con diversas técnicas de detección proteica. La streptoavidina-agarosa es frecuentemente utilizada, así como la espectrometría de masas o el Western-blot(38, 39).

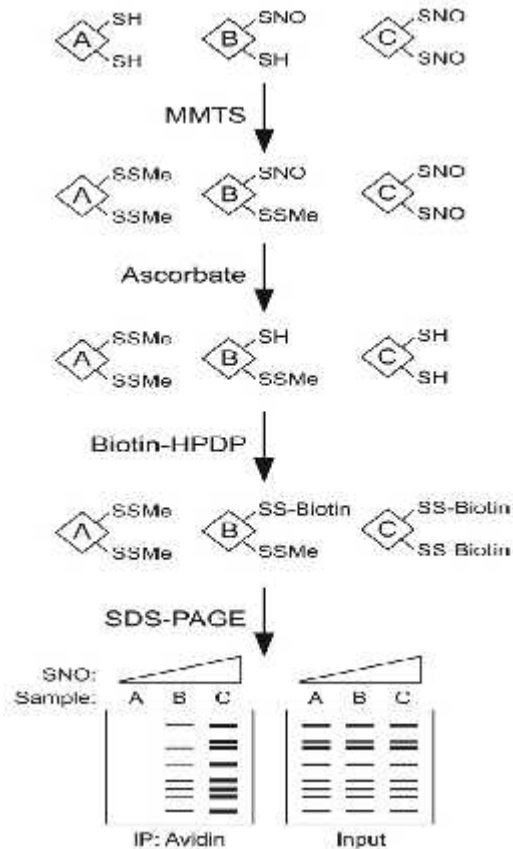


FIGURA N°10. DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA DE “BIOTIN-SWITCH”. El paso de "bloqueo" implica S- metililación de cada cisteína tiol con S- metilmetano-tiosulfonato (MMTS). A continuación, se utiliza ascorbato para convertir cada SNO en un tiol libre a través de una reacción de trans-nitrosación para generar O-nitrosoascorbato. En el paso de "etiquetado", cada tiol libre naciente (previamente un sitio S-NO) se biotinila con biotina-HPDP. Las proteínas biotiladas se enriquecen por medio de afinidad a avidina y se

analizan mediante SDS-PAGE / inmunoblot. Los S-NO de proteínas totales o una proteína-S-NO individual se pueden detectar con avidina-HRP o con un anticuerpo contra una proteína de interés, respectivamente. Como se ilustra, el grado de “pull-down” se correlaciona con la proteína S- nitrosilación. Antes de la extracción de avidina, se analiza una pequeña fracción de cada muestra para determinar la "entrada" de proteína (39).

3.8.2 LIMITACIONES DE LA TÉCNICA.

Aunque el ensayo de “Biotin-swicht” ha sido utilizado en diversos sistemas, aun presenta tres grandes inconvenientes: en primer lugar, la eficiencia/eficacia de la técnica depende del bloqueo del 100% de los tioles de la muestra. Sin embargo, debido a la baja concentración de S-NO en sistemas biológicos reales, esta condición no siempre se alcanza. En segundo lugar, la especificidad del método ha sido cuestionada debido a que la reducción de S-NO por ascorbato parece muy dependiente de sustrato. Algunos autores postulan que el ascorbato no siempre reduce de forma eficiente todos los enlaces nitrosotioles, o bien en ocasiones no solo reduce estos, sino también enlaces disulfuros. Un tercer inconveniente del ensayo sería el potencial de modificar disulfuros después de la reducción de las cisteínas S-nitrosiladas, pudiendo generar una identificación incorrecta de las cisteínas S-nitrosiladas. La técnica ideal de detección de S-nitrosotioles debe ser selectiva para estos enlaces, no deben verse afectados los derivados de tiol oxidados tales como disulfuros o ácidos sulfinicos. Además, la reacción debe proceder rápidamente bajo condiciones estandarizadas como también dicho producto de reacción debe ser estable para poder ser analizado(38, 39).

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 HIPÓTESIS

La inhibición farmacológica de GSNOR induce S-nitrosilación de proteínas mitocondriales

4.2 OBJETIVO GENERAL

Evidenciar la S-nitrosilación de proteínas mitocondriales en tejido cardiaco sometido a inhibición farmacológica de GSNOR versus tejido cardiaco en condición basal.

4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar ensayo de “Biotin-swicht” para identificar proteínas S-nitrosiladas.
- Evaluar la actividad enzimática de GSNOR en tejido sometido a inhibición farmacológica versus basal.
- Ejecutar una separación de proteínas separadas con Streptavidina-agarosa.
- Identificar la S-nitrosilación de proteínas mitocondriales en homogenizado cardiaco de ratas mediante Western-blot.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MUESTRAS DE TEJIDO CARDIACO DE RATAS.

Se obtuvo muestra de tejido cardiaco de rata de 7 machos adultos de la cepa Sprague-Dawley de aproximadamente 6 meses de edad, los cuales fueron obtenidos desde el bioterio de la universidad de Talca, dirección de investigación-universidad de Talca, siguiendo las normas de bioética de experimentación animal(40). Estas ratas se sometieron a un proceso de eutanasia y extracción de corazón. Luego, dicho órgano se sometió a un proceso de retro-perfusión, donde un grupo de 4 corazones se trataron con un fármaco inhibidor de la actividad de GSNOR (C2) a una concentración de 1 μ M (grupo tratado) y 3 corazones a una solución de buffer Krebs (grupo control). Cada corazón mostró igualdad de condiciones en cuanto a parámetros cardiovasculares, posterior a ello se congelaron a una temperatura de - 80°C para ser procesados y estudiados en futuros ensayos. Este proceso se realizó durante el periodo del primer semestre del año 2017.

5.2 OBTENCIÓN DE HOMOGENIZADO DE CORAZON DE RATA.

Los tejidos cardiacos de rata se sometieron a descongelamiento en hielo, para luego ser homogenizados con un Ultraturax en una solución de buffer HEPES 0,1M; pH: 7,4 y EDTA 1 mM. Posteriormente la muestra se centrifuga a 16.000 rpm durante 15 minutos

para obtener un sobrenadante de proteínas que luego se congela a una temperatura de -80°C, para futuros análisis.

5.3 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.

Se emplea el sobrenadante del homogenizado de tejido cardiaco previamente descongelado y mantenido en hielo. La cuantificación de proteínas se realizó mediante el kit comercial de ensayo de proteínas BCATM *Thermo Scientific Pierce*TM (Rockford, USA). Este método se fundamenta en la reducción del cobre de su estado cúprico (Cu⁺²) a cuproso (Cu⁺¹) en un medio alcalino (reacción de Biuret) con la detección del catión cuproso con el ácido bicinconínico (BCA). El producto de la reacción tiene un color púrpura formado por el complejo de BCA con ión Cu⁺¹, que absorbe la luz a una longitud de onda de 562 nm, cuya intensidad depende de la temperatura, tiempo y pH del medio en el cual se encuentra (41).

Se preparó una curva de calibración que abarca una concentración que va desde 25-2000 µg/mL de albúmina de suero de bovino en solución de buffer HEPES 0,1 M pH:7,4 con EDTA 1 mM.. Previo a su lectura, se realizó una incubación de 30 minutos a 37°C con posterior agitación (5 segundos), para luego ser leídas en un espectrofotómetro de microplacas *Thermo Scientific*TM *Multiskan* a una longitud de onda de 562nm. Todo ello siguiendo el protocolo de lectura de microplacas que utiliza 10 µL de muestra y 200 µL de reactivo de trabajo, preparado en una razón de 50:1 con los reactivos incorporados A y B respectivamente. Cada reacción se realizó a una temperatura de 37°C y por triplicado.

5.4 CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GSNOR.

A un volumen determinado de homogenizado de tejido cardiaco con una concentración de proteínas de 100 µg/mL se adicionó un volumen de 200 µL de solución que contenía Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), EDTA 0,5 mM y NADH 200 µM. Para detectar la actividad enzimática de GSNOR, se inició la reacción con 400 µM de GSNO en tampón de reacción (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, EDTA 0,5 mM) con NADH 200 µM, incubando a 25°C por 10 minutos. Se adicioneo también un control positivo empleando un homogenizado de hígado, evaluando su actividad bajo las mismas condiciones. Así también se evaluó la actividad enzimática de GSNOR en distintos medios de reacción, uno sin NADH y otro sin GSNO, con la finalidad de lograr eliminar la actividad de enzimas interferentes que empleen el NADH. La medición de la actividad enzimática se midió por el consumo de NADH dependiente de GSNO, monitoreando la disminución de la absorbancia a 340 nm de longitud de onda (figura N°11)(42).

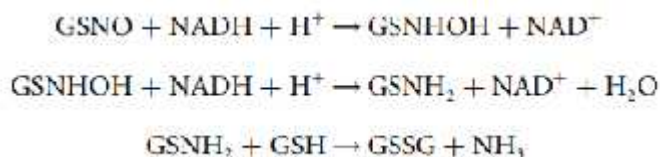


FIGURA N°11. REACCIÓN CATALIZADA POR LA ENZIMA GSNOR EN LA METABOLIZACIÓN DEL GSNO DEPENDIENTE DE NADH.

5.5 S-NITROSILACIÓN DE PROTEÍNAS.

Se realizó este ensayo empleando el protocolo sugerido por el kit de detección de proteínas S-nitrosiladas “*Biotin Switch*” (Cayman Chemical®). Previamente se descongelaron los homogenizados de tejido cardiaco almacenados a -80°C y se prepararon los reactivos empleados en el ensayo bajo las condiciones/especificaciones sugeridas por el fabricante. El ensayo comenzó al realizar la fase de bloqueo (figura N°12) mediante la adición de $300\ \mu\text{L}$ de un reactivo de bloqueo o buffer-A a un volumen de muestra de $200\ \mu\text{L}$, que contenía aproximadamente una concentración de $1,5\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteínas. Luego cada muestra fue sometida a una agitación suave por 30 minutos a 4°C , transcurrido este se separaron $250\ \mu\text{L}$ a un tubo Eppendorf para obtener los controles negativos de cada muestra sometida a biotilización. Se adicionó una cantidad de acetona fría en una relación 1:4 teniendo como volumen final 1mL , posteriormente se agitaron por inversión y se incubaron a -20°C durante una hora aproximadamente. Finalmente, transcurrida la hora cada muestra es sometida a un proceso de centrifugación a $16000\ \text{rpm}$ durante 10 minutos a 4°C .

Terminada la fase de bloqueo se procedió a retirar cada tubo Eppendorf para eliminar su sobrenadante obteniéndose un pellet. Luego se comenzó con la fase de reducción y etiquetado del ensayo (figura 12) “biotin-switch”. Se re-suspendió cada pellet de proteínas en $500\ \mu\text{L}$ de un reactivo reductor de marcaje o buffer B (ascorbato/biotina). Adicionalmente los controles negativos de cada muestra solo fueron re-suspendidos en una solución que no contenía ascorbato, evidenciando cualquier biotilización endógena. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente (25°C) durante una hora en oscuridad, transcurrido dicho tiempo se adicionó un volumen de $500\ \mu\text{L}$ de acetona fría, mezclando por inversión para luego ser incubadas a -20°C durante 1 hora. Finalmente se retiran para ser sometidos a una centrifugación a $16.000\ \text{rpm}$ durante un tiempo de 10 minutos a 4°C .

