



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

**IMPACTO DE LA INHIBICIÓN DE LA S-NITROSOGLUTATIÓN REDUCTASA
SOBRE LA S-NITROSILACIÓN DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES**

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

**AUTORES: CARLOS ALEJANDRO MANRÍQUEZ MONTECINOS
ANDREA FERNANDA ROJAS MENDOZA
PROFESOR GUÍA: PhD. BQ. DANIEL GONZÁLEZ REINOSO**

**TALCA-CHILE
AÑO 2019**

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

*A nuestras familias y en especial a nuestras
madres Inés y Rosa, por el infinito apoyo
durante nuestra formación
profesional.*

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

1. RESUMEN

El poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) es una estructura que se forma en las mitocondrias comunicando la matriz mitocondrial directamente con el citoplasma. Se ha propuesto como un conglomerado de proteínas entre las que destacan CypD, VDAC, F₁ F₀ ATP sintasa, entre otras. El óxido nítrico (NO) es un radical libre lábil y reactivo, cuya producción es catalizada por la familia de NO sintasas (NOSs). Existen tres isoformas de NOS; neuronal (nNOS), inducible (iNOS) y endotelial (eNOS). Existen dos mecanismos de señalización en los que participa NO, uno indirecto dependiente de GMPc y otro directo o independiente de GMPc conocido como S-nitrosilación, la que consiste en la adición de un grupo NO al grupo tiol de un residuo de cisteína a través de un enlace covalente, cuya importancia consiste en prevenir el estrés oxidativo en los procesos de isquemia-reperfusión luego de un infarto agudo al miocardio.

En la presente investigación se evaluó la S-nitrosilación en tejido cardíaco de ratas sometidas a isquemia-reperfusión, evaluando a través de la técnica de biotin switch, el efecto de una droga inhibidora de la GSNOR, que regula negativamente la generación de los enlaces nitroso-tioles, al ser una enzima desnitrosilante. Por otro lado, se evaluó el nivel de daño cardíaco inducido por el proceso de isquemia-reperfusión y el efecto que el inhibidor de GSNOR tiene sobre la liberación de enzimas cardíacas tales con LDH y CK

Se observó que el uso de un inhibidor de GSNOR, tiene un efecto cardioprotector al disminuir la liberación de enzimas cardíacas, además se observó que favorece la S-nitrosilación en proteínas mitocondriales, específicamente el complejo V y CypD, lo que respaldaría el posible efecto positivo del inhibidor de GSNOR.

Palabras clave: Isquemia-reperfusión, biotin switch, mPTP, S-nitrosilación, GSNOR.

2. INTRODUCCIÓN

El sistema cardiovascular está constituido por un conjunto de redes venosas, arteriales y capilares que, en conjunto con el corazón, cumplen un rol fundamental a nivel fisiológico, como el transporte de metabolitos, desechos, gases y muchas otras moléculas a través de la sangre y los elementos presentes en esta (1).

La enfermedad coronaria es una de las principales causas de muerte y de incapacidad en el mundo (2). Las consecuencias de esta enfermedad en la salud mundial se producen por un mecanismo único, la muerte celular, que tanto de forma directa como indirecta, a través del fallo contráctil, el remodelado ventricular y las arritmias, se origina el desarrollo de una insuficiencia cardíaca, incapacidad y muerte (3). El grado de extensión de la necrosis causada por la oclusión coronaria aguda depende tanto de la extensión del área de riesgo, la severidad y duración de la isquemia (4).

Respecto a los procesos patológicos asociados a este sistema, estos actualmente constituyen la principal causa de muerte en la población chilena, lo que se asocia principalmente a cambios en el estilo de vida de los chilenos durante las últimas décadas (5). A causa de lo mencionado anteriormente, durante los últimos 20 años ha aumentado el estudio de los distintos procesos fisiopatológicos y factores de riesgo que favorecen el desarrollo de estos cuadros clínicos que afectan al sistema cardiovascular como hipertensión, infarto agudo al miocardio, accidente cerebrovascular, entre otras patologías (5).

Es de suma importancia conocer los mecanismos que actúan regulando los procesos fisiológicos y patológicos a nivel del cardiomiocito como ocurre en el proceso de isquemia reperfusión, donde el daño generado a nivel cardíaco por este síndrome puede generar

graves consecuencias en el estado de salud de las personas pudiendo desencadenar cuadros clínicos sumamente graves. Es por eso que hoy se buscan múltiples dianas terapéuticas que permitan generar un efecto cardioprotector, y una de ellas sería el anillo c de la $F_1 F_0$ ATP sintasa ubicada en el poro de transición de permeabilidad mitocondrial ubicada en los cardiomiocitos (3).

El poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP), se refiere al canal mitocondrial que media el cambio abrupto o transición en la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna que ocurre bajo ciertas condiciones (6). En la década de 1980 se investigó por primera vez el rol del mPTP como un posible mediador en la lesión por isquemia–reperfusión (IRI) del miocardio agudo, demostrándose que la mitocondria cardíaca es regulada por factores como Ca^{+2} , fosfato inorgánico, estrés oxidativo y ADP. Estos factores se modulan durante el IRI agudo y actúan para inducir la apertura del mPTP (7).

En las células de mamíferos, la S-nitrosilación afecta procesos que son cruciales y diversos, los que incluyen la neurotransmisión y la memoria, la expresión de genes, la excitabilidad celular, la energía mitocondrial, el control del flujo sanguíneo y la respiración (8). La S-nitrosilación modula las principales corrientes involucradas en la generación del potencial de acción y en el desarrollo del tránsito de Ca^{+2} . Sin embargo, cuando existe una S-nitrosilación aberrante se ha implicado una variedad de patologías cardíacas, en las que se incluyen las arritmias, lesión por reperfusión, preconditionamiento e insuficiencia cardíaca (9).

En el presente trabajo se buscará si la S-nitrosilación tiene algún efecto cardioprotector sobre el tejido cardíaco de ratas, sometido a isquemia reperfusión y evaluar la especificidad de este mecanismo en estudio.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 LESIÓN POR ISQUEMIA REPERFUSIÓN

La obstrucción repentina de una arteria coronaria causa una lesión cardíaca aguda como resultado de la muerte isquémica de numerosos cardiomiocitos en la región anatómica suministrada por la arteria (4). Este proceso se genera durante la isquemia miocárdica donde el estado hipóxico detiene la actividad de la cadena transportadora de electrones mitocondrial y por ende la síntesis de ATP, generándose una disminución de este a nivel de los cardiomiocitos (4). De este modo, al detenerse la actividad metabólica aeróbica, el piruvato se transforma en ácido láctico, lo que genera una disminución del pH celular y acidosis metabólica (10). Otro de los procesos que se activan durante el proceso de acidosis es la activación del intercambiador H^+/Na^+ el cual permite eliminar H^+ , además se activa la bomba Na^+/K^+ ATPasa para eliminar el exceso de Na^+ intracelular debido a la acidosis. Sin embargo, durante el proceso de isquemia reperfusión, los niveles de ATP son limitados por lo que la actividad de la bomba Na^+/K^+ ATPasa es limitada, lo que conduce a un aumento progresivo del Na^+ intracelular y a la posterior activación del intercambiador Na^+/Ca^{+2} (3). Además de todos estos procesos mencionados anteriormente también aumenta la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), por lo que el corazón en un proceso de isquemia prolongado va a generar la apertura de mPTP lo que va a llevar a la posterior muerte de los cardiomiocitos (11).

La reperfusión temprana exitosa se considera la estrategia más efectiva para minimizar la lesión isquémica y el tamaño del infarto al miocardio, mejorando en última instancia el resultado clínico general (12). Sin embargo, la reperfusión de la arteria coronaria también es considerada perjudicial, ya que se asocia comúnmente con aturdimiento miocárdico, arritmia ventricular o sin reflujo, un índice de disfunción microvascular (12).

El tratamiento del infarto agudo al miocardio consiste en restaurar el flujo de sangre al miocardio isquémico lo antes posible, mediante el uso de trombolíticos o intervención coronaria percutánea (ICP) (13). En la zona peri-infarto, puede ejercer un efecto perjudicial sobre los cardiomiocitos localizados en el área isquémica en riesgo, donde las células pueden morir debido al estrés oxidativo, la sobrecarga de calcio, la apertura del mPTP y la inducción adicional de apoptosis o necrosis dependiendo del nivel de ATP en esa etapa de la lesión (14). Este proceso se conoce como lesión por reperfusión (14).

Dependiendo de la duración y la gravedad de la isquemia miocárdica, la reperfusión puede dar como resultado la recuperación de la función contráctil o la rápida transición hacia la necrosis tisular (12). Existen datos que respaldan que la reperfusión también contribuye al daño miocárdico irreversible mediante un mecanismo propuesto de disfunción mitocondrial, mediante la activación y apertura de mPTP (12).

3.2 ROL DE LA MITOCONDRIA EN EL CARDIOMIOCITO

La relevancia del estudio de las mitocondrias es de suma importancia, debido a que estas son mediadores críticos de la vida celular a través de la producción de energía, así como la muerte a través de la inducción de apoptosis y necrosis. Estas funciones son especialmente relevantes en el corazón, donde las mitocondrias suministran el 90% del ATP de los cardiomiocitos (15) y la muerte celular debida a mecanismos de destrucción intrínseca mitocondrial subyace a una serie de enfermedades cardíacas (16). Este organelo participa en los procesos de muerte celular como la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis, sin embargo durante los últimos años se ha propuesto al mPTP, como un factor clave en los procesos de muerte celular y daño cardíaco (3).

Si bien muchas vías de muerte convergen en las mitocondrias, hay evidencia que indica que el poro de transición de permeabilidad mitocondrial actúa como un punto clave en la mediación de la disfunción cardíaca y la muerte celular (17). Al iniciar un colapso bioenergético y la muerte celular, se ha implicado en la fisiopatología de las principales enfermedades humanas, incluidas las enfermedades neuromusculares de la infancia, la lesión por isquemia-reperfusión y la enfermedad neurodegenerativa relacionada con la edad (18).

3.3 PORO DE TRANSICIÓN DE PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL (mPTP)

Entre las principales características de la mitocondria se destaca la permeabilidad extremadamente baja que presenta la membrana mitocondrial interna (MMI), sin embargo, bajo ciertas condiciones como por ejemplo una alta concentración de Ca^{+2} presente en la matriz mitocondrial, ocurre un fenómeno denominado Transición de Permeabilidad Mitocondrial (TPM), que se genera debido a la presencia del mPTP (19).

La existencia del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, que conecta directamente la matriz mitocondrial con el citoplasma, provino de los primeros estudios de Haworth y Hunter (20), donde sugirieron que un canal hidrofílico era responsable de la transición de la permeabilidad inducida por los polímeros de polietilenglicol (PEG) de un tamaño de hasta 1,5 kDa (20).

La apertura del mPTP genera un colapso del potencial de membrana interna, un desacoplamiento de la cadena respiratoria, la detención de la síntesis de ATP mitocondrial y finalmente una inflamación, rotura y muerte celular mitocondrial (21). La apertura de este poro se activa con el Ca^{+2} junto con el fosfato y especies reactivas del oxígeno (ROS), y es inhibido por factores como los nucleótidos de adenina, pH bajo, cationes divalentes como el Mg^{+2} e inhibidores de la ciclofilina D (CypD) como la ciclosporina A (CsA) (22).

3.3.1 ESTRUCTURA DEL mPTP

Hasta hoy en día, existe poca claridad en cuanto a los constituyentes moleculares de mPTP, sin embargo, algunos autores han propuesto distintos modelos que tratan de explicar la dinámica de esta proteína. Históricamente, uno de los primeros modelos que se propuso indicaba que mPTP estaba compuesto por un regulador a nivel de la matriz mitocondrial denominado CypD, un translocador de nucleótidos de adenina (ANT) ubicado en la MMI y un canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) ubicado en la membrana mitocondrial externa (23). Sin embargo, la evaluación genética del modelo de mPTP ha indicado que existen además otros componentes como el portador de fosfato mitocondrial (PiC), que junto con ANT y CypD sirven como reguladores del poro; proteínas pro apoptóticas de la familia Bcl-2 (24) que funcionan en la membrana externa para permitir la inflamación y ruptura mitocondrial una vez que se abre el complejo de membrana interna. Y finalmente la $F_1 F_0$ de la ATP sintasa, la cual es candidata para la formación de poros de la membrana interna del mPTP (17) (figura 1).

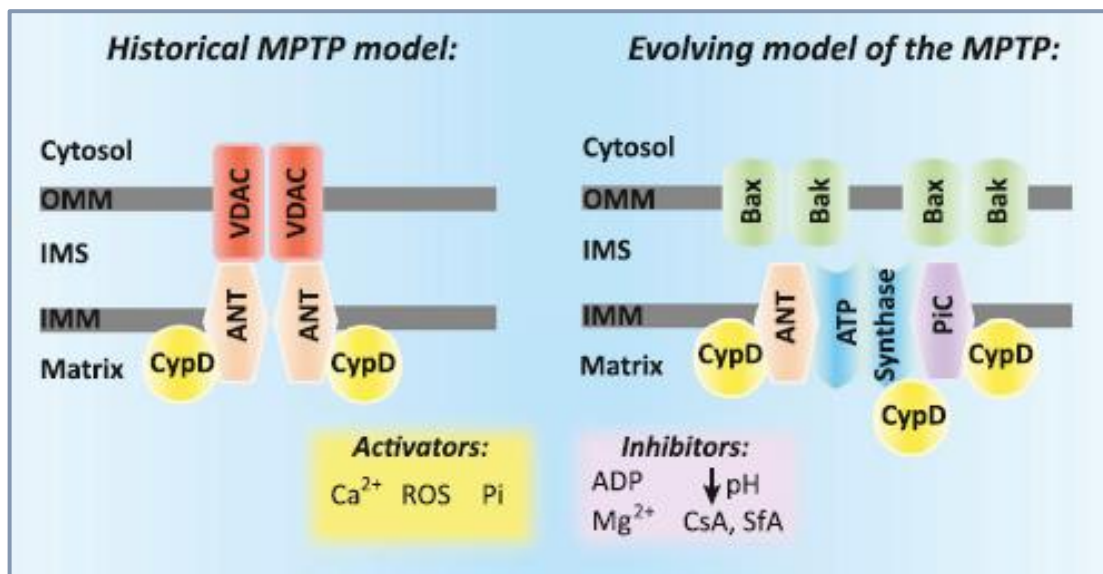


Figura 1. Estructura molecular del mPTP. El modelo original del MPTP presenta VDAC, ANT y CypD como constituyentes centrales del complejo (izquierda). El modelo en evolución del MPTP presenta ANT, PiC y CypD como reguladores del poro, Bax/Bak en la membrana externa permitiendo la inflamación y ruptura mitocondrial una vez abierto el complejo de membrana interna. Una ATP sintasa que tiene dominios F₁ F₀ para la probable formación de poros en la membrana interna del mPTP (derecha). Abreviaturas: IMM, membrana mitocondrial interna; OMM, membrana mitocondrial externa; IMS, espacio intermembrana (17). Tomado y adaptado de Kwong (2015).

3.3.1.1 CICLOFILINA D (CypD)

En relación a las subunidades esenciales del mPTP podemos encontrar diversas proteínas, una de ellas es la ciclofilina D, la cual es una proteína de 17 kDa, que se ubica en la matriz mitocondrial y se caracteriza porque es una enzima con actividad peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa y su rol respecto a mPTP es claro, ya que actúa como regulador del poro (17), tal como se mencionó anteriormente. Se demostró que CypD se une tanto a VDAC como a ANT (23).

En cuanto al mecanismo regulador de CypD es muy poco conocido, sin embargo, se ha visto que esta enzima es blanco de distintos fármacos, uno de ellos la CsA, la cual se une a CypD e impide la apertura de mPTP. Esto es muy importante, ya que se ha visto en diversos estudios, que el tratamiento farmacológico dirigido contra CypD o el silenciamiento del gen que codifica para esta proteína tiene un efecto positivo sobre la muerte celular post isquemia (25, 26). De esta forma hay estudios donde se demostró que las mitocondrias que carecían de CypD tenían una sensibilidad reducida al Ca^{+2} y apertura del mPTP inducida por estrés oxidativo (27). A pesar de ello, los altos niveles de Ca^{+2} aún provocan la transición de la permeabilidad, sugiriendo que CypD controla la apertura del mPTP (27, 28). Sin embargo, aún no se ha determinado el mecanismo preciso mediante el cual CypD controla la apertura del mPTP (17).

3.3.1.2 CANAL DE ANIONES DEPENDIENTE DE VOLTAJE (VDAC)

El canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC) es una proteína formadora de poros de 30 kDa ubicada en la membrana externa mitocondrial (MOM). Funciona como un poro no selectivo para aniones y cationes (29), responsable del intercambio de ellos entre el citosol y el espacio intermembrana de las mitocondrias, siendo importante para la regulación del intercambio de nucleótidos de adenosina, como ATP, ADP, NADH y NAD^+ (30).

3.3.1.3 TRANSPORTADOR DE NUCLEÓTIDOS DE ADENINA (ANT)

El translocador de nucleótidos de adenina (ANT) también forma parte de las proteínas esenciales de mPTP, este corresponde a un transportador de 32 kDa ubicado en la MMI, cuya principal función es el transporte de ADP a cambio de ATP hasta la matriz mitocondrial, es por ello que forma parte fundamental del sistema de síntesis de ATP (31). Esta proteína al igual que CypD también puede actuar como regulador de la apertura de

mPTP, debido a que hay distintas sustancias como el carboxiatractilato y ácido bongkreico, las cuales pueden estimular o inhibir la apertura de mPTP mediante la unión a ANT. Es un asociado de unión directa con CypD (23) y la reconstitución de ANT solo o en combinación con CypD y VDAC en proteolisosomas produce poros con características del mPTP (32).

