

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. MARCO TEÓRICO.....	4
3.1 Lesión por isquemia reperusión.....	4
3.2 Rol de la mitocondria en el cardiomiocito.....	5
3.3 Poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP).....	6
3.3.1 Estructura del mPTP.....	7
3.3.1.1 Ciclofilina D (CypD).....	8
3.3.1.2 Canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC).....	9
3.3.1.3 Transportador de nucleótidos de adenina (ANT).....	9
3.3.1.4 Portador de fosfato inorgánico (PiC).....	10
3.3.1.5 F ₁ F ₀ ATP sintasa.....	10
3.3.1.6 Bax/Bak.....	12
3.3.2 Mecanismos de apertura del mPTP.....	13
3.3.2.1 Mecanismos mitocondriales de muerte celular durante isquemia reperusión.....	14
3.4 Óxido nítrico (NO).....	16
3.4.1 Síntesis del óxido nítrico.....	16
3.4.2 Vías de señalización del óxido nítrico.....	18
3.4.3 S-nitrosilación.....	18
3.4.3.1 S-nitrosilación de proteínas y su efecto cardioprotector.....	19
3.4.4 Técnica de detección de S-nitrosilación (biotin switch).....	22
3.4.4.1 Biotin Switch.....	23
3.4.5 S-nitrosoglutatión reductasa.....	25
3.4.5.1 Inhibición de la S-nitrosoglutatión reductasa.....	26
3.5 Enzimas cardíacas.....	27
3.5.1 Lactato deshidrogenasa.....	27
3.5.2 Creatina quinasa.....	28

4. HIPÓTESIS.....	30
5. OBJETIVOS.....	30
5.1 Objetivo general.....	30
5.2 Objetivos específicos.....	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
6.1 Modelo animal.....	31
6.2 Sacrificio de las ratas.....	31
6.3 Retroperfusión del corazón de rata.....	32
6.3.1 Determinación de lactato deshidrogenasa (LDH).....	35
6.3.2 Determinación de creatin kinasa (CK).....	35
6.4 Obtención de homogeneizados de corazón de rata.....	36
6.5 Cuantificación de proteínas totales.....	37
6.6 Ensayo para detección de S-nitrosilación de proteínas.....	38
6.6.1 Fase de bloqueo.....	38
6.6.2 Fase de reducción-marcaje.....	39
6.6.3 Separación de proteínas biotiniladas con estreptavidina agarosa.....	40
6.6.4 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.....	40
6.6.4.1 Preparación de geles de poliacrilamida.....	40
6.6.4.2 Corrida electroforética.....	42
6.6.5 Western blot.....	43
6.6.5.1 Electrotransferencia.....	44
6.6.5.2 Bloqueo.....	45
6.6.5.3 Detección de proteínas.....	45
6.6.5.4 Revelado.....	47
6.7 Cuantificación de proteínas detectadas.....	48
6.8 Análisis estadístico.....	48
6.9 Protocolo para biotin switch.....	48
6.9.1 Preparación de las muestras.....	48
6.9.2 Fase de bloqueo.....	49
6.9.3 Fase de reducción-marcaje.....	50
6.9.4 Separación de proteínas biotiniladas con estreptavidina agarosa.....	51
6.9.5 Corrida electroforética.....	51

6.9.6	Western blot.....	52
6.9.6.1	Electrotransferencia.....	52
6.9.6.2	Bloqueo.....	53
6.9.6.3	Detección de proteínas.....	53
6.9.6.4	Revelado.....	54
7.	RESULTADOS.....	55
7.1	Características de los modelos animales.....	55
7.2	Curva de calibración para proteínas totales.....	55
7.3	Cuantificación de proteínas totales en homogeneizados de corazón.....	57
7.4	Enzimas cardíacas (LDH y CK).....	57
7.5	Biotin switch.....	60
7.5.1	Cuantificación de pixeles.....	61
7.6	Western blot de proteínas mitocondriales.....	63
7.6.1	Cuantificación de pixeles.....	64
7.7	Relación entre las proteínas biotiniladas del biotin switch y las fracciones totales.....	66
7.8	Western blot de expresión de eNOS.....	68
7.8.1	Cuantificación de pixeles.....	69
8.	DISCUSIÓN.....	71
9.	CONCLUSIÓN.....	77
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

ÍNDICE DE TABLAS

1. Tabla 1. Posibles efectos cardioprotectores de la SNO de proteínas.....	21
2. Tabla 2. Componentes de los geles de poliacrilamida.....	41
3. Tabla 3. Peso promedio de los distintos grupos de ratas y sus corazones.....	55
4. Tabla 4. Curva de calibración de albúmina de suero bovino medido utilizando método de BCA Pierce TM	56
5. Tabla 5. Cuantificación de proteínas totales en homogeneizados de corazón.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Figura 1. Estructura molecular del mPTP.....	8
2. Figura 2. Subunidades de la F ₁ F ₀ ATP sintasa mitocondrial.....	12
3. Figura 3. Mecanismos de muerte celular en mitocondrias durante isquemia reperfusión.....	15
4. Figura 4. Síntesis de óxido nítrico.....	17
5. Figura 5. Posibles mecanismos de cardioprotección mediante SNO.....	20
6. Figura 6. Métodos comunes para la detección de SNO.....	23
7. Figura 7. Descripción general de la técnica de biotin switch.....	24
8. Figura 8. Sistema de retroperfusión.....	33
9. Figura 9. Inhibidor de GSNOR (ácido 5-cloro-3-(2-[4-etoxifenil](etil)amino]-2- oxoetil)-1H-indol-2-carboxílico).....	34
10. Figura 10. Esquema de separación del marcador de peso molecular SDS-PAGE - Prism Ultra Protein Ladder (3.5 - 245 kDa) (ab116029).....	43
11. Figura 11. Posición de los componentes del sándwich de transferencia.....	44
12. Figura 12. Proteínas mitocondriales reconocidas por el coctel de anticuerpos de inmunoglobulinas IgG mono específicas Thermofisher scientific®.....	46
13. Figura 13. Curva de calibración de albúmina por el método de BCA Pierce™.....	56
14. Figura 14. Variación de los niveles de Lactato Deshidrogenasa (LDH) en el grupo control (n = 3) y en presencia del inhibidor de GSNOR (n = 3).....	58
15. Figura 15. Variación de los niveles de Creatina Kinasa (CK) en el grupo control y en presencia del inhibidor de GSNOR (n = 3).....	59
16. Figura 16. Western blot de muestras tratadas con la técnica de biotin switch.....	61
17. Figura 17. S-nitrosilación de subunidades mitocondriales sometidas al método de biotin switch.....	62
18. Figura 18. Western blot de proteínas mitocondriales del grupo control (n = 3) y el grupo sometido a inhibidor de GSNOR (n = 3).....	64
19. Figura 19. Cuantificación de proteínas mitocondriales en las muestras de corazón mediante western blot.....	65

20. Figura 20. Relación SNO/Proteínas mitocondriales totales.....	67
21. Figura 21. Niveles de expresión de óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS).....	69
22. Figura 22. Cuantificación de los niveles de expresión de óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS).	70