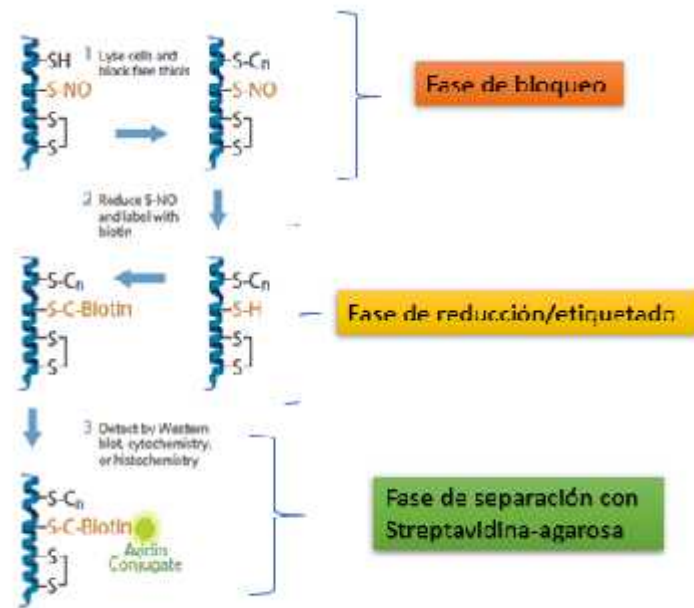


FIGURA N°12. DIAGRAMA DEL PROCESO DE BIOTIN-SWITCH Y SEPARACIÓN CON STREPTOAVIDINA AGAROSA. Los tioles libres de proteínas se unen con un agente bloqueante. Los S-nitrosotioles se reducen para producir tioles libres que se marcan covalentemente con maleimida-biotina. La detección de estas proteínas puede ser mediante anticuerpos anti-biotina posterior a su separación con estreptoavidina agarosa .(43)

Finalmente, terminada dicha centrifugación se procede a eliminar el sobrenadante, observándose la presencia de un pellet de proteínas, que luego serán re-suspendidas en un buffer de lavado a un volumen que puede ser de 100-200 μ L, para posteriormente ser almacenados a -20°C .

5.6 SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS BIOTINILADAS CON RESINA.

La estreptavidina-agarosa es una resina de agarosa granulada y con capacidad estándar procedente de una proteína recombinante inmovilizada que se puede emplear en diversos métodos de purificación por afinidad a la biotina, esta se caracteriza por estar compuesta por la estreptavidina, una proteína tetramérica con cuatro sitios de unión de biotina por molécula (44, 45). Se emplea estreptavidin-agarosa 50% v/v (Novagen®) almacenada previamente a 4°C, con la finalidad de lograr la separación de proteínas biotiniladas sometidas al método de biotin-switch.

En primera instancia se depositó en un tubo Eppendorf un volumen determinado de cada muestra de homogenizado de corazón sometido al proceso de “biotin-switch” conteniendo por lo menos 300 µg de proteínas en un volumen de 200 µl del vial respectivamente de resina (que equivale a 100 µL de estreptavidina-agarosa), posteriormente se procedió a realizar una incubación a temperatura ambiente por una hora, donde terminado tal se procedió a centrifugar a 1000 rpm por 10 minutos a 4°C descartando el sobrenadante. Finalmente se preparó una solución de buffer de fosfato salino (pH: 7,2 0,1M PO_4^{-2} + 0,15M NaCl) y se adicionaron 500 µL al sedimento, mezclando suavemente con un vórtex, para proceder a realizar nuevamente un centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos a 4°C descartando nuevamente el sobrenadante (se realizó este proceso por lo menos unas tres veces).

Terminada la fase de unión, se inició la fase de elución adicionando 100 µL de buffer Lamli 2X Sigma-Aldrich(4% de SDS, 20% de glicerol, 10% de 2-mercaptoetanol, 0,004% de azul de bromofenol y 0,125 M de Tris HCl, pH: 6.8) a cada muestra, donde posteriormente fueron expuesta a 100°C durante 5 minutos, finalmente se centrifugó cada

muestra a 1000 rpm a 4°C durante 10 minutos (dos veces), transfiriendo el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf, donde luego fueron almacenadas a -20°C para ser sometidas finalmente a Western-blot.

5.7 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS.

Se prepararon geles de poliacrilamida de 1 mm de espesor, para ello se preparó aproximadamente 5 mL de mezcla para gel separador al 10% (Tabla N°2), que se agregó en el soporte de gelificación entre dos placas de vidrio, tras lo cual se añadió isopropanol para evitar la formación de burbujas y se gelificara de forma recta. Una vez solidificado, se eliminó el isopropanol por inversión, y se lavó con agua ultra-pura la superficie, asegurándose que no queden restos del alcohol. Finalmente se añadió sobre el primer gel 1,5 mL aproximadamente de la mezcla de gel concentrador al 4% (tabla 2), y se posiciona el peine con el cual se formarán aproximadamente 10 pocillos.

TABLA N°2. PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA.

| Reactivos | Gel separador | | | Gel concentrador |
|--|----------------------|---------|------------|-------------------------|
| Concentración | 7,5% | 10% | 12% | 4% |
| Acrilamida-bisacrilamida (30%-0,8%) | 3 mL | 4 mL | 4,8 mL | 0,7 mL |
| Agua desionizada | 5,76 mL | 4,76 mL | 3,96 mL | 3 mL |
| Tris-base pH 8,8 1,5 M | 3 mL | 3 mL | 3 mL | 0 mL |
| Tris-base pH 6,8 0,5 M | 0 mL | 0 mL | 0 mL | 1,25 mL |
| SDS (dodecil sulfato de sodio) 10% | 144 µL | 144 µL | 144 µL | 50 µL |
| Persulfato de amonio al 10% | 84 µL | 84 µL | 84 µL | 35 µL |
| TEMED | 12 µL | 12 µL | 12 µL | 10 µL |

Los homogenizados se mezclaron con buffer de carga en una proporción 4:1 respectivamente y se hirvieron durante 5 minutos, luego se dejaron reposar durante 5 minutos en hielo. Continuando con el ensayo, se depositó en cada pocillo un volumen de 30 µL de muestra, de manera que la concentración de proteínas depositada fuera de al menos 30-35 µg de proteínas por pocillo. Para la corrida electroforética se utilizó el marcador de peso molecular Prism Ultra Protein Ladder (3.5 - 245 kDa), (Rockford, USA.) mezcla de nueve proteínas que van de 3,5 - 245 KDa (figura N°13).



Figura N°13. Esquema de separación del marcador de peso molecular SDS-PAGE - Prism Ultra Protein Ladder (3.5 - 245 kDa) (ab116029).

Se montaron los geles en el sistema de electroforesis BioRAD, mini PROTEAN hércules, CA, USA. Añadiendo aproximadamente 600 mL de buffer de corrida pH: 8,3, conteniendo Tris-base 25 mM, SDS 0,1%, y glicina 192 mM. Se cargaron 30 μ L de cada muestra ya sea del grupo control u grupo tratado con el inhibidor de GSNOR, programando la fuente de poder a 100 volt durante 2 horas y 10 minutos.

5.8 TINCIÓN DE PROTEÍNAS CON AZUL DE COOMASIE.

Previamente se realizó una corrida electroforética de proteínas según el protocolo ya antes mencionado. Donde en cada ensayo se emplearon dos geles, uno con el contenido de todas las muestras sometidas a biotinización y otro con dos pares de homogenizados de cada grupo, sea homogenizado control y homogenizado tratado con inhibidor de GSNOR y sus respectivos controles negativos (para evidenciar la biotinización endógena). De manera que se intentó apreciar si la concentración de proteínas depositada era la óptima, previo a realizar el procedimiento de Western-blot, puesto que el protocolo de “Biotin-switch” implica pérdida de proteínas durante su proceso. Realizada la electroforesis se

sumergió el gel a un volumen de 10 mL de solución de tinción (tabla N°3) utilizando un recipiente de plástico hermético. El gel se incubo durante toda la noche a temperatura ambiente y agitación constante(46).

TABLA N°3. COMPOSICIÓN DE SOLUCIÓN DE TINCIÓN

| Reactivo | Cantidad (g) /volumen (mL) |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| Azul brillante de coomasie R-250 | 0,25 g |
| Metanol | 45 mL |
| Ácido acético glacial | 10 mL |
| Agua destilada | 45 mL |

Transcurrido el tiempo de tinción se eliminó la solución de azul de Coomasie, y se procedió a realizar los lavados del gel, ya sea sumergiéndola en una solución de lavado (Tabla N°4), que mantenida una agitación constante se cambiaba esta cada 1 hora de lavado, hasta tal punto de que se observaran bandas de proteínas y el gel se observara transparente.

El fundamento de la tinción de azul de Coomasie se basa en el pigmento aniónico que se une a los residuos de lisina de las proteínas. Se requiere de un medio ácido para la generación de atracción electrostática entre las moléculas del colorante y los grupos amino de las proteínas. La atracción iónica es a través de las fuerzas de Van der Waals, que unen a las proteínas y al colorante formando un complejo coloreado.

TABLA N°4. COMPOSICIÓN DE LA SOLUCIÓN DE LAVADO

| Reactivo | Volumen (mL) |
|-----------------|---------------------|
| Metanol | 100 mL |
| Ácido acético | 75 mL |
| Agua destilada | 325 mL |

5.9 WESTERN-BLOT.

Esta técnica permite la detección de una sola proteína dentro de una muestra biológica. Su especificidad se logra mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo único de la proteína de interés. Para realizarla se aseguró que en cada pocillo previa a la electroforesis se logre depositar una cantidad igual de proteínas, que en este caso era entre un rango de 30-36 μg de proteínas como mínimo del homogenizado de tejido cardiaco, luego se procedió a realizar la electroforesis de proteínas según lo descrito anteriormente, finalizado este, se procedió a realizar el electro-transferencia a una membrana de nitrocelulosa, donde terminada la electroforesis se extrajo el gel del soporte y se depositó dentro de una bandeja llena previamente con buffer de transferencia pH: 8,3 frio (compuesta por Tris-base 25 mM, glicina 192 mM y alcohol metílico al 20%), conteniendo dos esponjas, dos papeles filtros, la membrana de nitrocelulosa y el soporte de plástico armado, por lo que se procede a realizar el armado del sándwich en el orden que se observa (figura N°14). Se introduce el sándwich en el cassette de transferencia (posicionando el costado negro del soporte con el rojo del cassette) finalmente se introdujo en la cubeta, con el buffer de transferencia helado y una cubeta con hielo en su interior para evitar que el sistema se sobrecaliente demasiado durante su realización. Se conectó a la fuente de poder por un periodo de 2 horas a 100 volt a 4°C.