3.3.1.4 PORTADOR DE FOSFATO INORGÁNICO (PiC)

El portador de fosfato inorgánico (PiC) es un portador de soluto de membrana interna, siendo el principal transportador de fosfato inorgánico (Pi) en la matriz mitocondrial (33). Tiene un rol clave en la fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS) y la producción de energía, ya que suministra mitocondrias con el Pi requerido para la síntesis de ATP (33). Además se reconoce que el Pi facilita la apertura del mPTP producto de la capacidad del PiC de alterar los niveles de Pi de la matriz, por lo tanto PiC se introdujo como un regulador de la muerte celular (34).

3.3.1.5 F₁ F₀ ATP SINTASA

La F₁ F₀ ATP sintasa (Complejo V) corresponde a un complejo enzimático de 600 kDa compuesto de múltiples subunidades que permite el transporte de protones a través de la MMI para la producción de ATP (35). Se caracteriza porque está organizado en una parte catalítica (F₁), otra zona donde se encuentra un dominio translocador de protones (F₀) y un tallo lateral que une F₁ F₀. En el caso de F₁ está conformado por 5 proteínas diferentes α , β , γ , δ y ϵ , con una relación de 3:3:1:1:1, respectivamente (36). Las tres subunidades α y las tres subunidades β están organizadas de forma alternada formando una bobina helicoidal alrededor de la subunidad γ , esta última se caracteriza porque sobresale del subcomplejo $\alpha_3\beta_3$ y en su parte inferior se encuentra en contacto con las subunidades δ y ϵ , además la subunidad γ interactúa con la subunidad c de la región F₀ (37). Por otro lado, el

dominio F_0 está constituido por las subunidades a o ATP6, b y c, todas asociadas a la membrana y pueden ser inhibidas por oligomicina. Estas dos proteínas son muy importantes ya que, ante la presencia de protones, el anillo c compuesto por 10 subunidades c comienza a rotar a favor de las manillas del reloj debido al flujo de H^+ , lo que permite el estímulo de la actividad catalítica de F_1 lo que induce la síntesis de ATP (38). Específicamente se ha revelado que la subunidad c de la F_0 ATP sintasa, es necesaria para la fragmentación mitocondrial, impulsada por el mPTP y la muerte celular provocada por la sobrecarga de calcio citosólico junto con el estrés oxidativo (19).

Otra de las subunidades de la $F_1 F_0$ ATP sintasa es el tallo lateral, este se caracteriza porque está formado por subunidades como OSCP que es una proteína que confiere sensibilidad a oligomicina, por lo tanto OSCP corresponde a una proteína que permite regular la actividad de la $F_1 F_0$ ATP sintasa mediante el uso de fármacos y además algunos autores han postulado que la ciclofilina D (CypD) tendría la capacidad de unirse a OSCP regulando la actividad de la $F_1 F_0$ ATP sintasa y en defecto de mPTP (39, 40). Otras subunidades proteicas que conforman el tallo lateral son b, d y F_6 (figura 2).

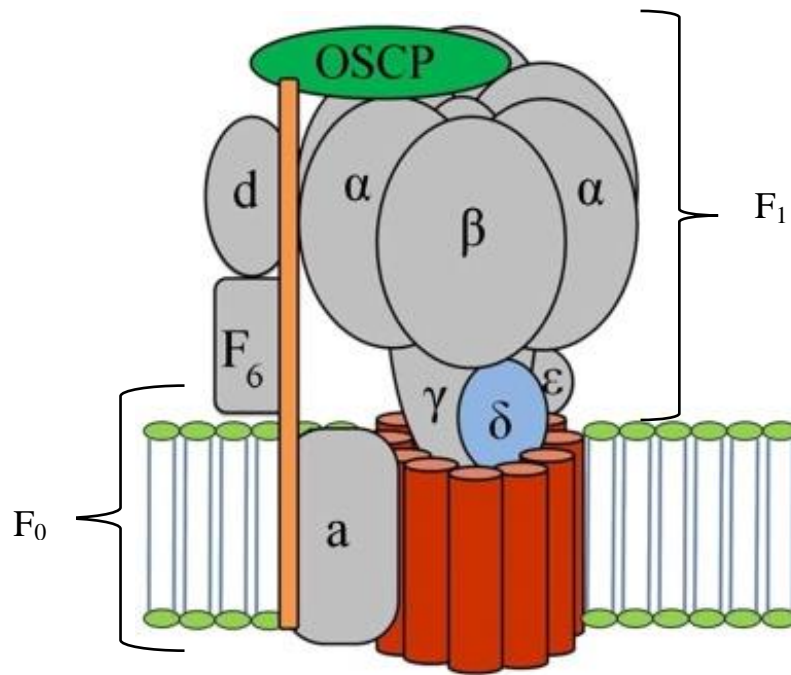


Figura 2. Subunidades de la F₁ F₀ ATP sintasa mitocondrial. Se observan los distintos componentes de la ATP sintasa mitocondrial, incrustado en la membrana plasmática podemos observar la región F₀ compuesta principalmente por el anillo c y la subunidad a, en la parte superior se observa la región F₁ donde se encuentran las subunidades α, β, γ, δ y ε que conforman el sitio catalítico de la ATP sintasa y a la izquierda podemos observar el tallo lateral compuesto por F₆, d y la OSCP que va a interactuar con CypD del mPTP (41). Tomado y adaptado de Lu (2014).

3.3.1.6 BAX/BAK

La proteína Bak pertenece a la familia de las Bcl-2 y tiene capacidad proapoptótica, por lo que ante condiciones celulares adversas como isquemia reperfusion, déficit de ATP, entre otros, Bax/Bak se oligomerizan lo que lleva a un aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, permitiendo la liberación de citocromo *c* y desencadenándose el proceso de apoptosis (42). Por otro lado, estas proteínas también se han asociado a la regulación de mPTP, principalmente a su capacidad para inducir la apertura prolongada del poro y posterior muerte celular, es más, diversos estudios

han demostrado que aquellas mitocondrias que carecen de Bax/Bak son resistentes a la apertura de mPTP, teniendo esto efectos cardioprotectores ante la lesión por isquemia reperfusión a nivel cardíaco (43). Por lo tanto, en resumen, Bax/Bak son imprescindibles para que la mitocondria vire a un proceso de inflamación y apoptosis.

3.3.2 MECANISMOS DE APERTURA DEL mPTP

Como ya se abordó anteriormente, el poro de permeabilidad mitocondrial cuenta con distintas subunidades que permiten regular su actividad, sin embargo, existen otros factores no proteicos, que en altas concentraciones a nivel mitocondrial y/o celular, pueden generar la apertura de mPTP. Entre ellos, el principal es la presencia de Ca^{+2} intracelular, pero más importante aún, los niveles de Ca^{+2} presentes en la matriz mitocondrial, debido a que esta última condición mejora de forma directa la actividad de la Isocitrato deshidrogenasa y la Alfacetoglutarato deshidrogenasa, favoreciendo la actividad metabólica del Ciclo de Krebs (17). Sin embargo, un aumento sostenido de altos niveles de calcio en la matriz mitocondrial va a generar una apertura prolongada de mPTP, lo que lleva una disfunción mitocondrial y muerte celular por la actividad sostenida de las proteínas pro apoptóticas Bax/Bak. Debido a esto, diversos autores sostienen que la homeostasis del Ca^{+2} a nivel mitocondrial es de suma importancia (44). Dentro de los mecanismos mitocondriales que regulan la homeostasis del Ca^{+2} encontramos el uniportador de calcio mitocondrial (UCM), el intercambiador mitocondrial $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ y el intercambiador mitocondrial $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ (45-47). Otros agentes que regulan de forma indirecta la homeostasis del calcio es la S-nitrosilación de proteínas, que actúan regulando el calcio a nivel celular. Entre estas proteínas encontramos la ATPasa de Ca^{+2} del retículo sarco/endoplásmico (SERCA), los canales tipo L y el receptor de rianodina (RyR2) (48). De este modo al S-nitrosilar estas proteínas se impide la hidrólisis de ATP por la ATP sintasa manteniéndose estables sus niveles por lo que esta reacción tendría un rol energético protector, además de prevenir la apoptosis (48). Cabe destacar la S-nitrosilación se abordará a cabalidad más adelante en conjunto con su rol en la homeostasis del calcio.

3.3.2.1 MECANISMOS MITOCONDRIALES DE MUERTE CELULAR DURANTE ISQUEMIA REPERFUSIÓN

Como se abordará más adelante, la apertura de mPTP puede darse debido a varios mecanismos y ser inducida por distintos elementos. Durante el proceso de isquemia-reperfusión ocurren una serie de procesos bioquímicos dentro de la mitocondria, esto comienza con la disminución en la concentración de oxígeno que genera la isquemia en los tejidos, posteriormente debido a esta hipoxia en la mitocondria, ocurre una detención en la actividad de la cadena transportadora de electrones, lo que produce una disminución en la concentración de ATP mitocondrial y un aumento en la actividad glucolítica con disminución de pH debido a un aumento en la producción de ácido láctico (49). Este aumento en el potencial de hidrógeno hace que se activen distintos mecanismos como el intercambiador H^+/Na^+ que permite disminuir la acidez del medio, sin embargo, esto conlleva al aumento de Na^+ lo cual posteriormente se compensa con un aumento del Ca^{+2} mediante la actividad de bomba Na^+/K^+ ATPasa y el intercambiador Na^+/Ca^{+2} (42). Este aumento del calcio de la matriz induce la activación de distintas enzimas proteolíticas como la calpaína que ataca las fibras cardiacas generando disfunción contráctil, además el aumento en el Ca^{+2} en conjunto con un aumento en la concentración de Pi generan la apertura del mPTP, provocando que una de las subunidades del poro que es la $F_1 F_0$ gire contra las manecillas del reloj produciendo la poca concentración de ATP en la matriz exacerbando aún más el déficit energético (figura 3).

Posteriormente, durante el proceso de reperfusión ocurren otros fenómenos como un aumento en el pH y un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno lo que es sumamente nocivo para la mitocondria y la célula cardíaca, por otro lado la concentración de calcio seguiría aumentando debido a la liberación de este por parte del retículo sarcoplásmico, lo que finalmente conlleva a la activación de las proteínas Bax/Bak, las cuales tienen actividad pro apoptótica activando la muerte celular del cardiomiocito a través de las distintas vías de la apoptosis (50) (figura 3).

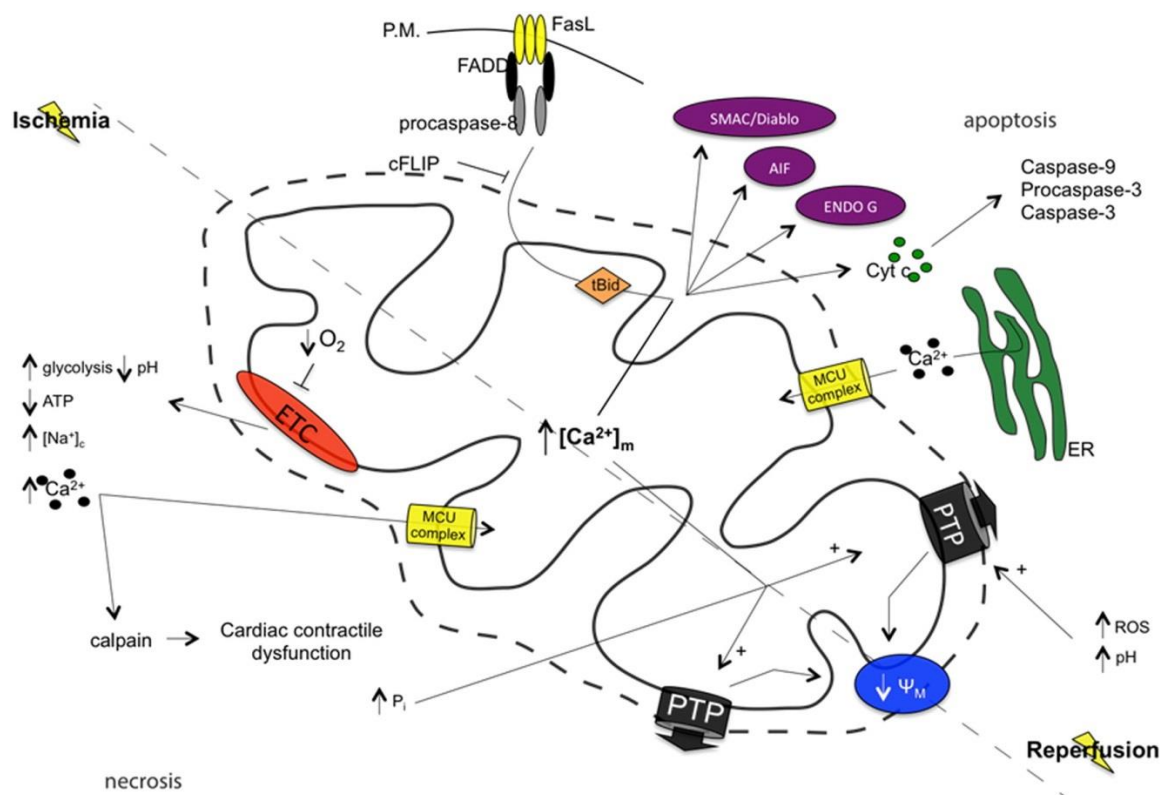


Figura 3: Mecanismos de muerte celular en mitocondrias durante isquemia-reperfusion. En el lado izquierdo, se observa el proceso de isquemia y al lado derecho se observa el proceso de reperfusion. En ambos procesos ocurren vías similares, donde en el caso de la isquemia debido a la baja de oxígeno, se detiene la actividad de la cadena transportadora de electrones produciendo efectos secundarios como aumento del glicólisis, aumento de Ca^{+2} , Na^{+} , Pi y disminución de ATP debido a la hidrólisis de este por parte de la ATP sintasa de mPTP. En el caso de la reperfusion, aumenta el pH, ROS, Ca^{+2} que conllevan a la activación de la apoptosis con posterior muerte celular (3). Tomado de Morciano (2015).

3.4 ÓXIDO NÍTRICO (NO)

El óxido nítrico (NO) corresponde a un importante mensajero celular que se caracteriza por ser el responsable de regular la homeostasis celular y tener un efecto vasodilatador a nivel de células endoteliales (51). El NO es un gas soluble que se sintetiza en diferentes células de mamíferos, como cardiomiocitos, neuronas, células endoteliales, entre otros, donde puede actuar como regulador autocrino, paracrino e incluso intracrino. Se caracteriza porque al ser de naturaleza gaseosa, atraviesa fácilmente las membranas celulares, es altamente reactivo por lo que su vida media es muy corta yendo de 1 a 10 segundos, por lo que algunos autores describen su efecto, como uno “in situ” (52).

3.4.1 SÍNTESIS DEL ÓXIDO NÍTRICO

La síntesis del NO se realiza en grandes proporciones en las células del sistema circulatorio, este proceso corresponde principalmente a una conversión metabólica que permite el paso desde L-arginina a L-citrulina más la producción de NO pasando por el intermediario N-hidroxi-L-arginina mediante la acción específica de la enzima Óxido nítrico sintasa (NOS), en presencia de cofactores como, flavin mononucleótido (FMN), flavin adenin dinucleótido (FAD), nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH) y tetrahidrobiopterina (BH₄), la formación de un complejo calcio calmodulina y un grupo Hem unido a la enzima (53).

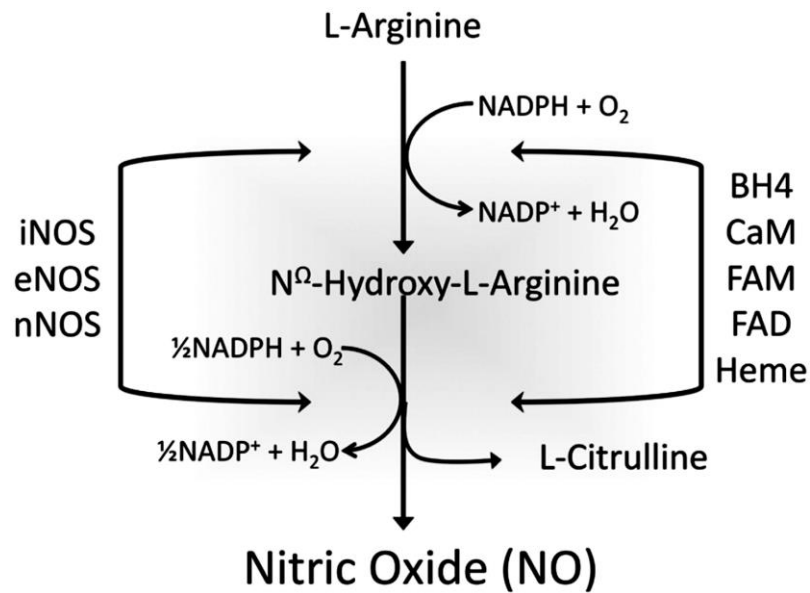


Figura 4: Síntesis del óxido nítrico. La formación de esta molécula se realiza a partir de L-arginina formando una especie intermediaria denominada N-hidroxi-L-arginina, la cual se transforma en L-citrulina y óxido nítrico (NO), utilizando moléculas como oxígeno y NADPH, además para la reacción se requieren cofactores como el FAD, BH₄, FMN, CaM y un grupo Hem asociado a la enzima (53). Tomado de Iyer (2014).