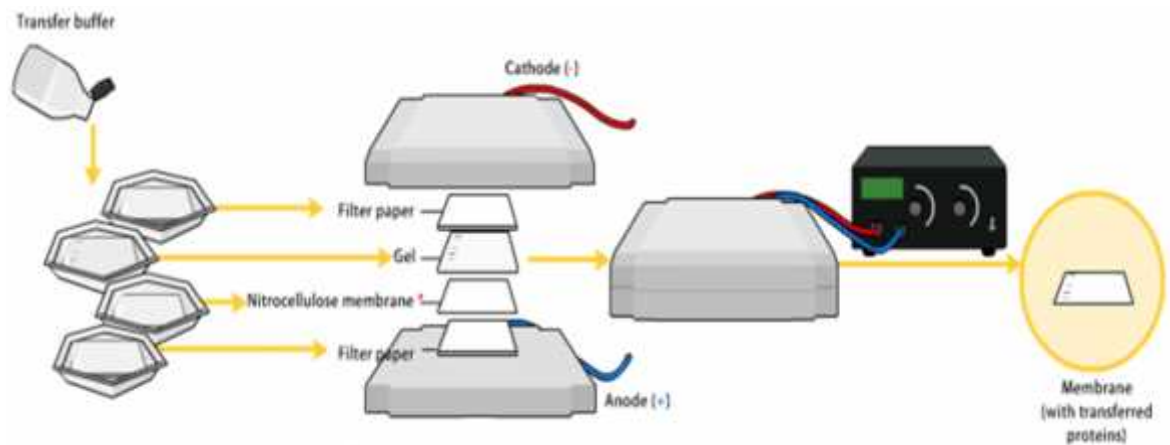


FIGURA N°14. ESQUEMA DE ARMADO DE SÁNDWICH DE TRANSFERENCIA

5.10 BLOQUEO.

Transcurridas las dos horas se desacopla el sándwich extrayendo la membrana de nitrocelulosa, visualizando que el marcado de peso molecular y el buffer de corrida se hayan transferido a este verificando el éxito de la transferencia, luego se deposita la membrana en recipiente de plástico hermético junto con un volumen de 7-10 mL de buffer de TBS-T (Tris-base 0,2 M, NaCl 8% y Tween-80 0,1%) manteniéndose en agitación con la finalidad de lograr remover restos de gel u otras partículas que hayan quedado adheridas al sistema, luego se procede a bloquear la membrana con un volumen similar al anterior de solución de albumina de suero bovino al 2% disuelta en buffer TBS-T, durante un periodo de 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante.

5.11 DETECCIÓN DE PROTEÍNAS S-NITROSILADAS.

Realizado el bloqueo de la membrana de nitrocelulosa con solución de albumina de suero bovino al 2%, se procedió a realizar la solución del anticuerpo específico anti-biotina, HRP-linked, retirándolo de su temperatura de almacenamiento (-20°C) se dejó reposar en hielo unos 20 minutos, luego se preparó una solución de 7-10 mL en una proporción de 1:1000 en albúmina de suero bovino al 2%, para finalmente sumergir la membrana en esta solución con el anticuerpo anti-biotina durante un tiempo de 10 minutos, donde transcurrido este tiempo se procedió a dejarlo reposar a 4°C durante toda la noche.

Para la detección de proteínas mitocondriales se empleó un coctel de anticuerpos de inmunoglobulinas IgG monoespecíficas (Thermofisher scientific®), dirigidos contra las proteínas IM Core-I (complejo III), IM C-Va (complejo V), Ciclofilina D, OM porrin 1+2 (VDCA-1) y matrix Cyt c (citocromo c) (figura N°15), a una concentración 1.1000. se realizó un bloqueo de la membrana de nitrocelulosa con solución de albumina de suero bovino al 5%, luego se realizó una serie de lavados por 1 hora, para luego emplear un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa anti-IgG murino (Thermofisher scientific®) incubándolo por un tiempo de 2-5 horas a temperatura ambiente, para ser sometido a un proceso de lavado de aproximadamente 2-4 horas.

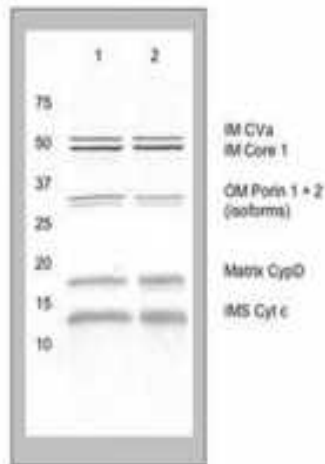


FIGURA N°15: ANALISIS DE WESTERN-BLOT DE MEMBRANA MITOCONDRIAL EN MUESTRAS DE HÍGADO DE RATA USANDO UN COCKTEL DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

5.12 REVELADO.

Previo a este proceso se retiró la membrana y se deja en agitación a temperatura ambiente por lo menos unos 10 minutos, para luego someterlo a lavados con buffer TBS-T en un rango de tiempo de 30-60 minutos, cambiando esta solución cada 15 minutos.

En un cuarto oscuro iluminado con una luz roja tenue, se reveló la membrana de nitrocelulosa utilizando el sustrato quimioluminiscente para peroxidasa de rábano (SuperSignal West Pico Sensitivity Substrate, Thermo Scientific Rockford, USA). Para ello se prepararon soluciones de trabajo de 1 mL mezclando partes iguales de reactivo de peróxido y luminol/enhancer, y se incubó durante dos minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Luego se probó en diluciones de 1:2, 1:4 y 1:8 hasta encontrar la dilución que

permita una óptima quimioluminiscencia al adicionarla sobre la membrana, se deja incubar la membrana por 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y luego al observar luminiscencia se deposita en una cámara u cassette de auto-radiografía (Amersham™ Hypercassette™) (Buckinghamshire, Inglaterra) para luego posicionar sobre ella una película fotosensible (CL-XPosure™ Film Thermo Scientific Pierce protein Research, Rockford, USA) de 13x16 cm, todo ello en completa oscuridad y durante un tiempo de 15-5 minutos según la intensidad de la quimioluminiscencia observada.

Previamente se debió posicionar en tres fuentes de vidrio las soluciones de revelado, fijadora y de agua; de modo que al finalizar la exposición del film este se introdujo inmediatamente en solución reveladora hasta la visualización de bandas, luego durante 10 segundos aproximadamente se expuso a la solución fijadora y se terminó por lavar con abundante agua y proceder a realizar el secado como tal. La composición tanto del reactivo revelador como del fijador se describe en las tablas N°5 y N°6 respectivamente.

TABLA.Nº5 COMPOSICIÓN DEL REACTIVO REVELADOR

| Reactivo | Volumen mL |
|---|-------------------|
| Parte A | |
| Hidroquinona, carbonato de sodio, hidróxido de potasio y ácido dietilenaminopentaacético, sal pentasódica (DTPA 5 Na) y agua. | 125 |
| Parte B | |
| Ácido acético, derivado de pirazolidona y agua | 6,25 |
| Parte C | |
| Glutaraldehido, metano y agua | 4,2 |
| Agua destilada | 365 |

TABLA Nº6. COMPOSICIÓN DEL REACTIVO FIJADOR

| Reactivo | Volumen (mL) |
|---|---------------------|
| Parte A | |
| Tiosulfato de amonio, sulfito de sodio, ácido acético y agua. | 87 |
| Parte B | |
| Ácido acético, sulfato de aluminio, gluconato de sodio y agua | 25 |
| Agua destilada | 388 |

5.13 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS NITROSILADAS.

Los films se digitalizaron y las imágenes fueron sometidas a estudio de cuantificación de píxeles, empleando el programa ImageJ versión 1,52a (Wayne Rasband, National Institutes of Health USA). Los valores se graficaron para comparar los resultados de ambos grupos de muestras experimentales, mediante el software GraphPad Prims versión 6,01.

5.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados obtenidos en todos los experimentos fueron expresados como promedio \pm desviación estándar. Para determinar si existía diferencia significativa entre el grupo control y el grupo experimental se aplicó la prueba de T-student con el software GraphPad Prims versión 6,01, considerando una diferencia significativa con un $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

Se cuantificó la concentración de albumina de suero de bovino utilizando el método de BCA Pierce™, que presenta una linealidad desde 25-2000 µg/mL, leyendo su absorbancia a una longitud de onda de 562 nm. A partir de estas lecturas se obtienen los datos de la tabla N°7, junto con la representación gráfica de la curva de calibración en la figura N°16, que evidencia un coeficiente de correlación de 0,9992.

TABLA N°7. CURVA DE CALIBRACIÓN DE ALBUMINA DE SUERO BOVINO MEDIDO UTILIZANDO EL MÉTODO DE BCA PIERCE™

| Concentración de albumina de suero de bovino [mg/mL] | Absorbancia a 562 nm |
|---|-----------------------------|
| 125 | 0,062 |
| 250 | 0,105 |
| 500 | 0,191 |
| 750 | 0,295 |
| 1000 | 0,382 |
| 1500 | 0,573 |
| 2000 | 0,783 |

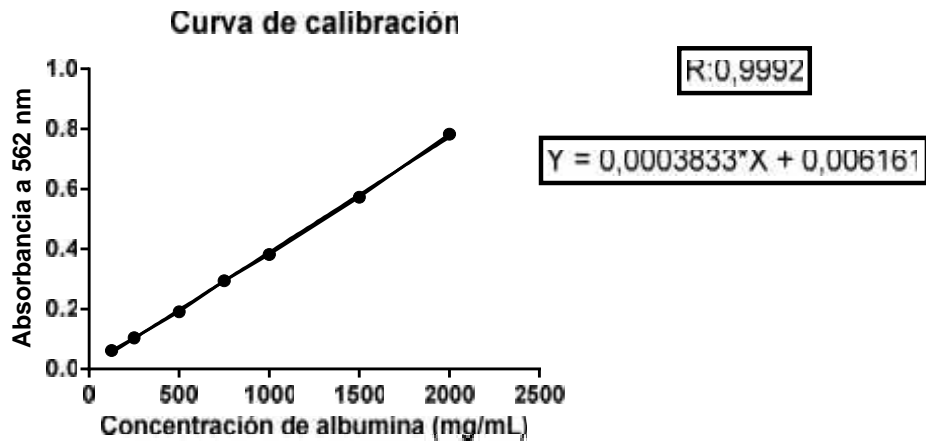


FIGURA N°16. CURVA DE CALIBRACIÓN DE ALBÚMINA DE SUERO BOVINO POR EL MÉTODO DE BCA PIERCE™

6.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN HOMOGENIZADOS CARDIACOS.

Utilizando la ecuación de la curva de calibración se obtuvieron las concentraciones de proteínas para cada muestra, como se observa en la tabla N°8.

TABLA N°8. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN HOMOGENIZADOS DE TEJIDO CARDIACO.

| Homogenizado de corazón de rata | Absorbancia promedio | Concentración de proteínas [µg/µL) |
|--|-----------------------------|---|
| Control 1 (C1) | 1,229 | 3,15 |
| Control 2 (C2) | 0,818 | 2,10 |
| Control 3 (C3) | 0,905 | 2,31 |
| Inhibidor 1 (P1) | 1,330 | 3,41 |
| Inhibidor 2 (P2) | 0,731 | 1,87 |
| Inhibidor 3 (P3) | 2,447 | 6,27 |
| Inhibidor 4 (P4) | 0,977 | 2,50 |

6.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GSNOR.

Se determinó la actividad enzimática de la enzima GSNOR mediante la incubación de los homogenizados de corazón (con inhibidores de GSNOR y en estado basal) e hígado (control positivo) de rata a 25°C por un tiempo de 10 minutos, en condiciones sin NADH, sin GSNO, con NADH y GSNO, donde se leyó la absorbancia a una longitud de onda 340 nm, observando la disminución de NADH en el sistema, por lo que se gráfica la actividad de la enzima durante un transcurso de 10 minutos post-incubación (Figura N°17), describiendo la disminución en el tiempo de la concentración de NADH en el sistema de reacción. Además, se gráfica el diferencial (delta) de absorbancia entre la absorbancia promedio inicial-absorbancia final de todos los homogenizado de corazón con la finalidad de lograr evidenciar el grado de actividad de GSNOR presente en estos. Interpretándose un

mayor delta como una mayor disminución de NADH (Figura N°18). No se observa una diferencia significativa en cuanto a los deltas de absorbancia ($p > 0,05$) tanto en los homogenizados de corazón de rata controles, tratados con inhibidor y el homogenizado de hígado de rata en los sistemas que en cuyos medios solo contienen GSNO (S/SGNO) o solo NADH (S/NADH). Sin embargo, se observa una diferencia significativa ($p < 0,05$) en el delta de absorbancia entre el homogenizado de hígado de rata y el grupo tratado con el inhibidor de GSNOR junto con el grupo no tratado o control, además no se observa una diferencia significativa entre estos dos últimos grupos mencionados con respecto al delta absorbancia.

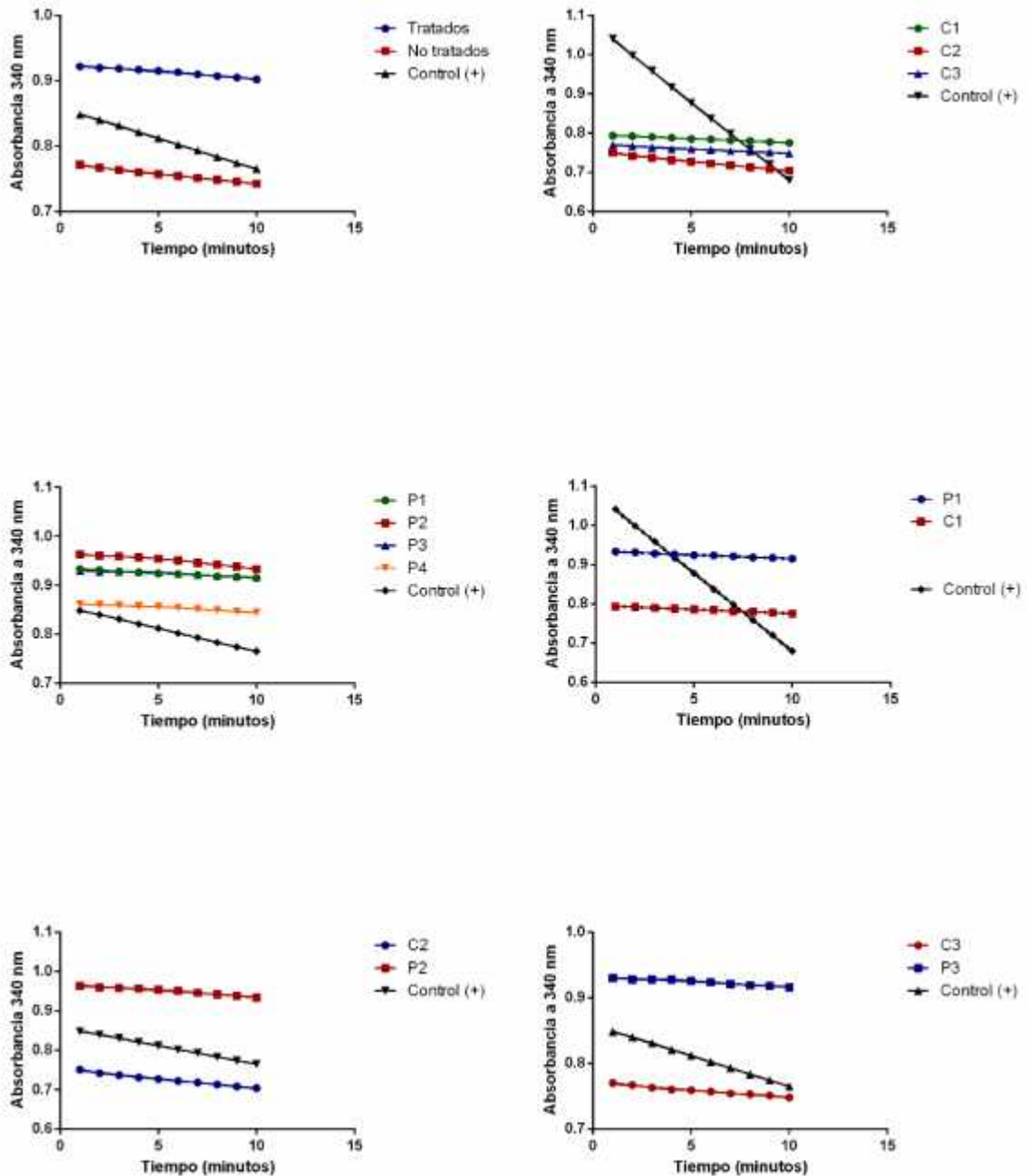


FIGURA N°17. GRÁFICOS QUE MUESTRAN LA DISMINUCIÓN DE LA ABSORBANCIA LEÍDA A 340 NM EN EL TIEMPO EN HOMOGENIZADOS DE CORAZÓN TRATADOS CON INHIBIDOR DE GSNO (P), CONTROLES (C) Y HOMOGENIZADO DE HÍGADO (CONTROL +) EN UN MEDIO CON NADH Y GSNO.

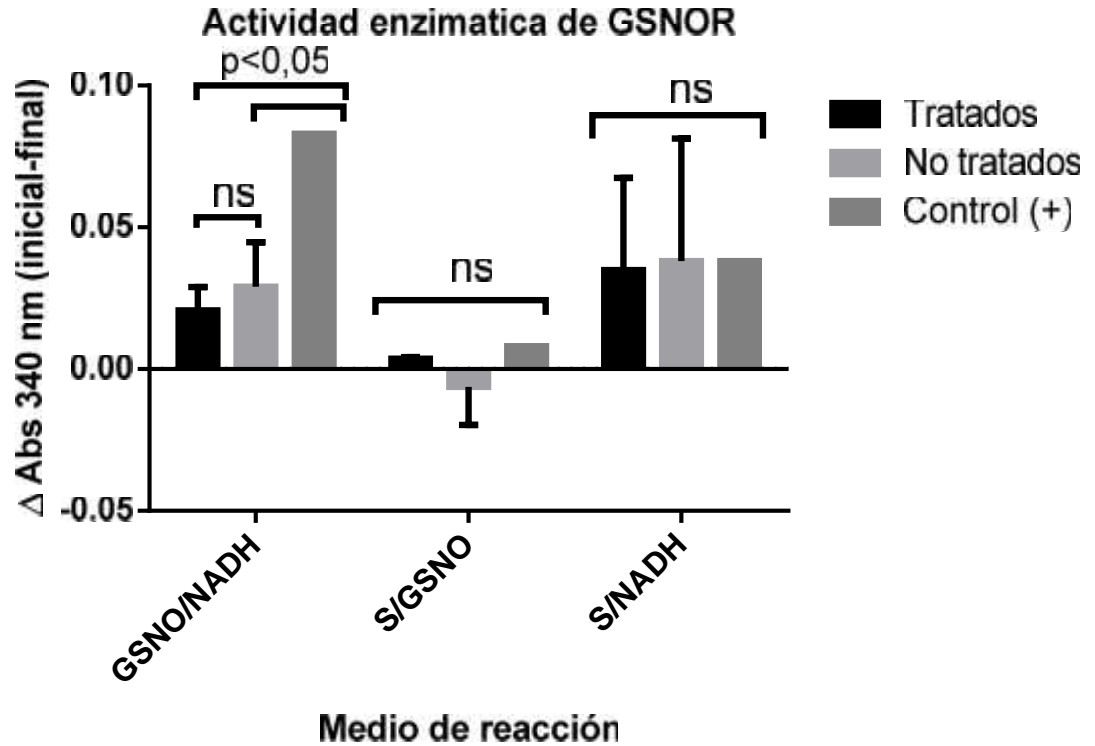


FIGURA N°18. GRÁFICO DEL ABSORBANCIA ($ABS_{INICIAL}-ABS_{FINAL}$), A LOS 0 Y 10 MINUTOS RESPECTIVAMENTE TRANSCURRIDA LA REACCIÓN EN MEDIOS QUE CONTIENEN NADH/GSNO, SOLO GSNO (S/GSNO) Y SOLO NADH (S/NADH).

6.4 TINCIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA CON AZUL DE COOMASIE.

Se sometió cada gel a una tinción de azul de Coomasie R-250 con la finalidad de lograr evaluar si la cantidad de proteínas cargada en cada pocillo es adecuada para la posterior realización de Western blot, además de permitir evaluar de forma cualitativa la presencia de proteínas en cada muestra, puesto que es probable su pérdida durante los procesos de centrifugación y eliminación de sobrenadantes en el transcurso de la biotilación, por lo que en la figura N°19 se observa una homogeneidad con respecto a lo depositado en cada pocillo.