Respecto a la enzima NOS, esta se caracteriza porque presenta distintos dominios con actividad de reductasa y de oxigenasa. Hay varias isoformas, existen 2 constitutivas y se van a expresar tanto en vasos sanguíneos como en cardiomiocitos, estas son la isoforma endotelial (eNOS) y la isoforma neuronal (nNOS), respectivamente (54). También tenemos una NOS inducible (iNOS) que se puede detectar bajo distintos procesos que afectan la homeostasis celular, como cuadros inflamatorios donde las células se estresan, de hecho, es muy frecuente encontrar expresada esta isoforma en pacientes asmáticos.

En el caso de nNOS se le conoce también como NOS tipo I, tiene un peso molecular de 155 kDa, y su regulación está dada por la formación del complejo Ca²⁺/calmodulina, esta isoforma la podemos encontrar específicamente en neuronas, tanto del sistema nervioso central como periférico, neuroglías, islotes del páncreas y cardiomiocitos (55). Por otro

lado, tenemos a iNOS o NOS tipo II, esta isoforma tiene un peso de 125 kDa y su expresión es inducida por moléculas inflamatorias como citoquinas y endotoxinas, la podemos encontrar en macrófagos, hepatocitos, células musculares lisas, neutrófilos, entre otros. Por último, también tenemos a eNOS o NOS tipo III, la cual tiene un peso de 135 kDa, es regulada por Ca^{+2} /calmodulina y la podemos encontrar en el endotelio vascular, tejido renal y plaquetas. Así también es importante mencionar la presencia de una isoforma descubierta hace poco tiempo, denominada NOS mitocondrial (mNOS), la cual se ubicaría en la membrana interna de la mitocondria y produciría una señal localizada para la S-nitrosilación (SNO) de proteínas del interior de la mitocondria como las del mPTP, sin embargo, esto hasta el día de hoy no se acepta del todo (56).

3.4.2 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO

El NO se caracteriza porque puede actuar principalmente a través de dos vías de señalización: una de ellas es una reacción denominada S-nitrosilación, la cual se abordará en los próximos párrafos, pero que básicamente consiste en la unión del NO a grupos tiol (-SH) de las proteínas, modificando las características de estas (57). Por otro lado, la vía de señalización más conocida es la vía clásica, que se da mediante la producción de guanosín monofosfato cíclico (GMPC), en donde encontramos un receptor intracelular altamente descrito, denominado guanilil ciclasa soluble (GCs) sobre la cual se une un grupo hemo, activándola y aumentando la producción de GMPC lo que conlleva a la activación de una proteína quinasa G (PKG), lo que modula la actividad de enzimas fosfodiesterasas (58).

3.4.3 S-NITROSILACIÓN

La S-nitrosilación corresponde a una reacción mediante la cual se van a modificar de forma postraduccionalmente, los grupos tiol (-SH) de una proteína que contenga residuos de cisteína, formándose de esta forma un enlace covalente, lo que conllevará a producir que

las proteínas S-nitrosiladas sean menos susceptibles a distintos factores tóxicos para ellas mediante modificaciones transitorias en su actividad, ubicación y morfología, mejorando de este modo la sobrevivencia celular y evitando la oxidación por radicales libres (57).

3.4.3.1 S-NITROSILACIÓN DE PROTEÍNAS Y SU EFECTO CARDIOPROTECTOR

Tal como se mencionó anteriormente, la S-nitrosilación de proteínas corresponde a una modificación postraduccional de estas biomoléculas, haciendo que los residuos de Cys de estas no sean susceptibles a modificaciones oxidativas irreversibles. En la figura 4 podemos ver que las proteínas S-nitrosiladas pueden generar sus efectos beneficiosos mediante distintos procesos, por ejemplo: (A) al cambiar las características estructurales y funcionales de la proteína mediante la SNO de un grupo tiol activo, o bien (B) al proteger los residuos de Cys modificados por SNO de modificaciones irreversibles (X) que puedan generar algún daño en los tejidos. Otra forma de mediante la cual la SNO podría generar un efecto beneficioso sería a través de la interacción de la proteína S-nitrosilada con otras proteínas (C) (59).

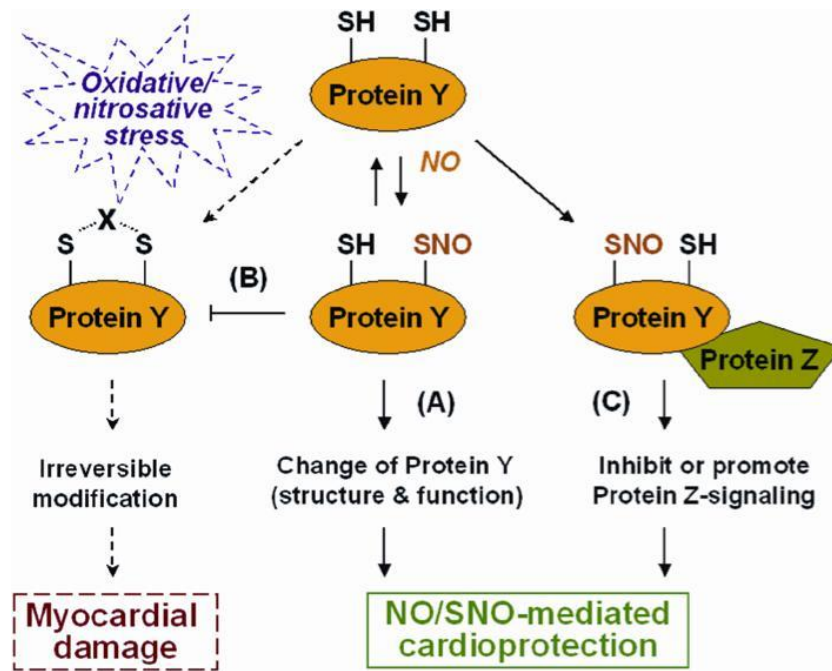


Figura 5: Posibles mecanismos de cardioprotección mediante SNO. Las proteínas S-nitrosiladas podrían proteger las células cardiacas mediante cambios morfológicos y funcionales. (A) al cambiar las características estructurales y funcionales de la proteína mediante la SNO de un grupo tiol activo, o bien (B) al proteger los residuos de Cys modificados por SNO de modificaciones irreversibles (X) que puedan generar algún daño en los tejidos. Otra forma de mediante la cual la SNO podría generar un efecto beneficioso sería a través de la interacción de la proteína S-nitrosilada con otras proteínas (C) (54). Tomado de Sun (2010).

Profundizando más en esta temática, es sumamente importante recalcar la importancia que se le ha dado a la SNO, como un agente cardioprotector, específicamente al actuar sobre proteínas específicas del citoplasma y la mitocondria de los cardiomiocitos; de hecho se ha descrito que el preconditionamiento isquémico actúa como un proceso endógeno de protección miocárdica y consiste en períodos cortos de isquemia que permiten que el tejido cardíaco se vuelva resistente a procesos de isquemia-reperfusión futuros y más prolongados (60). Desde aquí nace la propuesta de que este preconditionamiento produciría un aumento de la SNO de distintas proteínas del cardiomiocito tal como se muestra en la tabla 1, lo que conllevaría a generar este efecto cardioprotector. Es importante recalcar que

dentro de las proteínas que sufrirían de SNO a nivel mitocondrial encontraríamos la $F_1 F_0$ ATP sintasa perteneciente al mPTP, que nos lleva al motivo de esta memoria que sería evaluar la actividad de la SNO sobre esta proteína del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (61).

Tabla 1: Posibles efectos cardioprotectores de la SNO de proteínas (54).

Proteínas S-nitrosiladas	Efectos cardioprotectores de la S-nitrosilación
1. Manejo de calcio intracelular	
Canales de calcio tipo L	Se inhiben y se reduce la entrada de calcio bajo estrés oxidativo
SERCA	Incrementa la captura de calcio por el retículo sarcoplásmico (RS) y lo reduce en el citosol
RyR2	Incrementa la captura de calcio por el RS y lo reduce en el citosol
2. Proteínas mitocondriales	
$F_1 F_0$ ATP sintasa	Se inhibe su actividad y conserva el ATP
A-KGDH	Se previene su inhibición durante el IR
Complejo I	Se inhibe su actividad y atenúa la generación de ROS durante IR
Citocromo C oxidasa	Se inhibe su actividad y decrece el consumo de oxígeno
Creatin Kinasa	Se inhibe su actividad y se suprime la contractibilidad bajo estrés
3. Efectos antiapoptóticos y antioxidantes	
Caspasa-3	Se inhibe su actividad, efecto antiapoptótico
COX 2	Incrementa su actividad
HIF-1 α	Provoca estabilización en condiciones normóxicas, actúa en IR
NADPH oxidasa	Inhibe su actividad y suprime la producción de ROS

GRK2	Efecto antiapoptótico
Tiorredoxina	Incrementa su actividad reductasa, efecto antiapoptótico
4. Tráfico de proteínas: mecanismos de señalización y transducción	
Dinamina	Promueve la endocitosis y genera efectos antiapoptóticos
NSF	Inhibe la exocitosis y provoca efectos antiinflamatorios
β Arrestina 2	Promueve la endocitosis y la internalización de los receptores β adrenérgicos

El efecto S-nitrosilante que se genera sobre la $F_1 F_0$ ATP sintasa tal como se describió anteriormente generaría un efecto cardioprotector, debido a que la SNO inhibiría y/o reduciría la hidrólisis de ATP. En condiciones de isquemia, la $F_1 F_0$ ATP sintasa privilegia el modo inverso usando la energía disponible para ingresar Ca^{+2} al interior de la mitocondria, es por ello que la inhibición de esta proteína durante la isquemia sería beneficiosa para el cardiomiocito, pues se mantendrían los niveles de ATP citosólico y se reduciría la absorción de Ca^{+2} por la mitocondria, permitiendo que la $F_1 F_0$ ATP sintasa durante procesos isquémicos transitorios pueda recuperar su actividad (60).

3.4.4 TÉCNICA DE DETECCIÓN DE S-NITROSILACIÓN (BIOTIN SWITCH)

Existen numerosas técnicas para la detección de s-nitrosotioles, sin embargo, estos se caracterizan porque son altamente inestables debido al enlace entre los átomos de nitrógeno y azufre, lo que genera que esta unión tenga una alta tendencia a sufrir descomposiciones fotolíticas para formar NO y radicales tiilo ($RS\cdot$) ante factores ambientales, agentes reductores, temperaturas elevadas y exceso de luminosidad (62). Las técnicas más utilizadas para la detección de SNO, son aquellas conocidas como basadas en NO que se caracterizan porque detectan el NO liberado de la unión S-NO. Dentro de este grupo de

técnicas encontramos al menos 5 métodos que se caracterizan por ser los más usados, aquí encontramos la quimioluminiscencia, los métodos colorimétricos/fluorimétricos, la electroquímica/amperométrica los cuales se clasifican como métodos indirectos y se destacan porque detectan productos de descomposición de s-nitrosotioles como radicales NO o NO⁺ y los métodos directos donde encontramos la espectrometría de masas y los anticuerpos anti-s-nitrosocisteína (63) (figura 6).

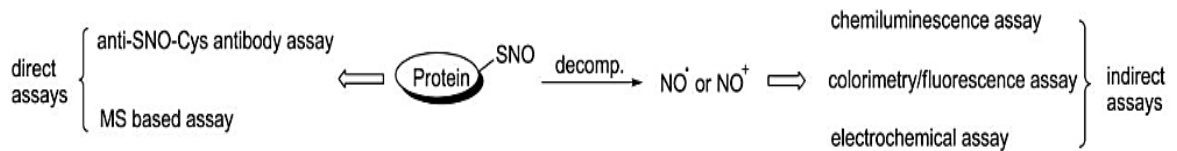


Figura 6: Métodos comunes para la detección de SNO (63). Tomado de Wang (2011).

3.4.4.1 BIOTIN SWITCH

El método del biotin switch, conocido también como interruptor de biotina o técnica de cambio de biotina, fue propuesto por primera vez por Jaffrey y col. (2001) (64). Esta técnica ha sido altamente utilizada para detectar y aislar proteínas s-nitrosiladas desde extractos celulares, este método se caracteriza porque consta de tres pasos o etapas que permiten el reconocimiento de los s-nitrosotioles y su posterior marcaje con conjugados de biotina. La primera etapa también conocida como etapa de bloqueo, se caracteriza porque los tioles libres de los residuos de cisteína de una o varias proteínas son sometidos a un proceso de metilolación con s-metilsulfonato de metano (MMTS), esta etapa se inicia mediante la adición de dodecil sulfato de sodio (SDS), seguido de un calentamiento a 50°C lo que permite la desnaturalización de las proteínas y la separación del exceso de estas con MMTS a través del uso de acetona como método de precipitación (figura 7).

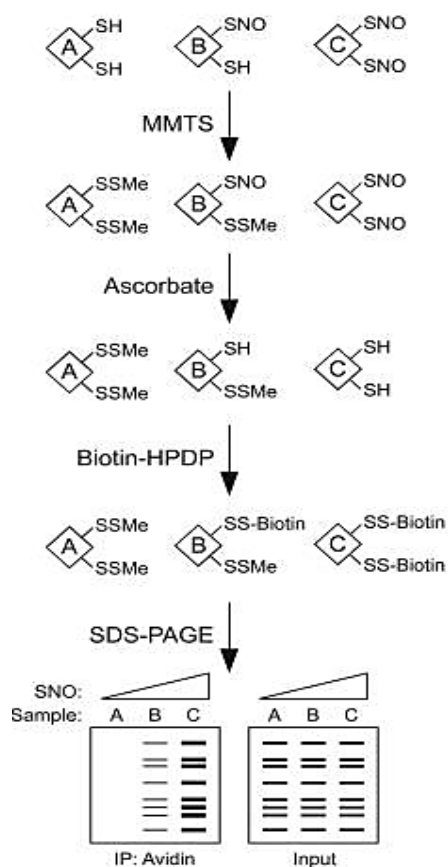


Figura 7: Descripción general de la técnica de biotin switch. En la figura se pueden observar tres lisados de tejidos con distintos grados de S-nitrosilación. En la primera etapa denominada bloqueo, ocurre un proceso de S-metililación de cada residuo de cisteína, específicamente de su grupo tiol con MMTS. Posteriormente, el ascorbato transforma cada s-nitrosotiol en un tiol libre, el cual posteriormente será biotinilado por la acción de la biotina-HPDP. Estas proteínas posteriormente son enriquecidas con medios que contengan avidina para luego analizarlas mediante técnicas como Western blot o espectrometría de masas (65). Tomado de Forrester (2009).

El segundo paso llamado también etapa de reducción-marcaje consiste en la conversión de los s-nitrosotioles en tioles libres para que puedan ser reconocidos por la biotina, lo cual se consigue al permitir que el ascorbato experimente una transnitrosilación con la proteína s-nitrosilada, lo que permite la obtención de un tiol libre y de o-nitrosoascorbato (65). La tercera etapa del método consiste en la biotinilación de los grupos tiol obtenidos en la etapa

anterior, es de importancia que esta etapa se realice de forma casi simultánea con la etapa anterior, pues es de importancia que todos los grupos tiol generados por la acción del ascorbato sean inmediatamente biotinilados a través del uso de biotina HPDP (biotina HPDP (N-[6-(biotinamido) hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)-propionamide)), cuyo exceso es precipitado por la acción de acetona fría. Posteriormente se evalúa el nivel de biotinilación a través de técnicas de detección de proteínas, donde el uso de estreptavidina agarosa es una de las técnicas más utilizadas para la detección a través de Western blot o espectrometría de masas (63, 65).

3.4.5 S-NITROSOGLUTATIÓN REDUCTASA

La enzima S-nitrosoglutación reductasa (GSNOR), conocida también como alcohol deshidrogenasa de clase III, es un importante regulador de la salud y la enfermedad humana. Su función es remover los grupos NO de los tioles de cisteína en proteínas. Influye en varias vías descendentes y paralelas, es una enzima dependiente de NADH con capacidad para oxidar alcoholes de cadena media, controla los niveles intracelulares de S-nitrosotioles y de reducir la S-nitrosoglutación (GSNO) y por extensión, el óxido nítrico (66). GSNO se reduce mediante GSNOR utilizando NADH como cofactor para producir hidroxi-metil-glutación (GSNHOH) que puede reaccionar con glutación reducido (GSH) para producir glutación oxidado (GSSG). Descompone la S-nitrosoglutación citosólica, en última instancia, a GSH oxidado y amoníaco. A su vez, modula los niveles de algunas proteínas S-nitrosiladas. Los dos objetivos principales de GSNOR son GSNO y HMGS, el aducto espontáneo de formaldehído y glutación. No está optimizado para metabolizar alcoholes de cadena corta, si no que actúa más fácilmente sobre los alcoholes de mayor longitud (67).

GSNOR tiene un peso molecular de 39.724 Daltons y se traduce a una enzima de 374 aminoácidos a través de 9 exones (68). Funciona como un homodímero, es decir, que está compuesto por dos cadenas peptídicas idénticas, y se localiza en el núcleo y citoplasma

(69). Es un importante regulador negativo de la diferenciación neuronal durante el desarrollo y es la única enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) presente en el cerebro (70). Por el contrario, GSNOR es despreciable o inexistente en el músculo esquelético, los ganglios linfáticos, el bazo, la médula ósea, el cerebelo y el ventrículo lateral (67).