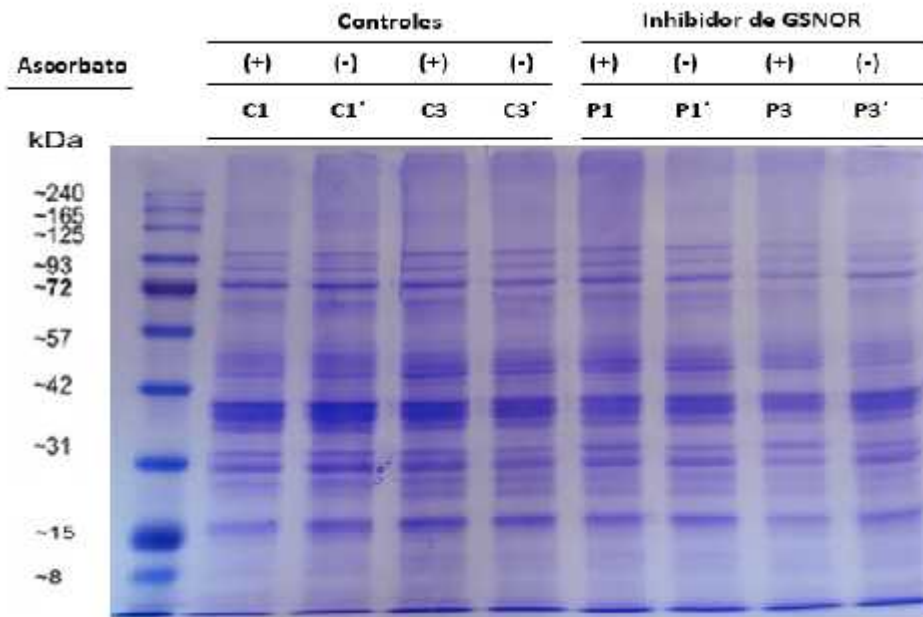
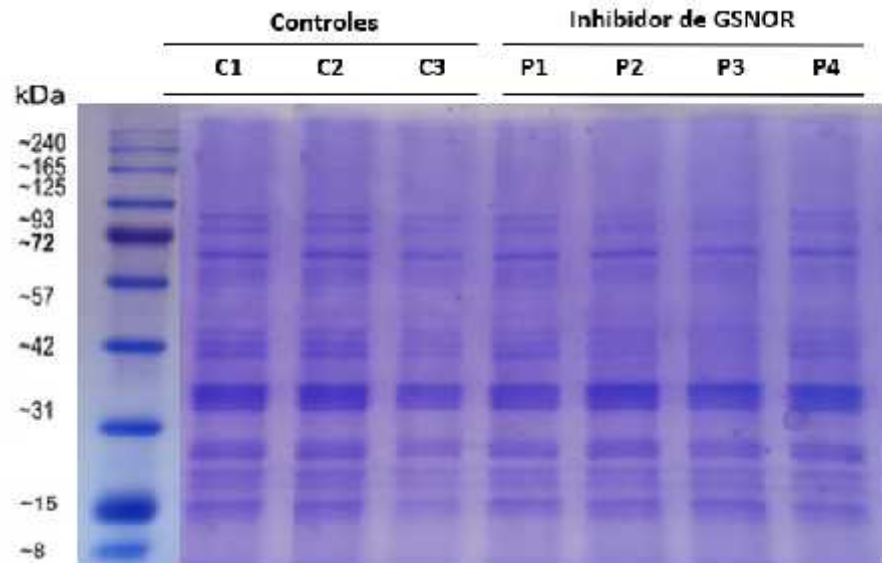


FIGURA N°19. TINCIÓN DE AZUL DE COOMASIE EN GELES DE POLIACRILAMIDA POSTERIOR A LA CORRIDA ELECTROFORÉTICA.

6.5 S-NITROSILACIÓN DE PROTEÍNAS.

Se realizó el método de “Biotin-swicht”, biotinilando las muestras de homogenizado de corazón de rata, con la finalidad de luego ser sometidas a SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida), para luego realizar la detección del S-nitrosilación mediante Western-blot con un anticuerpo anti-biotina conjugado con la enzima peroxidasa (HRP), se cargó un volumen igual o al menos el necesario para poder depositar una concentración igual de proteínas.

Se realiza una comparación del grado de S-nitrosilación entre homogenizados de corazones tratados con un inhibidor de GSNOR y los controles en condiciones basales (Figura N°20), obteniendo una intensidad de pixeles promedio para los homogenizados de rata controles de 17967 ± 1830 y para el grupo tratado con el inhibidor de 22172 ± 2279 observando que existe una diferencia significativa entre los valores promedio de dicha intensidad entre los homogenizados tratados farmacológicamente con respecto a los basales, con un $p < 0,05$ (figura N°21).

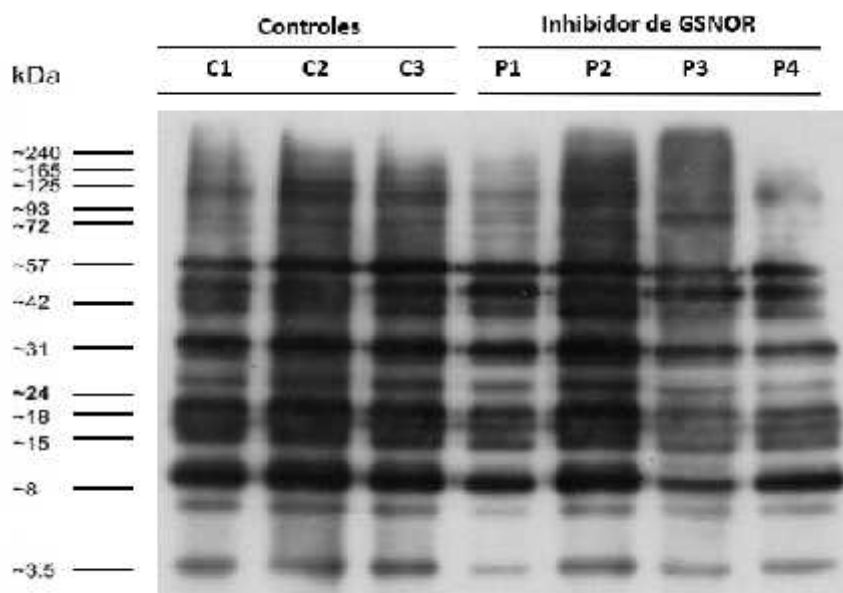


FIGURA N°20. NIVEL DE S-NITROSILACIÓN DE PROTEÍNAS DE HOMOGENIZADO DE CORAZÓN DE RATA SOMETIDOS A TRATAMIENTO INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE GSNOR Y LOS NO TRATADOS.

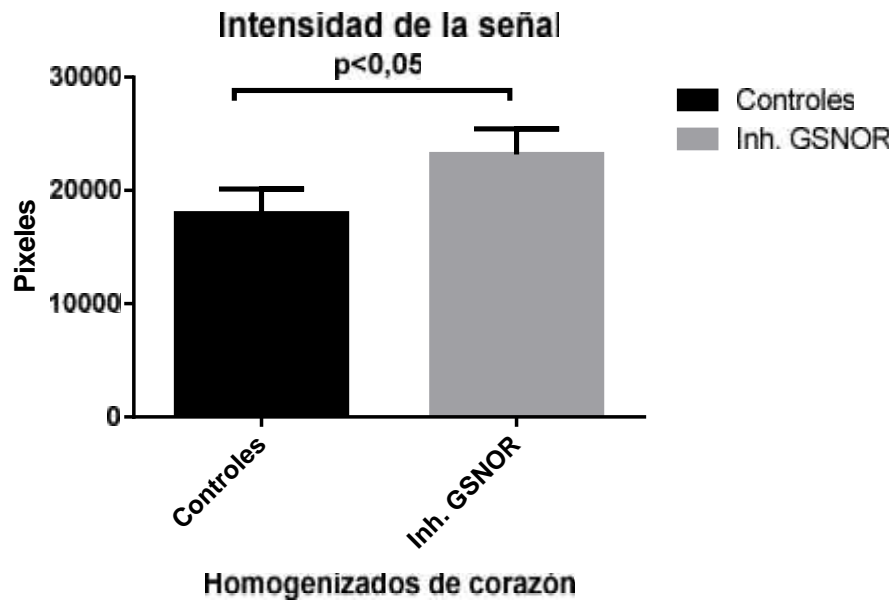


FIGURA N°21. COMPARACIÓN DEL NIVEL DE S-NITROSILACIÓN POR MEDIO DE LA INTENSIDAD DE SEÑAL EXPRESADA EN PÍXELES PARA EL GRUPO CONTROL Y EL GRUPO TRATADO CON EL INHIBIDOR DE GSNOR.

Posteriormente se repitió el método para lograr evidenciar la reproducibilidad de la técnica de ‘‘Biotin-swicht’’, ya sea entre muestras tratadas con ascorbato y homogenizados aleatorios no tratados con ascorbato durante el proceso de biotinización. Posteriormente, cada muestra se procesó de la misma manera con respecto a la corrida electroforética y la realización del Western-blot. Se muestra la intensidad de biotinización solo de las muestras 1 y 3 (figura N°22), donde al evaluar la intensidad de la señal promedio se puede observar que existe una diferencia significativa con un $p < 0,05$, con valores promedios para los homogenizados de corazón sin ascorbato de 14401 ± 2347 píxeles y para homogenizados tratados con ascorbato 20244 ± 3125 píxeles (figura N°23).

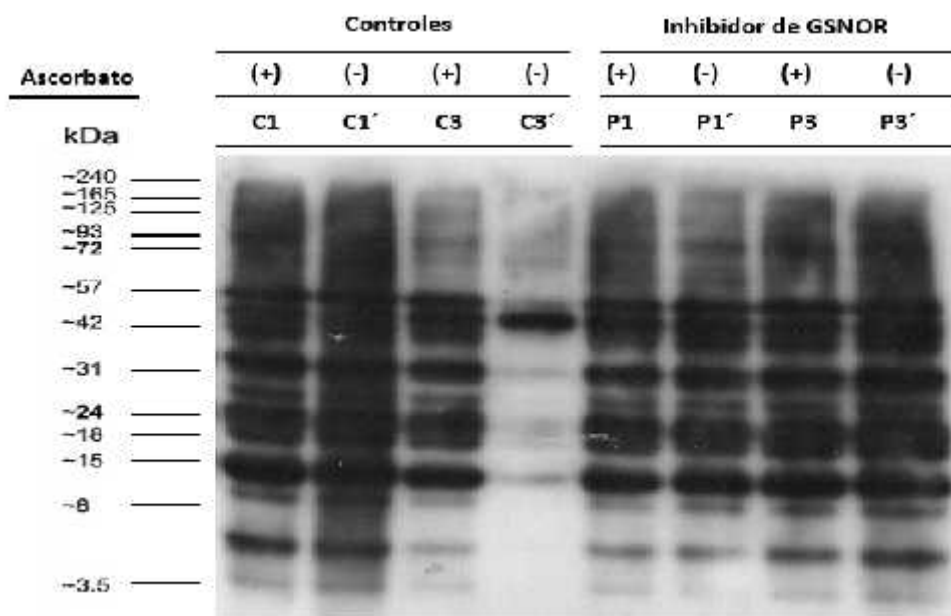


FIGURA N°22. NIVEL DE S-NITROSILACIÓN DE PROTEÍNAS DE HOMOGENIZADO DE CORAZÓN DE RATA EXPUESTOS A ASCORBATO Y NO EXPUESTOS A ASCORBATO DURANTE LA REALIZACIÓN DEL ENSAYO “BIOTIN-SWICHT”.