3.4.5.1 INHIBICIÓN DE LA S-NITROSOGLUTATIÓN REDUCTASA

La desregulación de GSNOR puede iniciar o exacerbar muchos estados de enfermedad. Esto se debe en parte a la función indirecta de GSNOR como un modulador de S-nitrosotiol, así como a su capacidad para mediar la señalización canónica de células a través del metabolismo de GSNO. Los inhibidores de GSNOR se están investigando activamente para tratar ciertos trastornos en los que sería beneficioso aumentar la disponibilidad de NO (67).

Uno de los órganos principales afectado por GSNOR es el corazón y la vascularización circundante. Se conoce desde hace mucho tiempo que la NO y la S-nitrosilación protegen al cuerpo de las enfermedades cardiovasculares. Por esto GSNOR es un objetivo terapéutico atractivo, ya que la inhibición de esta enzima aumenta la disponibilidad de GSNO en la célula y, a su vez, facilita las vías de señalización mediadas por el NO (67). Estudios han indicado que después de un infarto al miocardio, ratones que son deficientes del gen que codifica la enzima GSNOR, exhiben capacidades regenerativas cardíacas mejoradas como resultado del aumento de la rotación de las células madre cardíacas (71), así como una reducción en el tamaño del infarto al miocardio y una mayor densidad vascular coronaria (72).

3.5 ENZIMAS CARDÍACAS

Durante el proceso de isquemia reperusión y los procesos que produzcan una injuria en el tejido cardiaco se liberan a la sangre distintos biomarcadores que son indicativos de daño en el tejido cardiaco entre ellos troponina t, creatina kinasa, lactato deshidrogenasa, etc. siendo los más utilizados los dos últimos.

3.5.1 LACTATO DESHIDROGENASA

La proteína lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima catalizadora presente en tejidos como corazón, hígado, riñones, músculos, glóbulos rojos, cerebro y pulmones. Cataliza la oxidación reversible de L-lactato a piruvato, empleando NAD^+ . Su número EC es 1.1.1.27, lo cual indica su primer número que es una oxidoreductasa, es decir, que cataliza reacciones de óxido/reducción, el segundo y tercero indican que actúa sobre el grupo de donantes CH-OH con NAD^+ o NADP^+ como aceptador.

Es una proteína de elevado peso molecular, de 134 kDa, con una estructura de tetrámero formado por dos tipos de subunidades codificadas por genes diferentes; H y M. Se considera una de las primeras enzimas de las cuales se encontró que tenían isoenzimas, que en tejidos vertebrados, existen al menos cinco isoenzimas diferentes que se numeran por su velocidad de migración electroforética; LDH-1 (HHHH), LDH-2 (HHHM), LDH-3 (HHMM), LDH-4 (HMMM), LDH-5 (MMMM) (73). Todas las isoenzimas de la LDH contienen cuatro cadenas polipeptídicas, y cada tipo contiene una porción diferente de dos clases de polipéptidos (74).

En el músculo esquelético la isoenzima predominante contiene cuatro cadenas M, mientras que en el corazón el predominante contiene cuatro cadenas H que se caracteriza

por ser termoestable e inhibirse por niveles elevados de piruvato. Las diferencias en el contenido de isoenzimas de los tejidos se pueden utilizar para evaluar el momento y extensión de una lesión cardíaca debida a un infarto al miocardio. Por consiguiente, la lesión de los tejidos cardíacos da lugar a la liberación de LDH del corazón a la sangre. Después de un infarto al corazón, la concentración total de LDH sanguínea aumenta, habiendo más LDH-2 que LDH-1 las que son isoenzimas localizadas en el corazón y eritrocitos. Transcurridas 12 horas, las cantidades de LDH-1 y LDH-2 son muy similares y después de 24 horas hay más LDH-1 que LDH-2. Este cambio junto con el aumento en sangre de la enzima creatina quinasa, son prueba muy importante de la existencia de un infarto al miocardio reciente (74).

3.5.2 CREATINA QUINASA

La creatina quinasa (CK) es una enzima citosólica asociada con las estructuras miofibrilares que cataliza la fosforilación de creatina empleando Mg^{+2} y forma un compuesto de alta energía para la contracción muscular. La creatina fosfato es el principal compuesto fosforilado del músculo, que es un depósito de energía. Cuando el músculo se contrae, se consume ATP y la CK cataliza la refosforilación del ADP a expensas de la energía almacenada como creatina fosfato (73).

Su número EC es 2.7.3.2, indicando el número 2 que corresponde a una transferasa, es decir, transfiere un grupo funcional desde una sustancia a otra, pudiendo ser un grupo metil-, acil-, amino-, o fosfato. Por otra parte, los números 7 y 3 siguientes indican que, como se menciona anteriormente, permiten la transferencia de grupos que contienen fósforo, y que son fosfotransferasas con un grupo nitrogenado como aceptor. Se considera que la creatina quinasa es la primera enzima cardíaca que aparece en la sangre luego de un infarto al miocardio, también desaparece muy rápidamente de la sangre (73).

Es una enzima dimérica compuesta por dos tipos de subunidades monoméricas de 41 kDa, la M (muscular) y la B (cerebral), las cuales se combinan para formar tres isoenzimas creatina quinasa diferentes; CK-1 (CK-BB), CK-2 (CK-MB) y CK-3 (CK-MM). La CK tiene una elevada actividad en el músculo estriado, en el cerebro y en el corazón y mucho menor en tiroides, placenta, aparato gastrointestinal, riñón, próstata y el bazo. La porción principal de la actividad de la CK se encuentra en el músculo esquelético en donde predomina la CK-MM, constituyendo más del 97% y el 3% de la actividad restante es CK-MB. También se encuentra el tejido cardíaco en la cual la actividad CK-MM constituye el 78% y la actividad CK-MB representa el 22% restante, mientras que en el tracto gastrointestinal y el cerebro, la isoforma que predomina es CK-BB (73).

Particularmente la isoforma CK-MB tiene la función de que, en valores anormales permite identificar un daño cardíaco, especialmente un infarto agudo al miocardio, combinado con un electrocardiograma y el estudio de troponinas. Además, existe una CK mitocondrial (CKmt) que se localiza en la membrana interna de la mitocondria. Esta enzima difiere de las demás desde el punto de vista inmunológico y puede representar hasta el 15% de la actividad en el corazón (73).

Las lesiones cardíacas como infarto agudo al miocardio, cirugía o miocarditis, producen un incremento de CK, aunque normalmente éste es menor que en el caso de las lesiones musculares. En cambio, producen la mayor elevación de la enzima CK-MB y de su porcentaje respecto a la actividad CK total (73).

4. HIPÓTESIS

La inhibición farmacológica de la S-nitrosoglutación reductasa se asocia con aumento en la S-nitrosilación en corazones de rata sometidos a isquemia reperusión.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la S-nitrosilación en tejido cardíaco sometido a isquemia reperusión.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar el efecto de una droga inhibidora de GSNOR, sobre tejido cardíaco sometido a isquemia reperusión.
- Evaluar el nivel de S-nitrosilación mediante la técnica del biotin switch en proteínas mitocondriales de corazones sometidos a isquemia reperusión.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MODELO ANIMAL

Para el estudio experimental se utilizaron ratas hembra de la cepa Sprague Dawley de 3-6 meses de edad, destinadas a descarte, las cuales fueron obtenidas desde el bioterio de la Universidad de Talca. Estos ejemplares fueron criados con una dieta en base al alimento para ratas de laboratorio Rat Diet 5012 de la marca LabDiet. Se formaron dos grupos, uno control (n=3) y otro (n=3) que fue sometido durante el estudio a los efectos de un inhibidor de GSNOR. Es de importancia mencionar que estos animales fueron criados y mantenidos de acuerdo a los estándares de bioseguridad y bioética establecidos por la Dirección de Investigación de la Universidad de Talca (CIECUAL) (75).

6.2 SACRIFICIO DE LAS RATAS

Para el sacrificio de cada rata, estas fueron introducidas en un recipiente cerrado, de tamaño similar al de su jaula, en el interior de este contenedor se depositó un algodón impregnado con isoflurano concentrado (Baxter Healthcare Inc). Una vez que la rata fue ingresada dentro de esta caja, se mantuvo en el interior por 4 a 5 minutos, el efecto sedante del isoflurano comenzó a evidenciarse por el movimiento errático del roedor al interior de la caja, hasta que por último este se sedó completamente cesando su movimiento. Luego rápidamente se procedió a administrar 1 ml/kg de tiopental sódico (anestésico) de uso veterinario Opet® y 0,3 ml/kg de heparina sódica (anticoagulante) Laboratorio Biosano, por vía intraperitoneal mediante la utilización de una jeringa con aguja 23G, con previa asepsia de la zona utilizando alcohol 70°, la evaluación del estado de conciencia se realizó mediante el reflejo otopodal del animal.

Posteriormente se procedió a pesar al animal, para ello se introdujo dentro de un vaso de precipitado el cual se encontraba previamente llevado a 0 gramos sobre la balanza. Una vez registrado el peso se llevó al animal hasta el mesón de incisiones donde se encontraba todo el material quirúrgico necesario para la extracción del corazón. El procedimiento comenzó con la asepsia de la zona toracoabdominal de la rata usando alcohol 70°, para posteriormente mediante la utilización de una pinza y una tijera quirúrgica retirar la piel de la zona abdominal, de este modo, luego se realizó una segunda incisión que permitió la apertura de la zona abdominal y la zona torácica dejando la rata a corazón abierto. Para la extracción de este se procedió a utilizar pinzas y tijeras de un menor calibre, para facilitar y hacer más preciso el corte de la aorta debido a que el corazón más tarde debió ser canulado a nivel de esta arteria.

6.3 RETROPERFUSIÓN DEL CORAZÓN DE RATA

Una vez que se extrajo el corazón se procedió a lavarlo rápidamente en 2 recipientes que contenían una solución de suero fisiológico, luego el corazón fue conectado a través de la arteria aorta a una cánula de perfusión retrógrada, con la precaución de no romper o atravesar la válvula aórtica. De este modo, una vez conectada la cánula a la arteria a través de un clamp, se procedió a fijar el corazón con ligaduras de hilo Cadena de aproximadamente 10 centímetros cada uno, se procedió a ocluir a través de una sutura la zona contigua a la aorta, permitiendo la estabilización de la presión de los ventrículos. Previo a la conexión del corazón con la cánula del sistema, este se encontraba libre de burbujas, a 37°C y siendo perfundido por buffer Krebs (compuesto por 6,92 g de NaCl, 0,35 g de KCl, 0,14 g de MgSO₄, 0,16 g de KH₂PO₄, 1,98 g de glucosa, 0,27 g de CaCl₂, 2,1 g de NaHCO₃ y 0,146 g de EDTA, para 1 litro de solución), además esta solución se encontraba siendo burbujeada por una mezcla de 95% de O₂ y 5% de CO₂ (el proceso desde la extracción del corazón hasta el inicio de la perfusión no debe extenderse por más de 3 minutos) (figura 8).

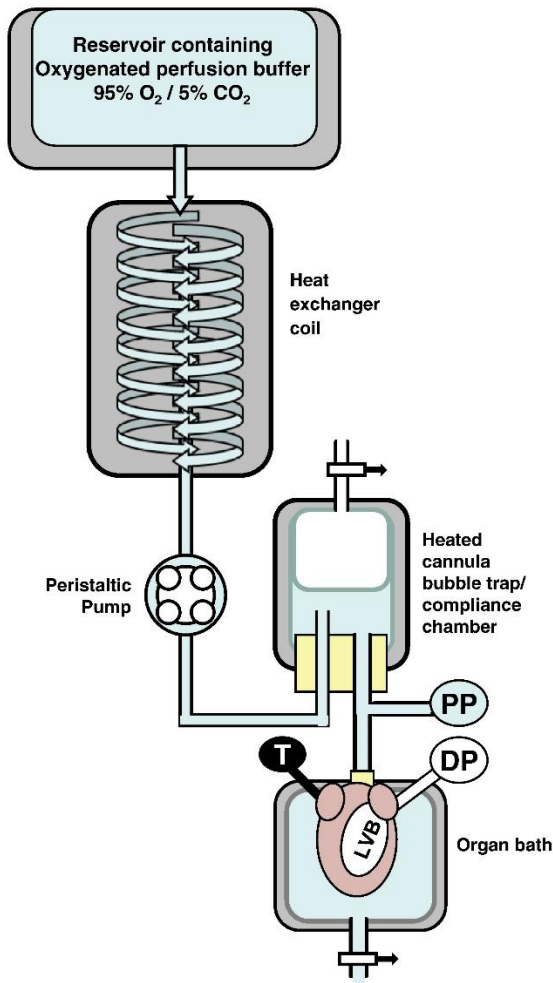


Figura 8. Sistema de retroperfusión. Este sistema permite la canulación de un corazón a través de la arteria aorta, a través de la cual se perfunde retrógradamente un buffer oxigenado a temperatura y presión constante, además se pueden usar transductores de presión (LVP) para medir la presión desarrollada al interior de los ventrículos y otros parámetros como presión de perfusión (PP) (76). Tomado de Bell (2011).

También es importante mencionar que en el grupo experimental durante esta etapa se incorporó al buffer Krebs un inhibidor de GSNOR cuya nomenclatura es ácido 5-cloro-3-(2-[4-etoxifenil](etil)amino]-2-oxoetil)-1H-indol-2-carboxílico y fue obtenido desde Chem DiV, San Diego, CA, EEUU Compound ID:C289-0424. Este inhibidor se utilizó a una concentración final de 1 μ M disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) (figura 9).

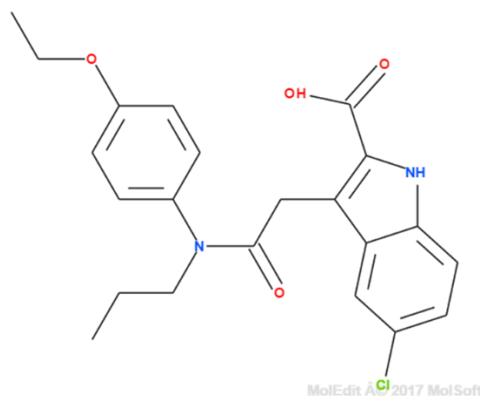


Figura 9: Inhibidor de GSNOR (ácido 5-cloro-3-(2-[4-etoxifenil](etil)amino)-2-oxoetil)-1H-indol-2-carboxílico).

Una vez iniciada la perfusión se procedió a eliminar los restos de tejidos adyacentes al corazón como restos de pulmón, para posteriormente realizar una incisión eliminando la orejuela izquierda, por donde luego se introdujo un balón de film plástico adherente ALUPLAST® con el motivo de medir la presión intraventricular, todas las variables cuantificadas durante este procedimiento se obtuvieron mediante el software *LabChart Reader versión 8.1 (University of Aucklan, USA)*. Respecto a los ciclos de estudio, se realizaron tres, primero se sometió al corazón de rata a 15 minutos de perfusión donde se tomaron 4 muestras del líquido de perfusión en tubos Eppendorf, una a los 0, a los 5, a los 10 y 15 minutos, posteriormente se sometió el corazón a una isquemia de 45 minutos, para ello se detuvo el flujo de buffer Krebs y la oxigenación de este, para así finalmente pasado este tiempo se indujo una reperfusión restaurando el flujo de líquido de perfusión y la oxigenación de este por 60 minutos, durante este proceso se tomaron 5 muestras con 15 minutos de diferencia entre cada una, es importante mencionar que todas las muestras tomadas en el proceso fueron almacenadas a 4°C. Posteriormente, terminado el proceso se procedió a desmontar el sistema, rescatando el corazón y pesándolo, el cual después se almacenó dentro de un tubo de plástico para posteriormente mantenerlo a -80°C para luego ser utilizado en procedimientos posteriores.

6.3.1 DETERMINACIÓN DE LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)

Para la valoración de esta enzima, se utilizó el kit *LDH SCE mod.* de HUMAN, Wiesbaden, Germany. Este método se caracteriza porque evalúa la actividad de esta enzima, a través de la transformación de piruvato en lactato, este kit presentaba dos reactivos, un buffer o BUF (compuesto por buffer TRIS 62,5 mM pH 7,35, piruvato 1,5 mM y azida de sodio 0,095%) y también un substrato o SUB (compuesto por NADH 0,75 mM y azida de sodio 0,095%), los reactivos se encontraban almacenados a 4°C y protegidos de la luz. Para la determinación se preparó el reactivo de trabajo (RT), mezclando 4 partes de BUF más 1 parte de SUB en un tubo Falcon, la cantidad de reactivo de trabajo a preparar siempre dependió directamente del número de muestras a analizar, teniendo la precaución de siempre dejar un volumen excedente razonable para no aspirar burbujas. Con respecto a la relación entre el reactivo de trabajo y la muestra esta era de 2 µl de muestra más 200 µl de reactivo de trabajo, es importante mencionar que tanto el RT como la muestra antes de la medición deben estar temperadas a 37°C. Una vez cargada las muestras y los reactivos, se procedió a agitar la placa de lectura por 1 minuto para después realizar 4 lecturas a cada muestra, a los 0, 1, 2 y 3 minutos. Para esto se utilizó el espectrofotómetro de microplacas *Thermo Scientific™ Multiskan™* donde la determinación se realizó a 340 nm con agitación moderada entre lecturas, para el cálculo de la actividad enzimática se calculó el ($\Delta A/\text{min}$) de cada muestra y este valor se multiplicó por 16030 que corresponde al factor descrito en el inserto, de este modo se obtuvo la actividad enzimática en U/l.

6.3.2 DETERMINACIÓN DE CREATIN KINASA (CK)

Para la determinación de CK se utilizó el kit *CK NAC liquiUV*, de HUMAN Wiesbaden, Germany. El kit cuenta con dos reactivos, uno que contiene enzimas o ENZ (compuesto por buffer imidazol 125 mM, pH 6,2, glucosa 25 mM, acetato de magnesio 12,5 mM, EDTA

2,5 mM, AMP 6,25 mM, N-acetilcisteína 0,25 mM, NADP 2,5 mM, pentafofosfato de diadenosina 12,5 μ M, hexosa quinasa ≥ 5 U/ml, estabilizador de SH 31,25 mM, azida de sodio 0,095%) y otro que es el substrato o SUB (compuesto por ADP 10 mM, glucosa 6 fosfato deshidrogenasa ≥ 14 U/ml, creatina fosfato 150 mM, azida de sodio 0,095%), los reactivos antes de su uso se mantuvieron almacenados a 4°C. De acuerdo al protocolo establecido se constituyó un reactivo de trabajo (RT) conformado por 1 parte de SUB y 4 partes de ENZ, el volumen de RT dependió directamente del número de muestras a procesar, buscando siempre dejar un excedente razonable para evitar el aspirado de burbujas tal como se hizo con LDH. Posteriormente se procedió a cargar la microplaca con las muestras, para ello se cargaron en cada pocillo 5 μ l de muestra más 200 μ l de RT, tanto la muestra como el RT fueron pre-incubados a 37°C, posteriormente se incubó la placa por 5 minutos a 37°C y luego se realizó la determinación en el espectrofotómetro de microplacas *Thermo Scientific™ Multiskan™* donde la determinación se realizó a 340 nm con agitación moderada entre lecturas, con mediciones de absorbancia a los 0, 1, 2 y 3 minutos. Para el cálculo de la actividad enzimática se calculó el ($\Delta A/\text{min}$) de cada muestra y este valor se multiplicó por el factor 6508 para finalmente obtener la actividad enzimática en U/l.

6.4 OBTENCIÓN DE HOMOGENEIZADOS DE CORAZÓN DE RATA

Para la obtención de estos homogeneizados, se sometió a todos los corazones previamente almacenados a -80 °C a descongelamiento en hielo. Una vez descongelados, se procedió a obtener pequeños cortes desde la zona ventricular de cada corazón. Una vez obtenidos los cortes de corazón se procedió a depositarlos dentro de un tubo Khan con 3 ml de buffer HENS pH 8.0 (compuesto por HEPES 100 Mm, EDTA 1 mM, neocuproína 0,1 mM y SDS 1%) y 10 μ l de inhibidor de proteasas PIERCE™, cada uno. Luego se procedió a macerar los cortes de cada corazón contenidos en el buffer con ayuda del homogeneizador IKA® T10 basic ULTRA TURRAX a 4°C, hasta moler completamente los tejidos cardíacos y obtener una solución homogénea, de este modo posteriormente se procedió a separar 1,5 ml de cada homogeneizado en tubos Eppendorf, donde posteriormente se

centrifugaron dichos tubos a 800 rpm por 7 minutos obteniéndose un sobrenadante turbio (homogeneizado de corazón), el cual se rescató para estudios posteriores almacenándose a -80°C .

6.5 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Para esta determinación, se utilizó los homogeneizados obtenidos anteriormente luego de que los corazones se sometieran a retroperfusión, para ello se utilizó el kit comercial Ensayo de Proteínas BCATM *Thermo Scientific Pierce*TM Rockford, USA. Este método se basa en la reducción del cobre de su estado cúprico (Cu^{+2}) a cuproso (Cu^{+1}) en un medio de pH alcalino, proceso conocido como reacción de Biuret, permitiendo la detección selectiva del catión Cu^{+1} mediante la acción del ácido bicinconínico (BCA), de este modo la reacción tiene un color púrpura, el que se forma debido a la interacción del complejo BCA con un ion Cu^{+1} el cual absorbe a 562 nm y la intensidad depende de la temperatura, tiempo, pH y obviamente la concentración de la muestra. En primer lugar, se debió preparar una curva de calibración a partir de un estándar que viene incluido en el kit comercial, el cual tiene una concentración de 2000 μg de albumina/ml, para ello se procedió a realizar distintas diluciones del estándar en suero fisiológico, en un volumen de muestra de 25 μl , de modo tal que estas estuvieran dentro de la linealidad establecida por el método, que iba desde 25 a 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

En el caso de las muestras de corazón estas fueron procesadas de la misma forma que la curva de calibración para ello se procedió primeramente a preparar el reactivo de trabajo el cual consiste en 50 partes de reactivo A (compuesto por carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, reactivo de detección BCA *Pierce*TM, tartrato de sodio en hidróxido de sodio 0,1N) y 1 parte de reactivo B (compuesto por Blue Cooper AS). Una vez preparado el reactivo se procedió a cargar 25 μl de las muestras diluidas 1:20 con suero fisiológico en microplacas de Elisa, posteriormente se añadió 200 μl de reactivo de trabajo a cada pocillo, donde posteriormente se agitó la placa manualmente por 30 segundos y luego en conjunto con un

cubre placa se almacenó dentro de un baño termorregulado a 37°C por 30 minutos. Pasado el tiempo se procedió a medir la absorbancia de las muestras con la ayuda del espectrofotómetro de microplacas *Thermo Scientific™ Multiskan™* donde la determinación se realizó a 562 nm y las absorbancias obtenidas fueron interpoladas en la curva de calibración obtenida mediante el mismo método.

6.6 ENSAYO PARA DETECCIÓN DE S-NITROSILACIÓN DE PROTEINAS

Para la realización de este ensayo se empleó el protocolo sugerido por el kit de detección de proteínas S-nitrosiladas “*Biotin Switch*” *Cayman chemical®*, para ello previamente se descongelaron en hielo los homogeneizados cardíacos almacenados a -80°C.

6.6.1 FASE DE BLOQUEO

Una vez descongelados los homogeneizados se procedió a preparar el reactivo correspondiente a la primera etapa del método (bloqueo), para ello se procedió a diluir un vial de bloqueo con 100 µl de dimetilformamida (DMF), posteriormente se procedió a añadir al vial 900 µl de buffer A pH 7,6 (compuesto por HEPES 250 mM, EDTA 1 mM, SDS 1% y CHAPS), después se procedió a tomar 1 ml del vial reconstituido y se diluyó en 9 ml de buffer A, de este modo se obtuvo el buffer A de bloqueo.

Una vez descongelados los homogeneizados de corazón se procedió a preparar diluciones de cada muestra a 1,5 µg/µl a partir de las concentraciones obtenidas en la determinación de proteínas totales, para diluir las muestras se utilizó buffer HENS frío pH 8.0 (compuesto por HEPES 100 Mm, EDTA 1 Mm, neocuproína 0,1 mM y SDS 1%) y se consideró un volumen de muestra de 300 µl. Posteriormente se tomaron 200 µl de las diluciones preparadas y se les añadió 300 µl de buffer A de bloqueo, luego se procedió a

agitar las muestras por 30 minutos a 4°C, pasado este tiempo se separaron 250 µl desde los tubos sometidos a bloqueo los cuales fueron utilizados como controles negativos, luego a los 250 µl restantes en el tubo original y a los controles negativos se les añadió acetona fría en relación 1:4, posteriormente se agitó por inversión cada uno de los tubos y se incubó a -20°C por 60 minutos, para finalizar la etapa de bloqueo se procedió a centrifugar las muestras por 7 minutos a 2000 rpm a 4°C.

6.6.2 FASE DE REDUCCIÓN – MARCAJE

Posteriormente, siguiendo con la segunda etapa del método (reducción-marcaje), previamente se procedió a reconstituir 1 vial de reactivo reductor con 1 ml de buffer B pH 7.6 (compuesto por HEPES 250 mM, EDTA 1 mM y SDS 1%), por otro lado también se procedió a disolver 1 vial de reactivo de marcaje con 100 µl de DMF seguido de 900 µl de buffer B, después en un tubo Falcon graduado se añadieron 500 µl de reactivo de marcaje y 500 µl de reactivo reductor a un volumen de 4 ml de buffer B formándose el buffer de reducción-marcaje. Luego a los tubos con muestras y controles negativos centrifugados anteriormente se les procedió a eliminar el sobrenadante de acetona rescatando los pellets y manteniéndolos en hielo para después añadir 500 µl de buffer de reducción-marcaje a los tubos con muestras y 500 µl de buffer B a los controles negativos para luego almacenarlos a temperatura ambiente en oscuridad por 60 minutos. Posteriormente se procedió a añadir a cada tubo 500 µl de acetona fría y se incubó por 12 horas a -20°C.

Pasadas las 12 horas de incubación con acetona, se procedió a centrifugar las muestras y los controles negativos a 13200 rpm por 10 minutos a 4°C, donde luego se eliminaron los sobrenadantes rescatando los pellets y manteniéndolos a 4°C, al mismo tiempo se lavó cada uno de los sedimentos con 1 ml acetona fría depositándola suavemente en las paredes de cada tubo Eppendorf. A continuación, una vez eliminados los excesos de acetona en cada tubo se resuspendió el pellet con 100 µl de buffer HENS frío, para después agregar a cada

tubo 200 μ l de buffer de neutralización pH 7,7 (compuesto por HEPES-NaOH 20 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM y Triton X-100 0,5%).

6.6.3 SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS BIOTINILADAS CON ESTREPTAVIDINA AGAROSA

Para esta fase del experimento se utilizó una suspensión de estreptavidina agarosa Novagen [®] 50% pH 7.5 (compuesta por 100 mM de fosfato de sodio y 0,02 % de azida de sodio), previamente se procedió a agitar la suspensión de estreptavidina agarosa por inversión y se dejó en hielo hasta la suspensión en los distintos tubos. Posteriormente se procedió a añadir 30 μ l de solución de estreptavidina agarosa a cada tubo, luego estos fueron incubados por 60 minutos a temperatura ambiente en agitación lenta, más tarde se procedió a centrifugar por 30 segundos a 2000 rpm a 4°C los tubos, para luego lavar 5 veces cada pellet repitiendo la centrifugación entre cada lavado, para este procedimiento se utilizó buffer de neutralización NaCl pH 7.7 (compuesto de HEPES-NaOH 20 mM, NaCl 700 mM, EDTA 1 mM y Triton X-100 0,5%). Una vez terminados los lavados, se rescató el pellet formado tanto en las muestras como en los controles negativos para luego añadirles 40 μ l de buffer de carga 2X para electroforesis de proteínas, posteriormente se procedió a someter a ebullición las muestras y controles negativos por 5 minutos, para luego centrifugarlos a 13200 rpm por 5 minutos.

6.6.4 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

6.6.4.1 PREPARACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA

Para este procedimiento se prepararon geles de poliacrilamida de 1 mm de espesor, donde el gel separador presentó una concentración del 12% y el gel concentrador una

concentración del 4%, la composición específica de cada gel se puede observar en la siguiente tabla:

Tabla 2: Componentes de los geles de poliacrilamida.

Reactivos	Gel separador	Gel separador	Gel concentrador
Concentración	7,5%	12%	4%
Acrilamida – Bisacrilamida (30% - 0,8%)	3 ml	4,8 ml	0,7 ml
Agua desionizada	5,76 ml	3,96 ml	3 ml
Tris base pH 8.8 1,5 M	3 ml	3 ml	0 ml
Tris base pH 6,8 0,5 M	0 ml	0 ml	1,25 ml
SDS 10%	144 µl	144 µl	50 µl
Persulfato de amonio 10%	84 µl	84 µl	35 µl
TEMED	12 µl	12 µl	10 µl
Ensayo	Wb. eNOS	Wb. Proteínas mitocondriales y biotin swicht	Wb. En general

Se comenzó montando los sistemas de soporte para preparación de dos geles, donde en el caso de las láminas de vidrio entre las cuales se depositan las mezclas, fueron limpiadas y luego unidas a través de sus bordes laterales con la ayuda de vaselina, para luego terminar de armar todo el sistema. Una vez listo se procedió a realizar la mezcla del gel separador en un vaso de precipitado previamente cebado con agua desionizada, para luego comenzar a agregar los componentes en el siguiente orden y de acuerdo a las proporciones descritas en la tabla 2: primero se añadió la mezcla de acrilamida-bisacrilamida, luego se añadió el agua desionizada, después el Tris base pH 8.8 1,5 M, seguido del SDS 10% y el TEMED, para

finalmente añadir el persulfato de amonio al 10% debido a que este actúa activando la polimerización que permite la formación del gel.

Una vez realizada la mezcla del gel separador se procedió a depositarlo entre las láminas de vidrio preparadas y montadas previamente, con la ayuda de una micropipeta. Estas láminas deben llenarse en un 75% de su capacidad con gel separador teniendo la precaución de que no haya derrames o burbujas entre las láminas. Una vez depositadas las mezclas en cada sistema, se procedió a rellenar las láminas de vidrio con isopropanol, el cual permite que el borde superior del gel separador quede a la misma altura, posteriormente se dejó gelificar aproximadamente por 25 minutos y luego se retiró el exceso de isopropanol tratando de no dejar ningún residuo del alcohol entre los vidrios.

Luego se procedió a preparar la mezcla del gel concentrador, para ello el orden de dispensación de los reactivos fue el siguiente: primero se añadió la mezcla de acrilamida-bisacrilamida, luego el agua desionizada, después el Tris base pH 6.8 0,5 M, seguido del SDS 10% y el TEMED, para finalmente añadir el persulfato de amonio al 10%. Más tarde comenzada la reacción de la misma forma que con el gel anterior, se procedió a depositar la mezcla entre las láminas de vidrio, esta vez se llenó todo el espacio disponible con la mezcla y se procedió a fijar la peineta en la parte superior para la formación de los pocillos de carga.

6.6.4.2 CORRIDA ELECTROFORÉTICA

Una vez preparados los geles y retirada la peineta estos fueron montados en el sistema de electroforesis BioRAD, *mini PROTEAN hércules*, CA, USA, donde posteriormente se añadió a la cámara de electroforesis aproximadamente 700 ml de buffer de corrida pH 8.3 (compuesto por Tris base 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1%). Después, una vez instalado el sistema se procedió a cargar en el primer pocillo 5 μ l del marcador de peso

molecular *Prism Ultra Protein Ladder* (3.5-245 kDa), (Rockford, USA.) el cual corresponde a una mezcla de trece proteínas que van de 3,5-245 KDa y además cuenta con 2 bandas de referencia a los 75 y 25 KDa (figura 10).

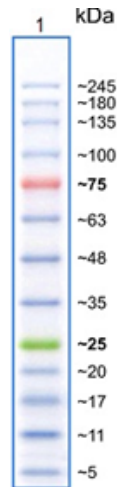


Figura 10: Esquema de separación del marcador de peso molecular SDS-PAGE - Prism Ultra Protein Ladder (3.5 - 245 kDa) (ab116029).

Una vez dispensado el marcador de peso molecular se procedió a cargar las muestras y controles. En todos los casos se depositó en cada pocillo un volumen cercano a 20 μ l de modo tal que la concentración de proteínas fuera cercana a 30 μ g por pocillo para el biotín switch y de 50 μ g por pocillo para el Western blot de proteínas mitocondriales y eNOS. Finalizada la carga de las muestras se procedió a comenzar la corrida programando la fuente de poder a 100 volts durante 2 horas y 20 minutos aproximadamente.

6.6.5 WESTERN BLOT

Esta técnica permite la detección de una o varias proteínas dentro de una misma matriz o muestra biológica, esto se da debido a la utilización de anticuerpos específicos que van a

reconocer epítomos específicos de las proteínas de interés. Este método consta de distintas etapas como la electrotransferencia, el bloque y el revelado.

6.6.5.1 ELECTROTRANSFERENCIA

Luego de la electroforesis, se procedió a desmontar el sistema electroforético extrayendo el gel del soporte, depositándolo dentro de una fuente de lavado que contenía buffer de transferencia frío pH 8.3 (compuesto por Tris-base 25 mM, glicina 192 mM y alcohol metílico 20%), también al interior de la fuente se depositaron dos esponjas, dos papeles filtro, la membrana de nitrocelulosa de 6x9 cm y el soporte de plástico para presionar el sándwich a formar, de este modo se comenzó a formar dicho sándwich posicionando sobre una de las caras internas del soporte plástico la primera esponja humedecida, luego un papel filtro, seguido de la membrana de nitrocelulosa, luego sobre esta se posicionó el gel, para luego terminar el sándwich con otra capa de papel filtro y otra esponja, finalmente se cerró el soporte plástico con la ayuda de un seguro permitiendo aplicarle presión al sándwich (figura 11).

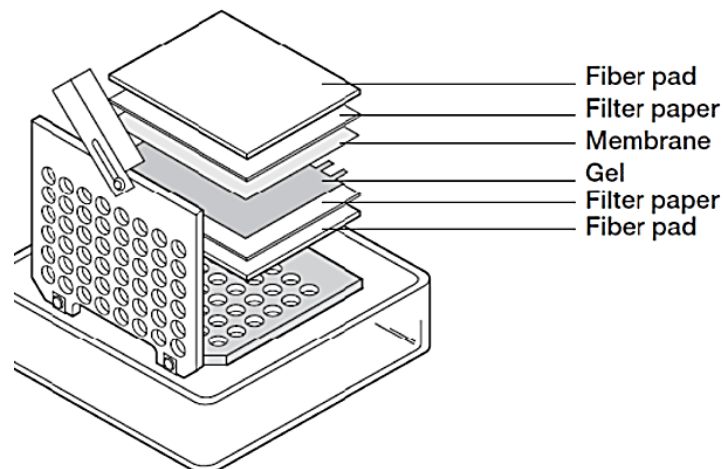


Figura 11: Posición de los componentes del sándwich de transferencia (77).