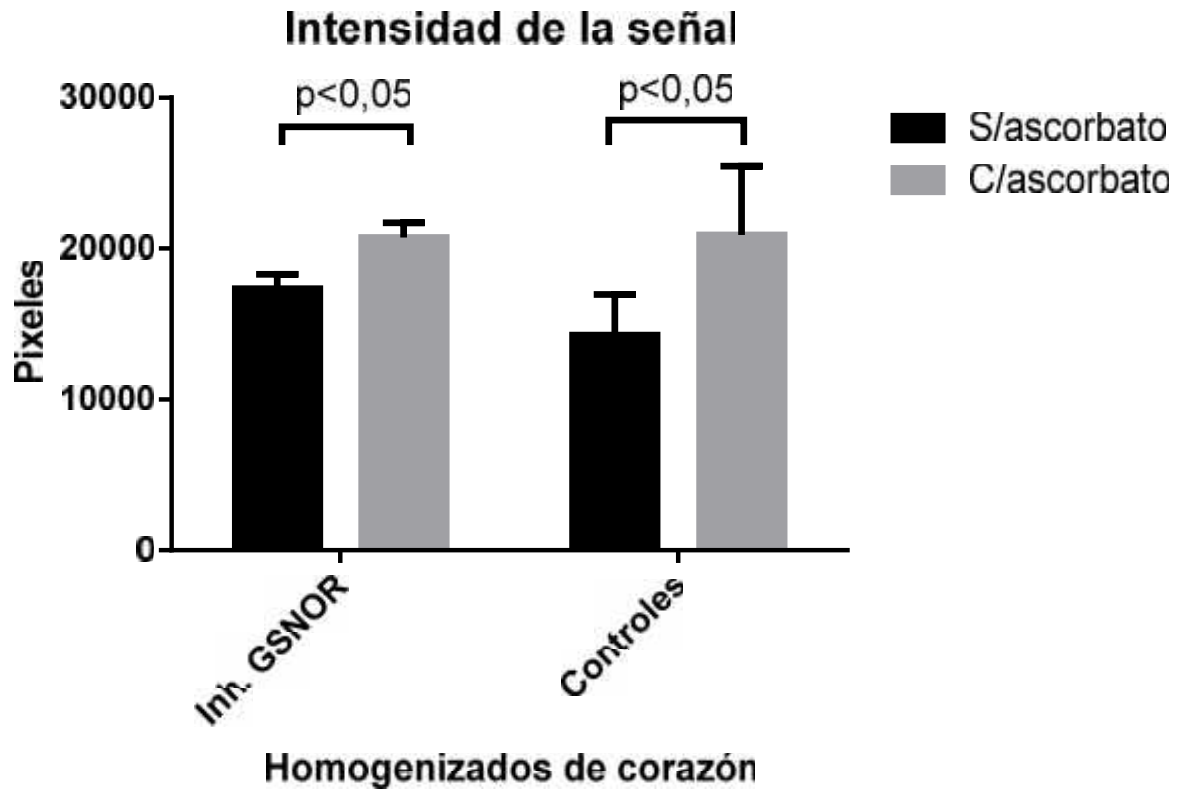


FIGURA N°23. GRÁFICO DE LA INTENSIDAD DE SEÑAL EN MUESTRAS SOMETIDAS A BIOTIN-SWICHT EN PRESENCIA DE ASCORBATO Y SIN ASCORBATO.

6.6 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS S-NITROSILADAS.

Se realizó una separación de proteínas biotiniladas mediante una cromatografía con beads de estreptavidina-agarosa 50% v/v (Novagen®), que luego fueron sometidas a un proceso de Western-blot para evidenciar proteínas mitocondriales mediante el empleo de un coctel de anticuerpos mitocondriales (ThermoFisher Scientific®), evidenciando la S-nitrosilación de proteínas como Cyclofilina D, Complejo III (core-I), VDAC-1 o porina y Complejo Va en las muestras de homogenizado cardiaco de ratas tratadas y no tratadas, junto con una preparación de mitocondrias y sobrenadante de corazón de ratas como control (figura N°24).

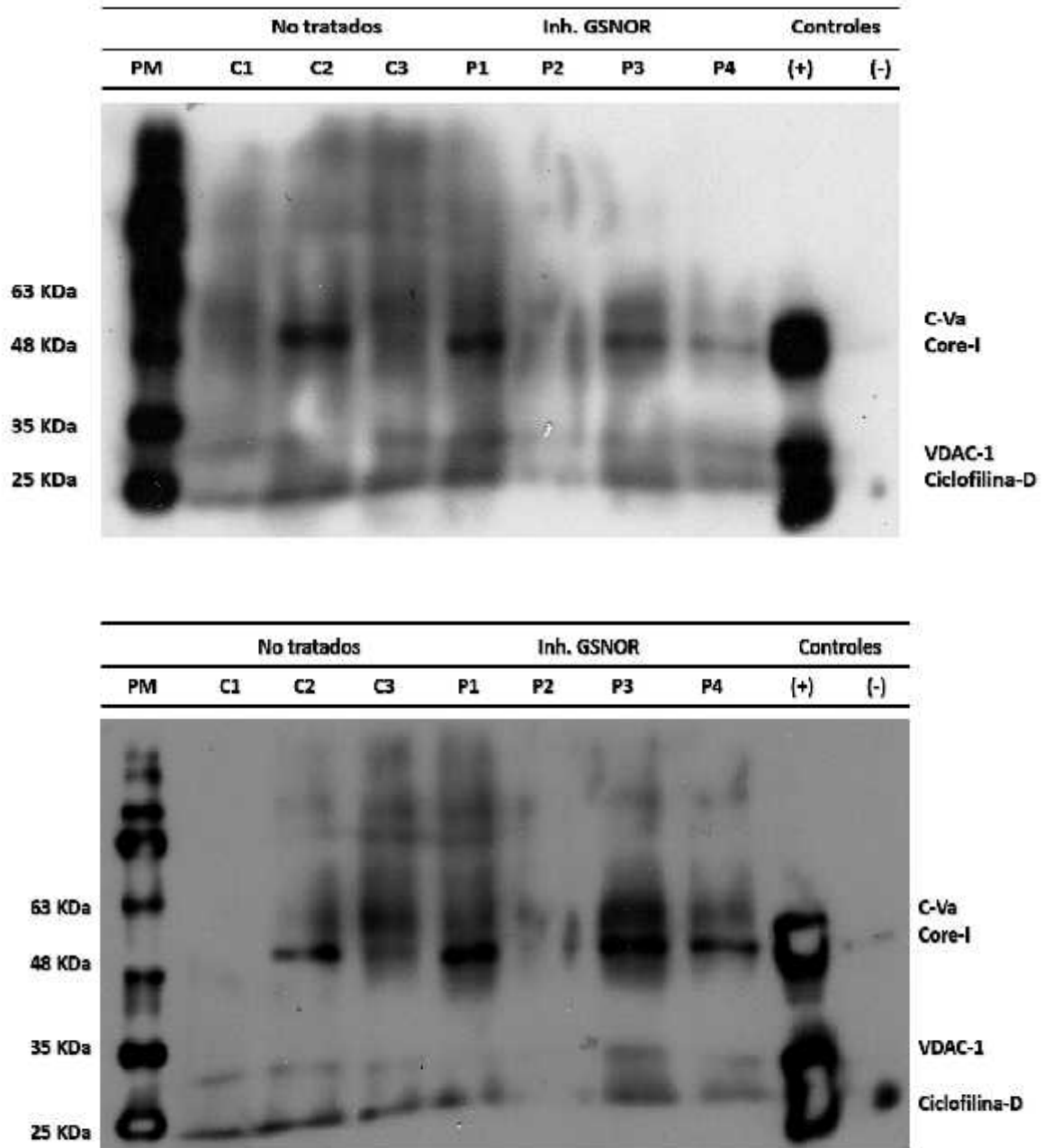


FIGURA N°24. GEL 1 (SUPERIOR) Y GEL 2 (INFERIOR), PROTEÍNAS MITOCONDRIALES OBTENIDAS DE UN HOMOGENIZADO DE CORAZÓN DE RATA, SOMETIDO A SEPARACIÓN CON STREPTOAVIDINA-AGAROSA POSTERIOR AL “BIOTIN-SWICHT”.

Finalmente, se evalúa la intensidad de la señal para cada una de las proteínas vistas en ambos geles (figura N°25 y N°26), con el objetivo de poder evaluar si existe algún predominio en la S-nitrosilación de algunas de estas proteínas asociada a la inhibición de GSNOR en los homogenizados de corazón con respecto a las muestras de homogenizado de corazones no tratadas, obteniéndose que en el gel 1 (figura N°23 superior) no existe una diferencia significativa ($p > 0,05$) para las proteínas ciclofilina D, C-Va y core-I, mientras que para VDAC-1 si presenta una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre homogenizado de corazón tratado con el inhibidor de GSNOR, no obstante en el gel 2 (figura N°24 inferior) no existe diferencia significativa ($p < 0,05$) para ninguna de las proteínas mitocondriales evaluadas en ambos tipos de tejidos de homogenizado de corazón de rata.

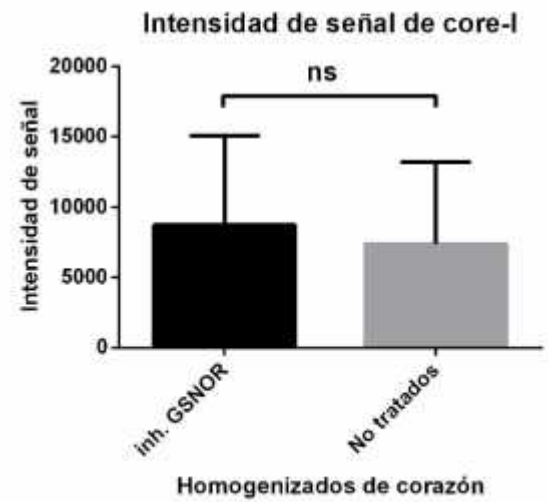
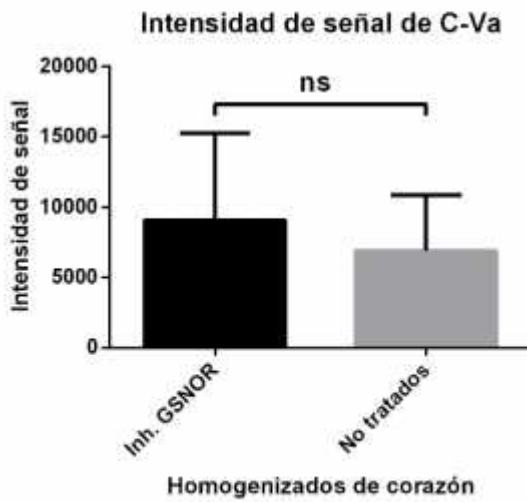
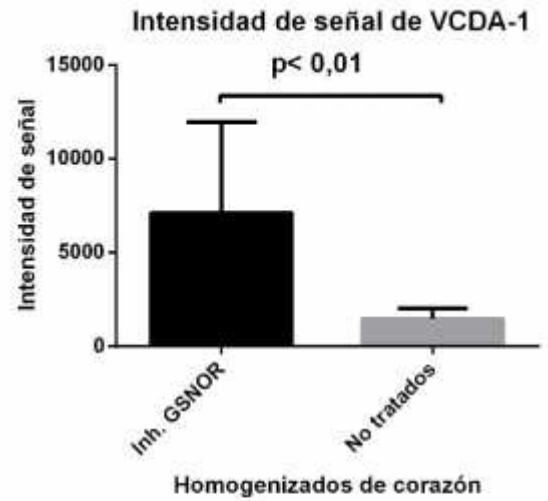
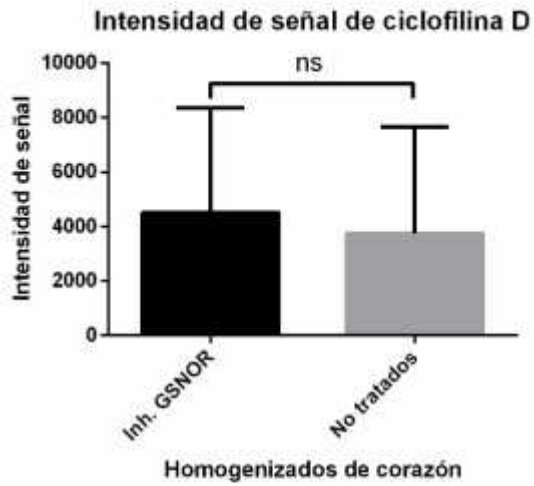