Posteriormente se procedió a introducir el sándwich dentro del cassette de transferencia, teniendo la precaución de posicionar el lado negro del soporte con el lado rojo del cassette. Después se procedió a ingresar dicho cassette al interior de la cámara de transferencia, a la cual posteriormente se le agregó una cubeta de hielo y buffer de transferencia frío para evitar que el sistema se sobrecaliente durante la transferencia, finalmente se conectó la fuente de poder programada por un tiempo de 2 horas a 100 volts a 4°C.

6.6.5.2 BLOQUEO

Después de dos horas de transferencia se procedió a desacoplar el sándwich, lo que permitió extraer la membrana de nitrocelulosa, donde la presencia de las bandas del marcador de peso molecular en la membrana reflejó el éxito de la transferencia, posteriormente se depositó la membrana en un recipiente hermético junto con un volumen de 5 a 10 ml de buffer TBS-T pH 7.6 (compuesto por Tris-base 0,2 M, NaCl 8% y Tween-20 0,1%) por 5 minutos en agitación con la finalidad de eliminar restos de gel y/o partículas que hayan quedado unidas a la membrana. Más tarde se procedió a bloquear la membrana con un volumen de aproximadamente 5 ml de solución de albúmina de suero bovino al 2% disuelta en buffer TBS-T, durante un período de 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante.

6.6.5.3 DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

Posterior al bloqueo de la membrana de nitrocelulosa con la solución de albúmina de suero bovino al 2%, se procedió a realizar la detección de proteínas mitocondriales en la membrana de nitrocelulosa, para ello se empleó un cóctel de anticuerpos de inmunoglobulinas IgG monoespecíficas *Mitochondria Membrane Integrity Antibody Cocktail*, *ThermoFisher scientific®*, que tienen especificidades para las proteínas IM Core-I

(complejo III), IM C-Va (complejo V), Ciclofilina D, OM porin 1+2 (VDCA-1) y matrix Cyt c (citocromo c) (figura 12). Este anticuerpo fue diluido en una relación de 1:1000 utilizando solución de albúmina de suero bovino al 2% como diluyente, luego se depositaron alrededor de 5 ml de esta solución sobre cada membrana y se incubó por 3 horas y 30 minutos en agitación constante. Por otro lado, cuando la proteína a detectar fue eNOS se utilizó un anticuerpo de ratón purificado anti-eNOS/NOS *BD Transduction LaboratoriesTM*, *BD Biosciences Pharmingen*, el cual fue diluido 1:3000 con leche al 5% en buffer TBS-T, para luego añadir 5 ml de dicha solución a la membrana y dejarla en agitación constante por 3 horas y 30 minutos.

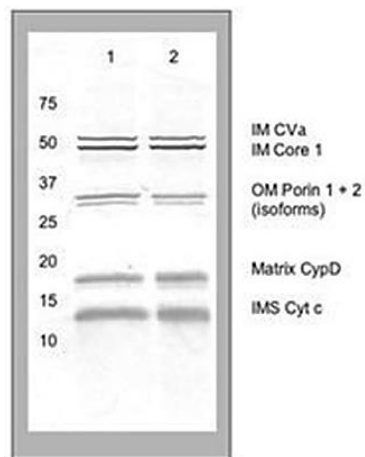


Figura 12: Proteínas mitocondriales reconocidas por el coctel de anticuerpos de inmunoglobulinas IgG mono-específicas Thermofisher scientific®.

Pasado el tiempo de incubación de la membrana con el anticuerpo primario se procedió a recuperar la solución con dicho anticuerpo desde la membrana para posteriormente realizar 2 lavados de 15 minutos con buffer TBS-T manteniendo las membranas en constante agitación, esto para retirar el exceso de anticuerpos que no hayan reconocido epítomos de las proteínas de interés. Más tarde, se procedió a realizar una solución con un anticuerpo secundario, específicamente uno conjugado con peroxidasa de rábano llamado *Mouse IgG antibody (HRP) GeneTex International Corporation*, este anticuerpo se caracteriza porque se encuentra diluido en un Buffer de almacenamiento pH 7.4

(compuesto por Tris 50 mM, NaCl 150 mM, BSA 1% y ProClin 0,025%), para el uso de este anticuerpo se procedió a diluirlo 1:2000 utilizando como diluyente una solución de leche al 5% en buffer TBS-T. Finalmente se procedió a eliminar el buffer TBS-T con el cual se lavaron las membranas y se les añadió 5 ml de solución con anticuerpo secundario, incubándolas por 2 horas en agitación. Cumplido el tiempo se procedió a recuperar el anticuerpo desde las membranas y se les realizaron 2 lavados de 15 minutos con buffer TBS-T.

6.6.5.4 REVELADO

Para la realización de este procedimiento se tuvo que disminuir la intensidad lumínica del laboratorio, primeramente, se procedió a retirar la membrana de nitrocelulosa desde su recipiente con la ayuda de pinzas depositándola en otro recipiente seco. Posterior a eso se procedió a preparar el reactivo revelador *WESTAR SUPERNOVA: Chemiluminescent Substrate for Western Blotting*, que se caracteriza por contar con dos reactivos, una solución de luminol (A) y una solución de peróxido (B) que actúan como sustrato para la peroxidasa de rábano unida al anticuerpo secundario. Es por ello que rápidamente se procedió a mezclar en un tubo Eppendorf 500 µl de la solución A y 500 µl de la solución B, dicha mezcla se depositó sobre toda la superficie de la membrana de nitrocelulosa y se procedió a revelar la quimioluminiscencia generada por la membrana a través del revelador *Omega Lum™ G aplegen*, obteniendo 5 imágenes del revelado por cada membrana, una a 1 segundo, otra a los 5 segundos, 10 segundos, 30 segundos y al minuto de ocurrida la reacción, de este modo se procedió a guardar las imágenes obtenidas en formato TIFF para su posterior análisis, en el caso de las membranas estas son mantenidas y almacenadas a 4°C en buffer TBS-T.

6.7 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DETECTADAS

Para la cuantificación de proteínas detectadas en el Western blot, las imágenes obtenidas se sometieron a un estudio de cuantificación de píxeles, a través del uso del software ImageJ versión k 1.45 (Wayne Rasband, National Institutes of Health USA). Los valores obtenidos fueron graficados y analizados a través del software GraphPad Prism 6.01.

6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los estudios estadísticos utilizados fueron dos, para el análisis de enzimas cardíacas se utilizó el ANOVA de dos vías con Test de Fisher, mientras que para el resto de los análisis se utilizó Test *t* de Student, a excepción del análisis de la relación SNO/Proteínas totales, para el cual se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los resultados fueron expresados como la media \pm error estándar de la media (SEM), considerando como significativo un valor $p < 0,05$. Para la realización del análisis y los gráficos se utilizó el software GraphPad Prism 6.01.

6.9 PROTOCOLO PARA BIOTIN SWICHT

6.9.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- 1) Para la realización de este protocolo se deben tener consideraciones como trabajar siempre en hielo, en ambientes poco luminosos y utilizar material nuevo.
- 2) Para comenzar se deben descongelar los corazones almacenados anteriormente a -80°C en hielo, también dispensar 3 ml de buffer HENS pH 8.0 (compuesto por HEPES 100 mM, EDTA 1 mM, neocuproina 0,1 mM y SDS 1%) en tubos Khan y

10 μ l de inhibidor de proteasas PIERCETM (considerar uno por corazón) y mantenerlos en hielo.

- 3) Una vez descongelados los corazones, se deben obtener pequeños cortes de cada uno, especialmente del área ventricular, los cuales posteriormente se deben depositar dentro de su respectivo tubo Khan con buffer HENS e inhibidor de proteasas.
- 4) Macerar los cortes de corazón contenidos en el paso anterior con la ayuda del homogeneizador IKA ® T10 basic ULTRA TURRAX a 4°C, hasta moler completamente los tejidos, posterior a esto separar el volumen total de homogeneizado en dos tubos Eppendorf, depositando 1,5 ml en cada uno.
- 5) Centrifugar los tubos a 800 rpm por 7 minutos para luego rescatar el sobrenadante (homogeneizado de corazón) en otro tubo Eppendorf, donde en caso de seguir con el experimento durante el mismo día, estas muestras se deben almacenar a 4°C, en caso contrario hacerlo a -80°C.

6.9.2 FASE DE BLOQUEO

- 1) Descongelar los homogeneizados si es que estos se encuentran almacenados a -80°C.
- 2) Preparar el reactivo de bloqueo, para ello diluir 1 vial de bloqueo con 100 μ l de dimetilformamida (DMF), luego añadir a este vial 900 μ l de buffer A pH 7.6 (compuesto por HEPES 250 mM, EDTA 1 mM, SDS 1 % y CHAPS), posteriormente tomar 1 ml del vial reconstituido y diluirlo en 9 ml de buffer A, obteniéndose el buffer A de bloqueo.
- 3) Preparar diluciones de cada homogeneizado a 1,5 μ g/ μ l, a partir de las concentraciones obtenidas en la determinación de proteínas totales, utilizando como diluyente buffer HENS frío pH 8.0, considerando un volumen de muestra de 300 μ l.
- 4) Tomar 200 μ l de las diluciones preparadas, depositarlas dentro de un Eppendorf y añadirles 300 μ l de buffer A de bloqueo.
- 5) Agitar las muestras por 30 minutos a 4°C.

- 6) Posteriormente separar 250 μ l desde los tubos sometidos a bloqueo, los cuales serán utilizados como controles negativos.
- 7) Añadir acetona fría tanto a los tubos originalmente sometidos a bloqueo como a los controles negativos en relación 1:4, agitarlos por inversión e incubarlos a -20°C por 60 minutos.
- 8) Centrifugar los tubos por 7 minutos a 2000 rpm a 4°C .

6.9.3 FASE DE REDUCCIÓN – MARCAJE

- 1) Reconstituir un vial de reactivo reductor con 1 ml de buffer B pH 7.6 (compuesto por HEPES 250 mM, EDTA 1 mM y SDS 1 %).
- 2) Disolver un vial de reactivo de marcaje con 100 μ l de DMF, seguido de 900 μ l de buffer B.
- 3) En un tubo Falcon graduado añadir 500 μ l de reactivo de marcaje y 500 μ l de reactivo reductor a un volumen de 4 ml de buffer B, obteniendo el buffer de reducción marcaje.
- 4) Eliminar el sobrenadante de acetona a los tubos con muestra y controles negativos centrifugados en la etapa anterior, rescatando los pellets y manteniéndolos en hielo.
- 5) Añadir 500 μ l de buffer de reducción marcaje a los tubos con muestra y 500 μ l de buffer B a los controles negativos.
- 6) Almacenarlos a temperatura ambiente en oscuridad por 60 minutos.
- 7) Posteriormente añadir a cada tubo 500 μ l de acetona fría e incubar por 12 horas a -20°C .
- 8) Luego de este tiempo, centrifugar las muestras y los controles negativos a 13200 rpm por 10 minutos a 4°C .
- 9) Eliminar los sobrenadantes y rescatar los pellets manteniéndolos en hielo.
- 10) Lavar los sedimentos con 1 ml de acetona fría depositándola a través de las paredes.
- 11) Eliminar los excesos de acetona fría.
- 12) Resuspender el pellet con 100 μ l de buffer HENS frío pH 8.0.

- 13) Agregar a cada tubo 200 μ l de buffer de neutralización pH 7.7 (compuesto por HEPES-NaOH 20 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM y Triton X-100 0,5%).

6.9.4 SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS BIOTINILADAS CON ESTREPTAVIDINA AGAROSA

- 1) Añadir 30 μ l de estreptavidina agarosa Novagen ® 50% pH 7.5 agitada (compuesta por 100 mM de fosfato de sodio y 0,02 % de azida de sodio) a todos los tubos tratados en la fase anterior.
- 2) Incubar por 60 minutos a temperatura ambiente en agitación lenta.
- 3) Centrifugar por 30 segundos a 2000 rpm a 4°C y lavar 5 veces cada pellet repitiendo la centrifugación entre cada lavado, para este procedimiento se utilizó buffer de neutralización NaCl pH 7.7 (compuesto de HEPES-NaOH 20 mM, NaCl 700 mM, EDTA 1 mM y Triton X-100 0,5%).
- 4) Más tarde rescatar los pellets formados tanto en las muestras como en los controles negativos, para luego añadirles 40 μ l de buffer de carga 2X para electroforesis de proteínas.
- 5) Someter a ebullición las muestras y los controles negativos por 5 minutos.
- 6) Centrifugar a 13200 rpm por 5 minutos.

6.9.5 CORRIDA ELECTROFORÉTICA

- 1) Preparar los geles, utilizando las recetas mencionadas en la tabla 2.
- 2) Una vez preparados los geles retirar la peinetas y montarlos en el sistema de electroforesis BioRad mini PROTEAN hércules, CA, USA.
- 3) Añadir a la cámara de electroforesis aproximadamente 700 ml de buffer de corrida pH 8.3 (compuesto por Tris base 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1%).

- 4) Cargar en el primer pocillo 5 μ l de marcador de peso molecular Prism Ultra Protein Ladder (3,5-245 KDa) (Rockford, USA).
- 5) Cargar las muestras y controles, considerando un volumen cercano a 20 μ l por pocillo, de modo tal que la concentración de proteínas se cercana a 30 μ g por pocillo.
- 6) Comenzar la corrida programando la primera hora a 60 volts y luego 2 horas a 100 volts.

6.9.6 WESTERN BLOT

6.9.6.1 ELECTROTRANSFERENCIA

- 1) Desmontar el sistema electroforético extrayendo el gel del soporte.
- 2) Depositar el gel dentro de una fuente de lavado que contenga buffer de transferencia frío pH 8.3 (compuesto por Tris base 25 mM, glicina 192 mM y alcohol metílico 20%) además de dos esponjas, dos papeles filtro, la membrana de nitrocelulosa de 6 x 9 cm y el soporte de plástico.
- 3) Armar el sándwich siguiendo el patrón de la figura 9, es sumamente importante que dentro de este no queden burbujas y que el gel quede a la misma altura de la membrana de nitrocelulosa.
- 4) Introducir el sándwich dentro del cassette de transferencia, teniendo la precaución de posicionar el lado negro del soporte con el lado rojo del cassette.
- 5) Instalar el cassette dentro de la cámara de transferencia y también añadir al interior de esta una cubeta con hielo y buffer de transferencia frío para evitar que el sistema se sobrecaliente durante la transferencia.
- 6) Programar la fuente de poder por 2 horas a 100 volts a 4°C.

6.9.6.2 BLOQUEO

- 1) Pasado el tiempo de la etapa anterior se debe desacoplar el sándwich, extrayendo la membrana de nitrocelulosa.
- 2) Depositar la membrana en una placa de plástico con volumen de 5 a 10 ml de buffer TBS-T pH 7,6 (compuesto por Tris base 0,2 M, NaCl 8% y Tween 20 0,1%) por 5 minutos en agitación.
- 3) Eliminar el exceso de buffer TBS-T utilizado en el paso anterior y añadir 5 ml de solución de albúmina de suero bovino al 2% disuelta en buffer TBS-T por 60 minutos a temperatura ambiente con agitación constante.

6.9.6.3 DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

- 1) Eliminar el exceso de solución bloqueante añadida en la etapa anterior.
- 2) Preparar una solución 1:1000 del anticuerpo IgG monoespecífica Mitochondrial Membrane Integrity Antibody Cocktail, Thermofisher scientific ® utilizando albúmina de suero bovino al 2% como diluyente.
- 3) Depositar 5 ml de esta solución sobre cada membrana e incubar por 3 horas y 30 minutos en agitación constante.
- 4) Recuperar la solución con anticuerpos desde la membrana.
- 5) Realizar dos lavados de 15 minutos con buffer TBS-T manteniendo las membranas en agitación constante.
- 6) Eliminar el exceso de buffer TBS-T desde las membranas.
- 7) Depositar 5 ml de una solución con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano llamado Mouse IgG antibody (HRP) GeneTex International Corporation, el cual debe estar diluido 1:2000 utilizando como diluyente una solución de leche al 5% en buffer TBS-T.
- 8) Incubar por 2 horas en agitación constante.
- 9) Recuperar el anticuerpo desde las membranas

10) Realizar dos lavados de 15 minutos con buffer TBS-T.

6.9.6.4 REVELADO

- 1) Disminuir la intensidad lumínica del laboratorio.
- 2) Retirar la membrana de nitrocelulosa desde su recipiente con la ayuda de pinzas, depositándola en otro contenedor seco.
- 3) Preparar el reactivo revelador Westar Supernova: Chemiluminescent Substrate for Western Blotting, mezclando 500 μ l de solución A y 500 μ l de solución B.
- 4) Rápida y depositar sobre la membrana el reactivo preparado.
- 5) Revelar la quimioluminiscencia generada por la membrana a través del revelador Omega LumTM G aplegen, el cual debe estar previamente programado para obtener 5 imágenes de la membrana, una al segundo, otra a los 5 segundos, a los 10 segundos, 30 segundos y 60 segundos de ocurrida la reacción.
- 6) Guardar las imágenes obtenidas en formato TIFF para su posterior análisis.
- 7) Mantener las membranas a 4°C en buffer TBS-T.