FIGURA N°25. INTENSIDAD DE SEÑAL DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES (CICLOFILINA D, VDCA-1, C-VA Y CORE-I) EVALUADAS EN EL GEL 1

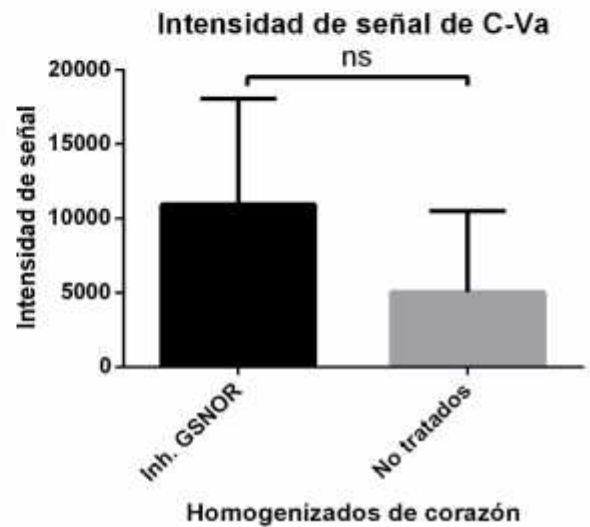
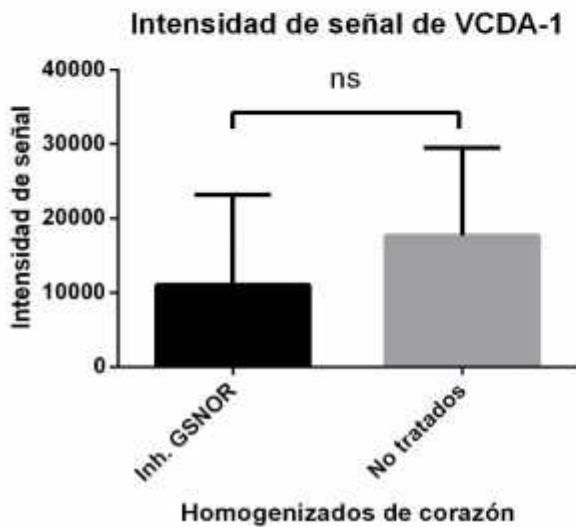
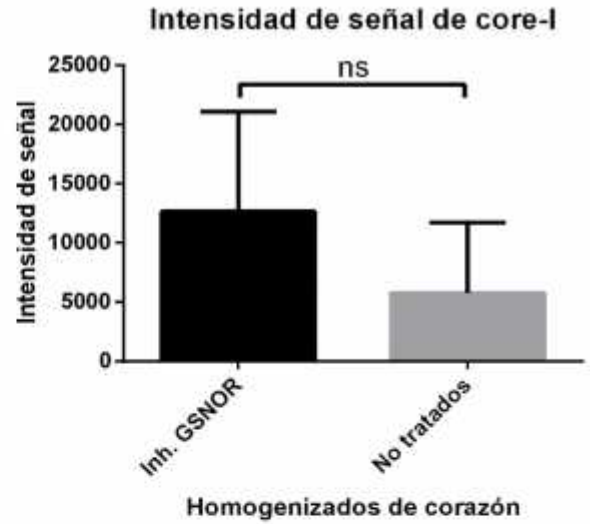
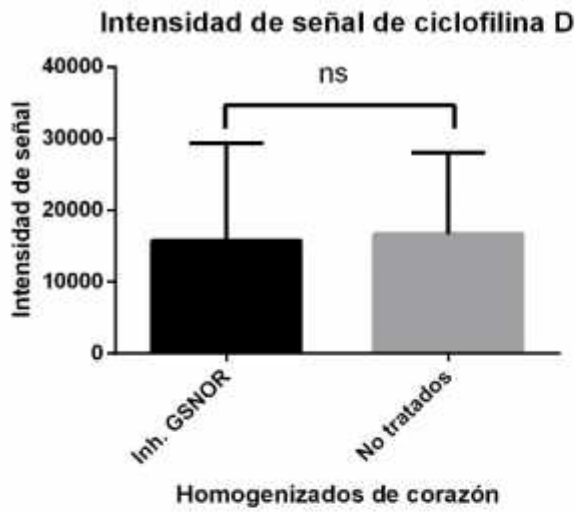


FIGURA N°26. INTENSIDAD DE LA SEÑAL DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES (CICLOFILINA D, CORE-I, VDCA-1 Y C-VA) EVALUADAS EN GEL 2.

7. DISCUSIÓN

La S-nitrosilación de proteínas es un evento que promueve la cardioprotección mediante la formación de enlaces nitrosotioles, descrita como una modificación post-traducciona asociada a enzimas nitrosilantes como las isoformas de óxido nítrico sintasas (NOS), cuyo efecto es prevenir la oxidación de proteínas cardíacas durante los procesos de isquemia-reperfusión, asociado al aumento de NO, evitando el deterioro de los miocitos que culmina con la necrosis del tejido cardíaco(13, 24, 47). Es por esto por lo que hoy en día se está estudiando la utilidad y el beneficio que puede presentar la S-nitrosilación de proteínas cardíacas durante los episodios de isquemia-reperfusión, donde varios académicos coinciden en que la inhibición de proteínas desnitrosilante mediante fármacos puede evitar los daños originados durante los episodio de isquemia-reperfusión(18, 42) que se caracteriza por manifestar un estrés oxidativo en los cardiomiocitos, involucrandi principalmente a proteínas implicadas tanto en la homeostasis de Ca^{2+} intracelular (ejemplo: SERCA-ATPasa, PLP, CCTL)(27-29, 47) y enzimas mitocondriales, principalmente las presentes en la cadena transportadora de electrones (ejemplo: complejo III y complejo V) y asociadas a la mantención de la transición de permeabilidad mitocondrial (ejemplo: VDAC-1 y ciclofilina D)(4, 30), afectando a la funcionalidad cardíaca.

La inhibición de la enzima GSNOR en homogenizados de corazón se evidencia mediante la evaluación de la actividad enzimática mostrada en la figura N°17, presentando una menor cinética enzimática en los homogenizados de rata sometidos al inhibidor de GSNOR, seguido del homogenizado de ratas no tratadas y finalmente por el homogenizado de hígado que se emplea principalmente como un control positivo, que fueron evaluadas bajo las mismas condiciones como se observa en la figura N°18, con la finalidad de

demostrar de que si existe una S-nitrosilación significativa en las proteínas cardiacas sea realmente por la inhibición farmacológica de la enzima.

Posteriormente se observan las proteínas cardiacas de rata sometidas a biotinización (figura N°19) logrando estandarizar el contenido adecuado de proteínas con respecto al volumen cargado en los geles, donde realizado el Western-blot (figura N°20) se evidencia que el tejido cardiaco de rata sometidos a inhibidor de GSNOR presento una mayor intensidad de señal promedio en comparación con el tejido cardiaco de ratas no tratadas, así simultáneamente se comprueba la reproducibilidad del método biotin-swicht (figura N°23) al observar una intensidad de señal menor en los homogenizados de corazón de rata no tratados con ascorbato en comparación con los homogenizados tratados con ascorbato, con una tendencia al incremento, demostrando que la biotinización de tejidos cardiacos tratados con inhibidor de GSNOR se debe realmente a un aumento de la S-nitrosilación asociado a la biotinización por biotin-swicht y no una detección de biotinización endógena presente en las proteínas.

Finalmente se puede observar que la presencia de proteínas mitocondriales fueron S-nitrosiladas (Figura N°24), pues este homogenizado fue sometido a una separación por streptoavidina-agarosa que solo separa proteínas altamente biotinizadas, donde realizado el western-blot se logra evidenciar cuatro proteínas mitocondriales específicas como C-Va, una subunidad del complejo V de la enzima ATP-sintasa, core-I asociada al complejo III, (proteínas principalmente implicadas en la cadena transportadora de electrones), VCDA-1 y ciclofilina D (implicadas en lo que respecta a la mantención de la permeabilidad de transición mitocondrial). No se puede observar una intensidad significativa entre los tejidos cardiacos sometidos a inhibidor de GSNOR y los controles (figura N°25 y N°26), a excepción de la VCDA-1 en el gel 1, que presento una diferencia significativa entre ambos grupos. Por lo tanto, se espera que a futuro se realicen estudio empleando anticuerpos específicos para lograr evaluar de forma más sensible y especifica el nivel de expresión en

estos homogenizados, no obstante, la finalidad de este ensayo es principalmente evidenciar proteínas mitocondriales S-nitrosiladas, por lo que su indagación queda pendiente y abierta a estudios posteriores.

Actualmente no existen muchas evidencias ni estudios del proceso de S-nitrosilación en proteínas mitocondriales, puesto que se menciona que no existen nitrosilasas localizadas en el medio interno de las mitocondrias, ya que esta es mediada principalmente por trans-nitrosilasas externas, como G3PDH que es capaz de S-nitrosilar proteínas mitocondriales atravesando la membrana mitocondrial externa y trans-S-nitrosilar(33) proteínas como el complejo III (core-I), complejo V (C-Va), VCDA-1 y ciclofilina D (proteínas principalmente evidenciadas en este escrito), por lo que se infiere que la fosforilación oxidativa y la mantención de la permeabilidad de transición mitocondrial están muy relacionadas al estrés oxidativo generado tras el proceso de isquemia-reperfusión, por lo que pueden ser blancos fundamentales para lo que respecta a la cardio-protección, al evitar las modificaciones de estas proteínas mediadas por radicales libres, evitando la depleción de ATP y liberación de mediadores pro-apoptóticos, disminuyendo los efectos degenerativos al miocardio(7, 10, 13, 20, 28).

8. CONCLUSIÓN

La S-nitrosilación es más que un proceso de modificación post-traducciona, que puede intervenir a varios niveles en los efectos intracelulares que modulan la función fisiológica a nivel de los cardiomiocitos, principalmente en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular y la actividad mitocondrial.

El método de biotin-switch puede detectar la s-nitrosilación de proteínas mediante la identificación por Western-blot empleando un anticuerpo anti-biotina conjugado con una enzima peroxidasa. La inhibición de la actividad enzimática de GSNOR aumenta la S-nitrosilación de proteínas cardíacas, sin embargo, este proceso puede funcionar de manera distinta a nivel de la mitocondria, pues no se observa un predominio evidente entre el grupo tratado con fármaco y el basal o control.

Finalmente, las proteínas mitocondriales que mayormente pueden estar implicadas en modificaciones de S-nitrosilación tras eventos de isquemia-reperfusión, suelen estar implicadas en procesos como la fosforilación oxidativa y la mantención de la permeabilidad de transición mitocondrial, procesos fundamentales para la supervivencia de cualquier célula.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Penna C, Angotti C, Pagliaro P. Protein S-nitrosylation in preconditioning and postconditioning. *Exp Biol Med* (Maywood). 2014;239(6):647-62.
2. Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(2):150-66.
3. Zhang YH. Nitric oxide signalling and neuronal nitric oxide synthase in the heart under stress. *F1000Res*. 2017;6:742.
4. Wilson RJ, Drake JC, Cui D, Lewellen BM, Fisher CC, Zhang M, et al. Mitochondrial protein S-nitrosation protects against ischemia reperfusion-induced denervation at neuromuscular junction in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*. 2018;117:180-90.
5. Wang X, Shults NV, Suzuki YJ. Oxidative profiling of the failing right heart in rats with pulmonary hypertension. *PLoS One*. 2017;12(5):e0176887.
6. Kohr MJ, Sun J, Aponte A, Wang G, Gucek M, Murphy E, et al. Simultaneous measurement of protein oxidation and S-nitrosylation during preconditioning and ischemia/reperfusion injury with resin-assisted capture. *Circ Res*. 2011;108(4):418-26.
7. Simon JN, Duglan D, Casadei B, Carnicer R. Nitric oxide synthase regulation of cardiac excitation-contraction coupling in health and disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;73:80-91.
8. Menazza S, Aponte A, Sun J, Gucek M, Steenbergen C, Murphy E. Molecular Signature of Nitroso-Redox Balance in Idiopathic Dilated Cardiomyopathies. *J Am Heart Assoc*. 2015;4(9):e002251.
9. Diers AR, Broniowska KA, Hogg N. Nitrosative stress and redox-cycling agents synergize to cause mitochondrial dysfunction and cell death in endothelial cells. *Redox Biol*. 2013;1:1-7.
10. Shao Q, Casin KM, Mackowski N, Murphy E, Steenbergen C, Kohr MJ. Adenosine A1 receptor activation increases myocardial protein S-nitrosothiols and elicits protection from ischemia-reperfusion injury in male and female hearts. *PLoS One*. 2017;12(5):e0177315.
11. Brecht DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem*. 1994;63:175-95.
12. Chen AF, Chen DD, Daiber A, Faraci FM, Li H, Rembold CM, et al. Free radical biology of the cardiovascular system. *Clin Sci (Lond)*. 2012;123(2):73-91.
13. Wolhuter K, Eaton P. How widespread is stable protein S-nitrosylation as an end-effector of protein regulation? *Free Radic Biol Med*. 2017;109:156-66.
14. Jayakumari NR, Reghuvaran AC, Rajendran RS, Pillai VV, Karunakaran J, Sreelatha HV, et al. Are nitric oxide-mediated protein modifications of functional significance in diabetic heart? *ye'S, -NO', wh'Y-NO't?* *Nitric Oxide*. 2014;43:35-44.
15. Lin Y, Chen Y, Zhu N, Zhao S, Fan J, Liu E. Hydrogen sulfide inhibits development of atherosclerosis through up-regulating protein S-nitrosylation. *Biomed Pharmacother*. 2016;83:466-76.

16. Huang ZM, Gao E, Fonseca FV, Hayashi H, Shang X, Hoffman NE, et al. Convergence of G protein-coupled receptor and S-nitrosylation signaling determines the outcome to cardiac ischemic injury. *Sci Signal*. 2013;6(299):ra95.
17. Irie T, Sips PY, Kai S, Kida K, Ikeda K, Hirai S, et al. S-Nitrosylation of Calcium-Handling Proteins in Cardiac Adrenergic Signaling and Hypertrophy. *Circ Res*. 2015;117(9):793-803.
18. Sips PY, Irie T, Zou L, Shinozaki S, Sakai M, Shimizu N, et al. Reduction of cardiomyocyte S-nitrosylation by S-nitrosogluthione reductase protects against sepsis-induced myocardial depression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;304(8):H1134-46.
19. Hogg N. Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols. *Free Radic Biol Med*. 2000;28(10):1478-86.
20. Richardson G, Benjamin N. Potential therapeutic uses for S-nitrosothiols. *Clin Sci (Lond)*. 2002;102(1):99-105.
21. Martínez-Ruiz A, Araújo IM, Izquierdo-Álvarez A, Hernansanz-Agustín P, Lamas S, Serrador JM. Specificity in S-nitrosylation: a short-range mechanism for NO signaling? *Antioxid Redox Signal*. 2013;19(11):1220-35.
22. Green LS, Chun LE, Patton AK, Sun X, Rosenthal GJ, Richards JP. Mechanism of inhibition for N6022, a first-in-class drug targeting S-nitrosogluthione reductase. *Biochemistry*. 2012;51(10):2157-68.
23. Liu L, Yan Y, Zeng M, Zhang J, Hanes MA, Ahearn G, et al. Essential roles of S-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock. *Cell*. 2004;116(4):617-28.
24. Weerateerangkul P, Chattipakorn S, Chattipakorn N. Roles of the nitric oxide signaling pathway in cardiac ischemic preconditioning against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Med Sci Monit*. 2011;17(2):RA44-52.
25. Sanghani PC, Davis WI, Fears SL, Green SL, Zhai L, Tang Y, et al. Kinetic and cellular characterization of novel inhibitors of S-nitrosogluthione reductase. *J Biol Chem*. 2009;284(36):24354-62.
26. Iyer AK, Rojanasakul Y, Azad N. Nitrosothiol signaling and protein nitrosation in cell death. *Nitric Oxide*. 2014;42:9-18.
27. Sun J, Murphy E. Protein S-nitrosylation and cardioprotection. *Circ Res*. 2010;106(2):285-96.
28. Treuer AV, Gonzalez DR. Nitric oxide synthases, S-nitrosylation and cardiovascular health: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities (review). *Mol Med Rep*. 2015;11(3):1555-65.
29. Tang L, Wang H, Ziolo MT. Targeting NOS as a therapeutic approach for heart failure. *Pharmacol Ther*. 2014;142(3):306-15.
30. Methner C, Chouchani ET, Buonincontri G, Pell VR, Sawiak SJ, Murphy MP, et al. Mitochondria selective S-nitrosation by mitochondria-targeted S-nitrosothiol protects against post-infarct heart failure in mouse hearts. *Eur J Heart Fail*. 2014;16(7):712-7.
31. Burwell LS, Nadtochiy SM, Tompkins AJ, Young S, Brookes PS. Direct evidence for S-nitrosation of mitochondrial complex I. *Biochem J*. 2006;394(Pt 3):627-34.
32. Martínez-Ruiz A, Villanueva L, González de Orduña C, López-Ferrer D, Higuera MA, Tarín C, et al. S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(24):8525-30.
33. Kohr MJ, Murphy E, Steenbergen C. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase acts as a mitochondrial trans-S-nitrosylase in the heart. *PLoS One*. 2014;9(10):e111448.

34. Bernardi P, Di Lisa F. The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;78:100-6.
35. Leite AC, Oliveira HC, Utino FL, Garcia R, Alberici LC, Fernandes MP, et al. Mitochondria generated nitric oxide protects against permeability transition via formation of membrane protein S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1797(6-7):1210-6.
36. Tarze A, Deniaud A, Le Bras M, Maillier E, Molle D, Larochette N, et al. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene.* 2007;26(18):2606-20.
37. Szabo I, Zoratti M. Mitochondrial channels: ion fluxes and more. *Physiol Rev.* 2014;94(2):519-608.
38. Wang H, Xian M. Chemical methods to detect S-nitrosation. *Curr Opin Chem Biol.* 2011;15(1):32-7.
39. Forrester MT, Foster MW, Benhar M, Stamler JS. Detection of protein S-nitrosylation with the biotin-switch technique. *Free Radic Biol Med.* 2009;46(2):119-26.
40. FONDECYT-CONYCYT. Aspectos bioéticos de experimentación animal. 4to taller de bioética organizado por el comité [Internet]. 2009.
41. Fisher T. Ensayo de proteínas BCA. In: Pierce S, editor. 2015. p. 10.
42. Hatzistergos KE, Paulino EC, Dulce RA, Takeuchi LM, Bellio MA, Kulandavelu S, et al. S-Nitrosoglutathione Reductase Deficiency Enhances the Proliferative Expansion of Adult Heart Progenitors and Myocytes Post Myocardial Infarction. *J Am Heart Assoc.* 2015;4(7).
43. chemical C. S-nitrosylated protein detection kit (Biotin swicht). In: chemical C, editor. 2017: 1180 Ellsworth Rd. Ann Arbor MI.USA; 2017. p. 23.
44. Bayer EA, Wilchek M. Avidin column as a highly efficient and stable alternative for immobilization of ligands for affinity chromatography. *J Mol Recognit.* 1990;3(3):102-7.
45. Bayer EA, Wilchek M. The use of the avidin-biotin complex as a tool in molecular biology. *Methods Biochem Anal.* 1980;26:1-45.
46. Carrillo Soto Jorge Guillermo¹ CPMdC, Lugo Sepúlveda Ramón Efraín³, Espinoza Ojeda Eligio³ NRJA. Evaluación de Procedimientos de Tinción para el Análisis de Proteínas por Electroforesis (SDS-PAGE). Universidad de Sonora Campus Centro Campus Caborca Enero-Junio 2013. p. 8.
47. Zhang R, Hess DT, Reynolds JD, Stamler JS. Hemoglobin S-nitrosylation plays an essential role in cardioprotection. *J Clin Invest.* 2016;126(12):4654-8.