7. RESULTADOS

7.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS MODELOS ANIMALES

A continuación, se presentan la media del peso de las ratas antes de ser sacrificadas y el peso de los corazones de estas luego de la retroperfusión.

Tabla 3: Peso promedio de los distintos grupos de ratas y sus corazones.

	Grupo control	Grupo experimental
Animales (n)	3	3
Peso de las ratas (g)	391,6 ± 40,27	341 ± 54,69
Peso del corazón (g)	1,26 ± 0,32	1,39 ± 0,24

7.2 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA PROTEÍNAS TOTALES

Se realizó una curva de calibración para el método de BCA PierceTM, a partir de un estándar de albúmina de suero bovino, tal como se describió anteriormente. A continuación, se presentan los datos pertenecientes a la curva.

Tabla 4: Curva de calibración de albúmina de suero bovino medido utilizando el método de BCA Pierce™.

Concentración de Albúmina de suero Bovino [µg/ml]	Absorbancias a 562 nm
160	0,609
320	0,850
400	0,964
640	1,285
1200	1,910
1520	2,313
2000	2,912

Curva de calibración: proteínas totales

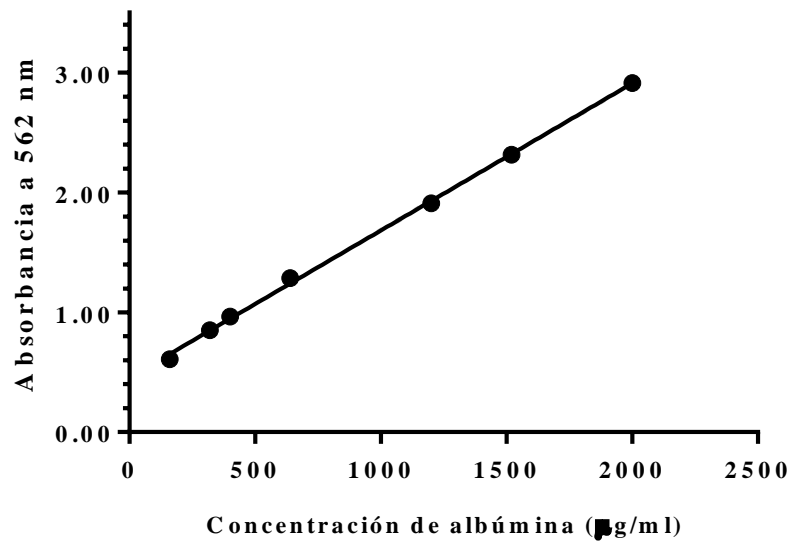


Figura 13: Curva de calibración de albúmina por el método de BCA Pierce™.

$$R^2 = 0,999$$

$$y = 0,001228X + 0,4543$$

7.3 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN HOMOGENEIZADOS DE CORAZÓN

Utilizando la ecuación de la recta de la curva de calibración de proteínas totales se obtuvieron las siguientes concentraciones:

Tabla 5: Cuantificación de proteínas totales en homogeneizados de corazón.

Homogeneizado de corazón	Absorbancia promedio	Proteínas totales [µg/ml]
Corazón sin droga 1 (CSD1)	1,442	16086
Corazón sin droga 2 (CSD2)	1,029	9360
Corazón sin droga 3 (CSD3)	0,893	7145
Corazón con droga 1 (CCD1)	0,951	8089
Corazón con droga 2 (CCD2)	1,233	12682
Corazón con droga 3 (CCD3)	1,060	9865

7.4 ENZIMAS CARDÍACAS (LDH y CK)

Se determinaron los niveles de enzimas cardíacas (LDH y CK) durante el proceso de isquemia reperfusión, tanto en presencia como en ausencia del inhibidor de GSNOR, a través del kit *LDH SCE mod.* y del kit *CK NAC liquiUV*, ambos de HUMAN. Dentro de los resultados obtenidos, se observó un aumento en la liberación de LDH (figura 14) en el grupo control respecto del sometido a inhibidor de GSNOR. Esta diferencia fue significativa a los 0 (**** $p < 0,001$) y 10 (**** $p = 0,001$) minutos antes de la isquemia, además al minuto 0 post isquemia ocurrió un aumento dramático en la liberación de la enzima por parte del grupo control (**** $p < 0,001$). En el caso de CK (figura 15) se dio un patrón similar al anterior donde los niveles de esta enzima fueron mayores en el grupo

control especialmente a los 10 (** p=0,0076) y 15 (** p=0,0045) minutos pre isquemia. Sin embargo, durante el proceso de reperfusión la liberación de CK fue mayor en el grupo control solo en el tiempo 0, posterior a eso se invirtió la liberación de esta enzima siendo curiosamente mayores los niveles de CK en el grupo sometido al inhibidor de GSNOR, respecto del grupo control.

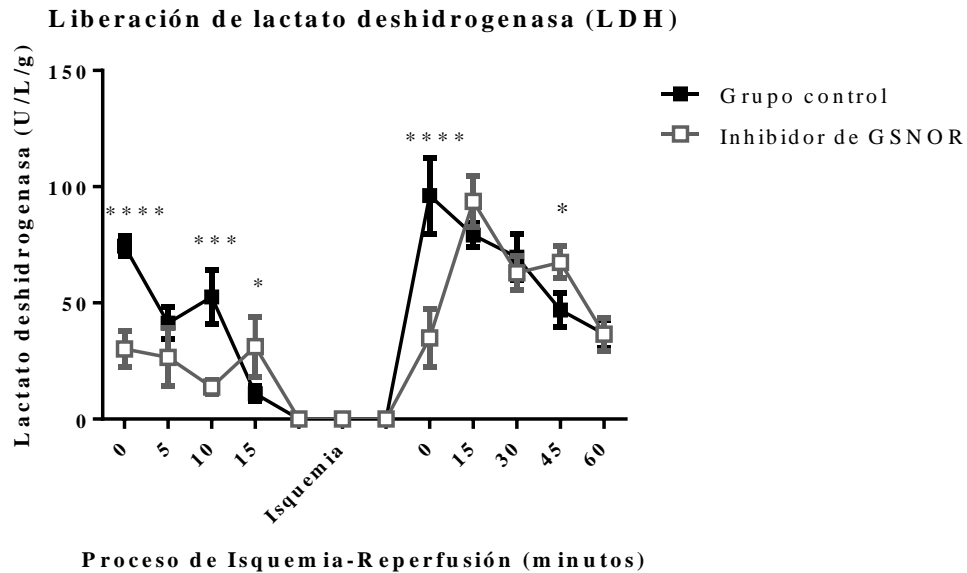


Figura 14: Variación de los niveles de Lactato Deshidrogenasa (LDH) en el grupo control (n = 3) y en presencia del inhibidor de GSNOR (n = 3). En el eje X se observa la evolución del proceso de isquemia-reperfusión, donde se muestra la evolución de los niveles de LDH detectados a los 0, 5, 10 y 15 minutos respectivamente en la etapa basal. También se simboliza el proceso de isquemia donde no se determinaron los niveles enzimáticos, y finalmente el proceso de reperfusión donde se determinaron los niveles de la enzima a los 0, 15, 30, 45 y 60 minutos de reperfusión. En el eje Y se representan los niveles de LDH en U/L/g de tejido. Los símbolos de color negro muestran los niveles de LDH para el grupo control y en gris para el grupo sometido a inhibidor de GSNOR. El análisis estadístico indicó tres puntos de la curva antes de la isquemia donde hubo significancia estadística, siendo estos a los 0 minutos (**** p<0,001), 10 minutos (*** p=0,001), 15 minutos (* p=0,0228) y dos puntos significativos post isquemia: 0 minutos (**** p<0,001) y 45 minutos (* p=0,0210).

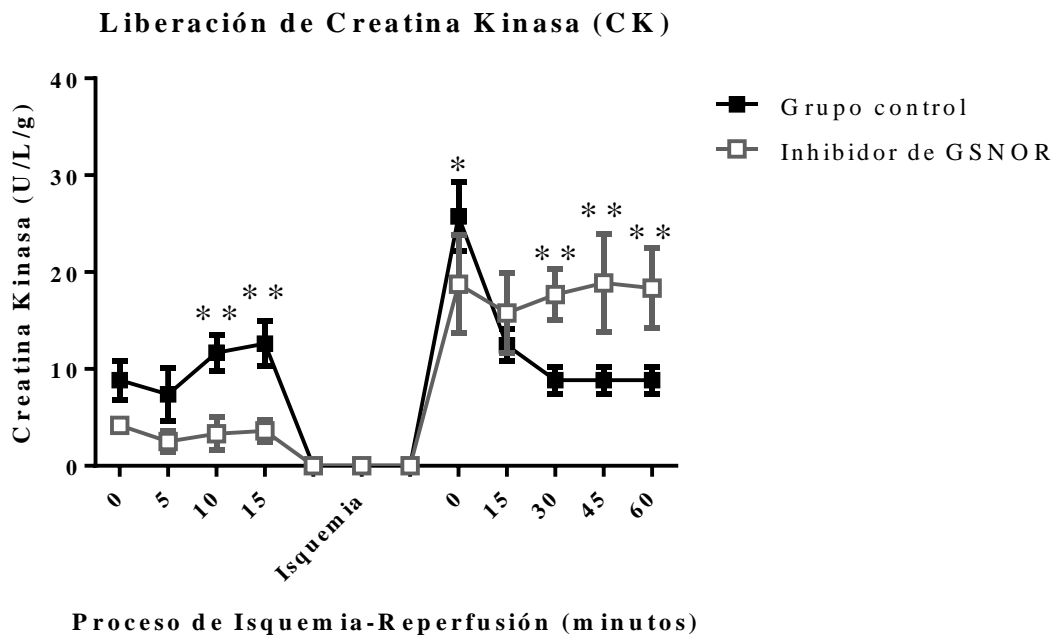


Figura 15: Variación de los niveles de Creatina Kinasa (CK) en el grupo control y en presencia del inhibidor de GSNOR (n = 3). En el eje X se observa la evolución del proceso de isquemia-reperfusion, donde se muestra la evolución de los niveles de CK detectados a los 0, 5, 10 y 15 minutos respectivamente en la etapa basal. También se simboliza el proceso de isquemia donde no se determinaron los niveles enzimáticos, y finalmente el proceso de reperfusion donde se determinaron los niveles de la enzima a los 0, 15, 30, 45 y 60 minutos de reperfusion, por otro lado, en el eje Y se representan los niveles de CK en U/L/g de tejido. Respecto de las curvas, se observan de color negro los niveles de CK para el grupo control y en gris los niveles de esta enzima para el grupo sometido al inhibidor de GSNOR. El análisis estadístico indicó dos puntos pre isquemia donde hubo significancia estadística, siendo estos a los 10 minutos (** p=0,0076), 15 minutos (** p=0,0045) y cuatro puntos post isquemia: 0 minutos (* p=0,0218), 30 minutos (** p=0,0052), 45 minutos (** p=0,0019) y 60 minutos (** p=0,0030).

7.5 BIOTIN SWITCH

Luego, se procedió con el ensayo para detección de proteínas S-nitrosiladas, biotin switch, para el cual, se procedió a realizar homogenizados de los corazones previamente sometidos a isquemia-reperfusión con y sin inhibidor de GSNOR. Estos fueron sometidos a las distintas etapas del biotin switch. Una vez terminado el proceso de biotinyación, proteínas biotiniladas se separaron tratándolas con partículas de estreptavidina conjugada con agarosa. Finalmente, las proteínas biotiniladas se resolvieron mediante una electroforesis de poliacrilamida cuyo gel separador se encontraba al 12%. Los geles obtenidos fueron sometidos al procedimiento de Western blot, donde se empleó un coctel de anticuerpos de inmunoglobulinas IgG monoespecíficas *Mitochondria Membrane Integrity Antibody Cocktail*, *ThermoFisher scientific*®, que tienen especificidades para las proteínas IM Core-I (complejo III), IM C-Va (complejo V), Ciclofilina D, OM porin 1+2 (VDCA-1) y matrix Cyt c (citocromo c), obteniéndose los resultados presentados en la figura 16.

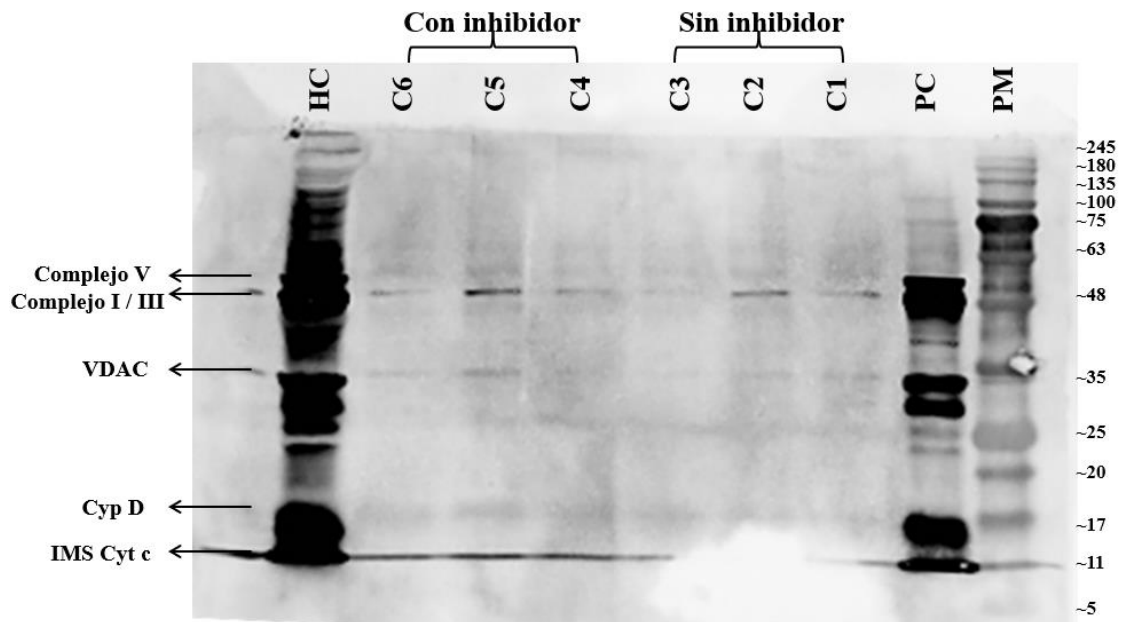


Figura 16: Western blot de muestras tratadas con la técnica de biotín switch. Se observa el nivel de S-nitrosilación de muestras de homogeneizado de corazón de rata sin inhibidor de la GSNOR (C1, C2, C3) y muestras sometidas a tratamiento de inhibición enzimática de la GSNOR (C4, C5, C6). PM: Marcador de peso molecular (kDa); PC: Pellet de corazón (control positivo); HC: Homogeneizado de corazón.

7.5.1 CUANTIFICACIÓN DE PÍXELES

Una vez revelada la membrana a través de la quimioluminiscencia, se realizó la cuantificación de píxeles de las bandas obtenidas para las proteínas, utilizando el software ImageJ 1.52a, donde los valores obtenidos se graficaron en GraphPad Prism (figura 17). El análisis de las bandas que representan los niveles de S-nitrosilación del complejo V, complejo I/III, VDAC y Cyt-c respectivamente no arrojó diferencias significativas ($p > 0,05$). Caso contrario fue el de la Cyp D que se encontró con un grado significativamente mayor de S-nitrosilación en los corazones sometidos al inhibidor de GSNOR, respecto del grupo control ($p = 0,0314$).

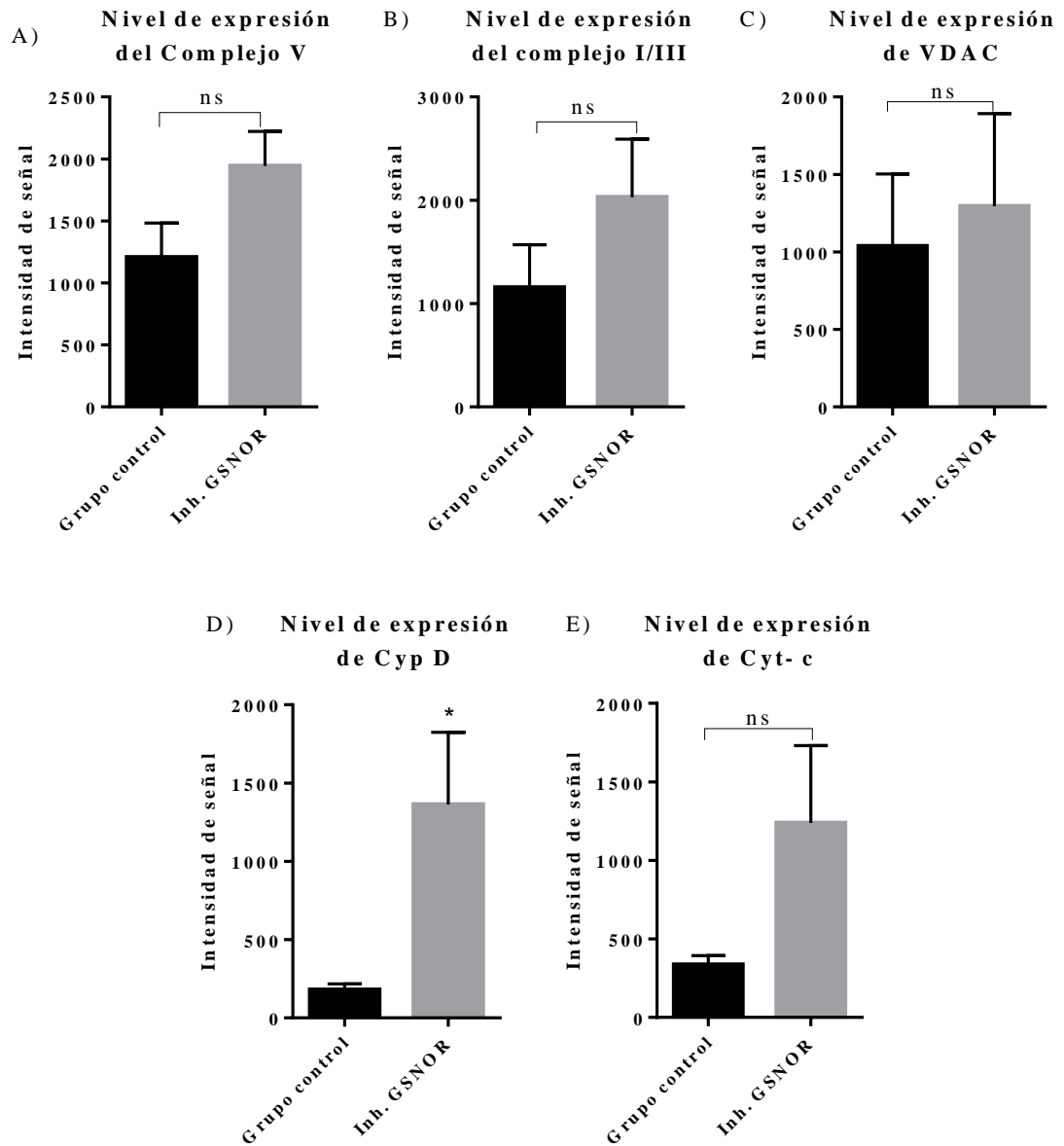


Figura 17: S-nitrosilación de subunidades mitocondriales sometidas al método de biotin switch. Se observan los niveles de expresión de las distintas proteínas mitocondriales S-nitrosiladas, es decir complejo V, complejo I/III, VDAC, CypD y Cyt-c, siendo las columnas negras el grupo control y las columnas grises el grupo sometido a inhibidor de GSNOR. En las figuras 17A, 17B, 17C y 17E no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (ns; $p > 0,05$), sin embargo, en la figura 17D se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el sometido a inhibidor respecto de los niveles de ciclofilina D (Cyp D) (* $p = 0,0314$).

7.6 WESTERN BLOT DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES

Otro de los ensayos que se realizó fue el Western blot para detección de proteínas mitocondriales contenidas en los homogenizados originales, antes de someterlos al switch de biotina. Las proteínas fueron separadas a partir de una electroforesis de poliacrilamida cuyo gel separador se encontraba a una concentración del 12%, posteriormente el gel fue sometido al procedimiento del Western blot, utilizando un coctel de anticuerpos de inmunoglobulinas IgG monoespecíficas *Mitochondria Membrane Integrity Antibody Cocktail*, *ThermoFisher scientific*®, que tienen especificidades para las proteínas IM Core-I (complejo III), IM C-Va (complejo V), Ciclofilina D, OM porin 1+2 (VDCA-1) y matrix Cyt c (citocromo c), los cuales permitieron reconocer las bandas presentes en la figura 18.

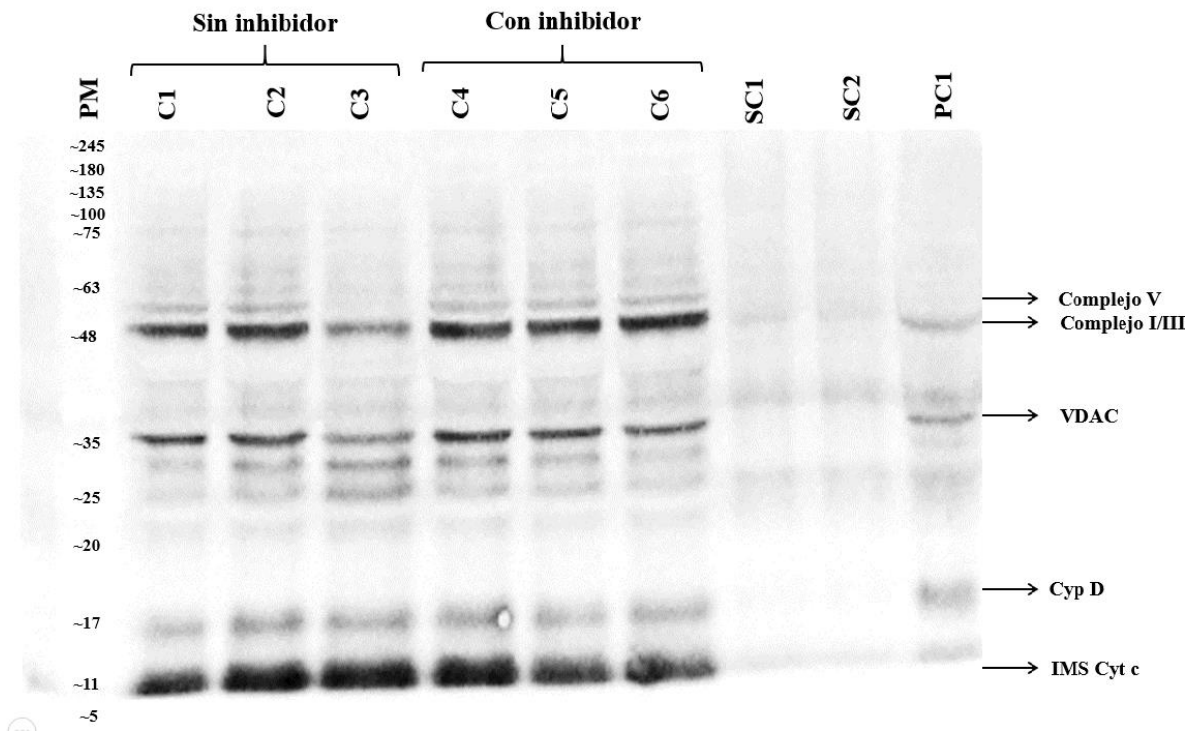


Figura 18: Western blot de proteínas mitocondriales del grupo control (n = 3) y el grupo sometido a inhibidor de GSNOR (n = 3). Se realizó una comparación entre el grupo control (sin inhibidor) que comprende los corazones C1: Corazón 1; C2: Corazón 2; C3: Corazón 3 y el grupo sometido a inhibidor cuyos corazones fueron C4: Corazón 4; C5: Corazón 5; C6: Corazón 6, con el fin de evaluar los niveles de expresión totales de complejo V, complejo I/III, VDAC, Cyp D y Cyt-c presentes en las muestras. Además, se cargaron también muestras de SC1: Sobrenadante de corazón 1; SC2: Sobrenadante de corazón 2; PC1: Pellet de corazón y PM: Peso molecular (kDa).

7.6.1 CUANTIFICACIÓN DE PÍXELES

Se realizó la cuantificación de píxeles en las bandas de la figura 18 obteniendo los resultados graficados en la figura 19. En este caso ninguna de las figuras obtenidas demostró algún grado de significancia estadística entre el grupo control y el grupo tratado con inhibidor de GSNOR para las distintas proteínas mitocondriales ($p > 0,05$), lo que

muestra que no existían diferencias en el contenido de proteínas mitocondriales en material de partida.

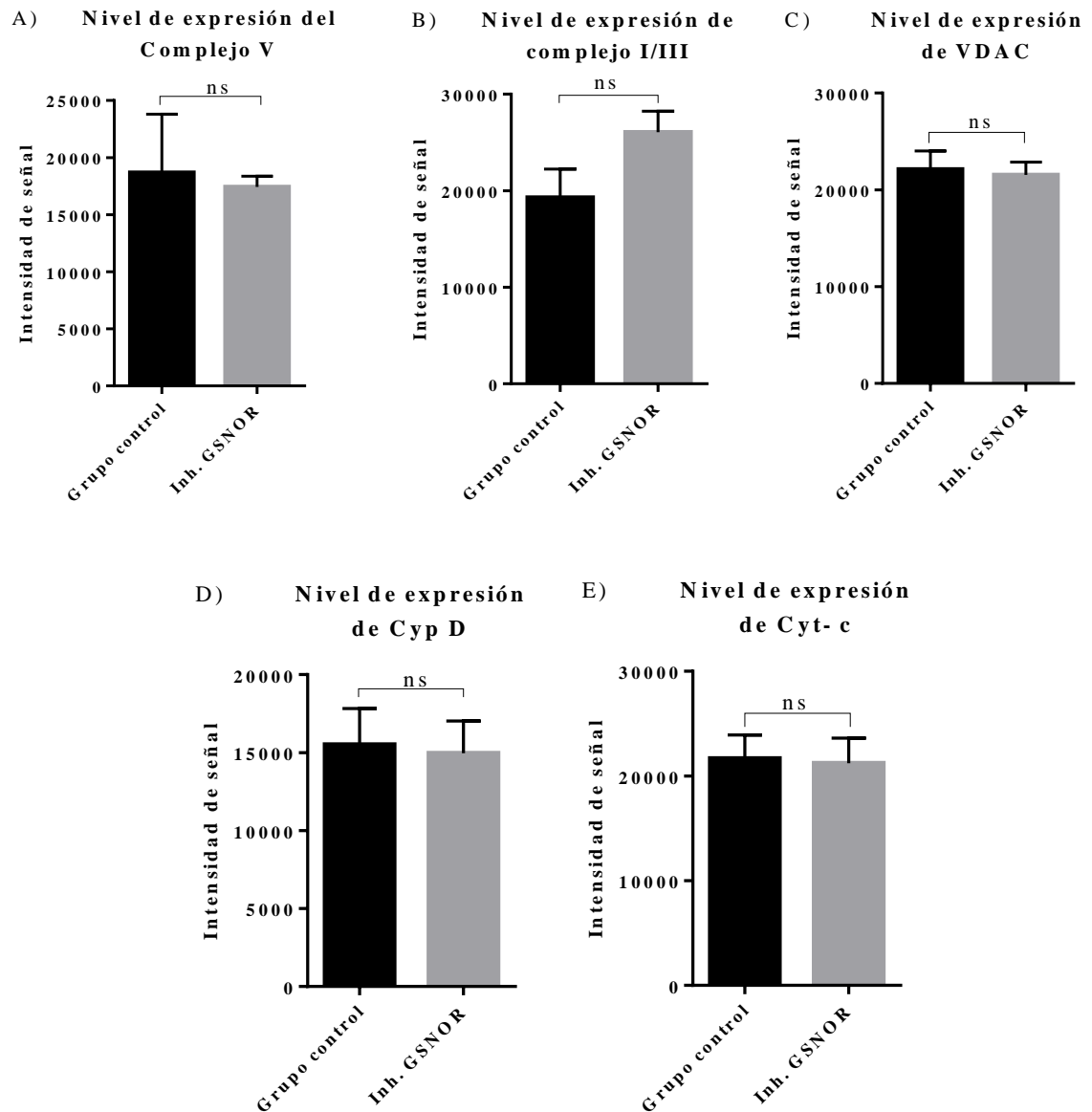


Figura 19: Cuantificación de proteínas mitocondriales en las muestras de corazón mediante Western blot. Se observan los niveles de las distintas proteínas mitocondriales (complejo V, complejo I/III, VDAC, CypD y Cyt-c) tanto del grupo control (columnas negras) como del grupo sometido a inhibidor (columnas grises), donde en todos los casos no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de estudio (ns: $p > 0,05$).

7.7 RELACIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS BIOTINILADAS DEL BIOTIN SWITCH Y LAS PROTEÍNAS TOTALES

Una vez obtenido el valor de los píxeles de cada una de las bandas, tanto del biotin switch como del Western blot de proteínas mitocondriales, se procedió a calcular los cocientes entre los valores de píxeles obtenidos del biotin switch y de proteínas mitocondriales totales, para cada proteína (complejo V, complejo I/III, VDAC, Cyp D y Cyt-c), obteniéndose la relación SNO/Proteína mitocondrial total, tal como se observa en la figura 20. Dentro de los resultados se encontró que las relaciones SNO/Total complejo I/III, SNO/Total VDAC y SNO/Total Cyt-c no presentaban significancia estadística entre los distintos grupos ($p > 0,05$), caso contrario fue el de SNO/Total complejo V y SNO/Total CypD donde se observó significancia ($p = 0,05$) en ambos casos.

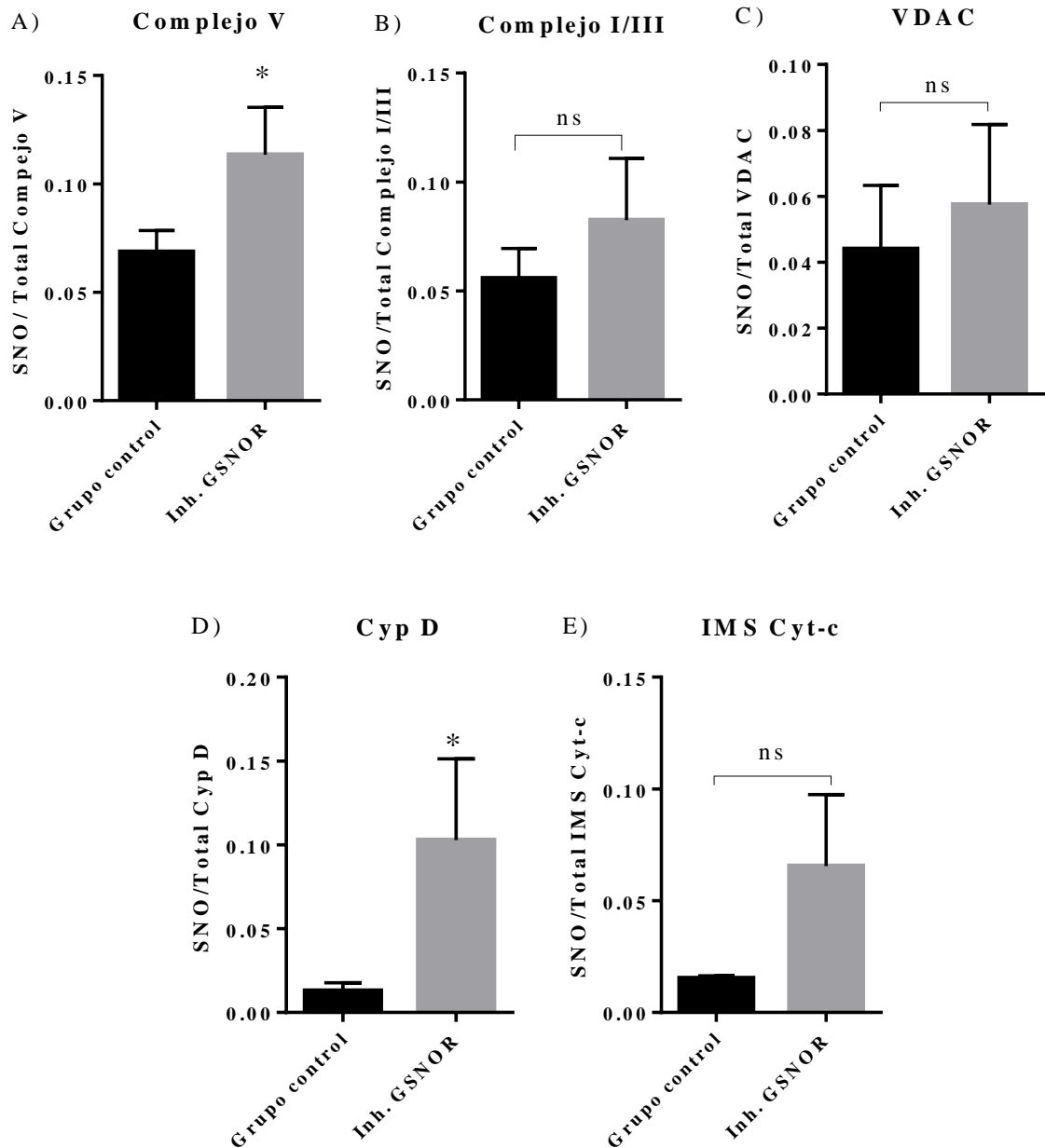


Figura 20: Relación SNO/Proteínas mitocondriales totales. Se observan las distintas relaciones entre las proteínas mitocondriales biotiniladas y las proteínas totales encontradas en las muestras controles (columnas negras) y las muestras sometidas a inhibidor (columnas grises). Tanto en las figuras 20B, 20C y 20E no se observó significancia alguna (ns: $p > 0,05$), por otro lado, en el caso de la figura 20A si hubo significancia (* $p = 0,05$) al igual que en la figura 20D donde también la hubo (* $p = 0,05$).

7.8 WESTERN BLOT DE EXPRESIÓN DE eNOS

Se procedió a evaluar el nivel de expresión de eNOS en los mismos homogenizados descritos anteriormente a través de un Western blot, para la electroforesis se utilizó un gel de poliacrilamida cuyo gel separador se encontraba al 7,5% permitiendo una mayor separación de las bandas de mayor peso molecular, posteriormente los geles fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa y eNOS fue detectada a través de un anticuerpo de ratón purificado anti-eNOS/NOS *BD Transduction LaboratoriesTM*, *BD Biosciences Pharmingen*, cuya banda se observa entre los 135 y 140 kDa.

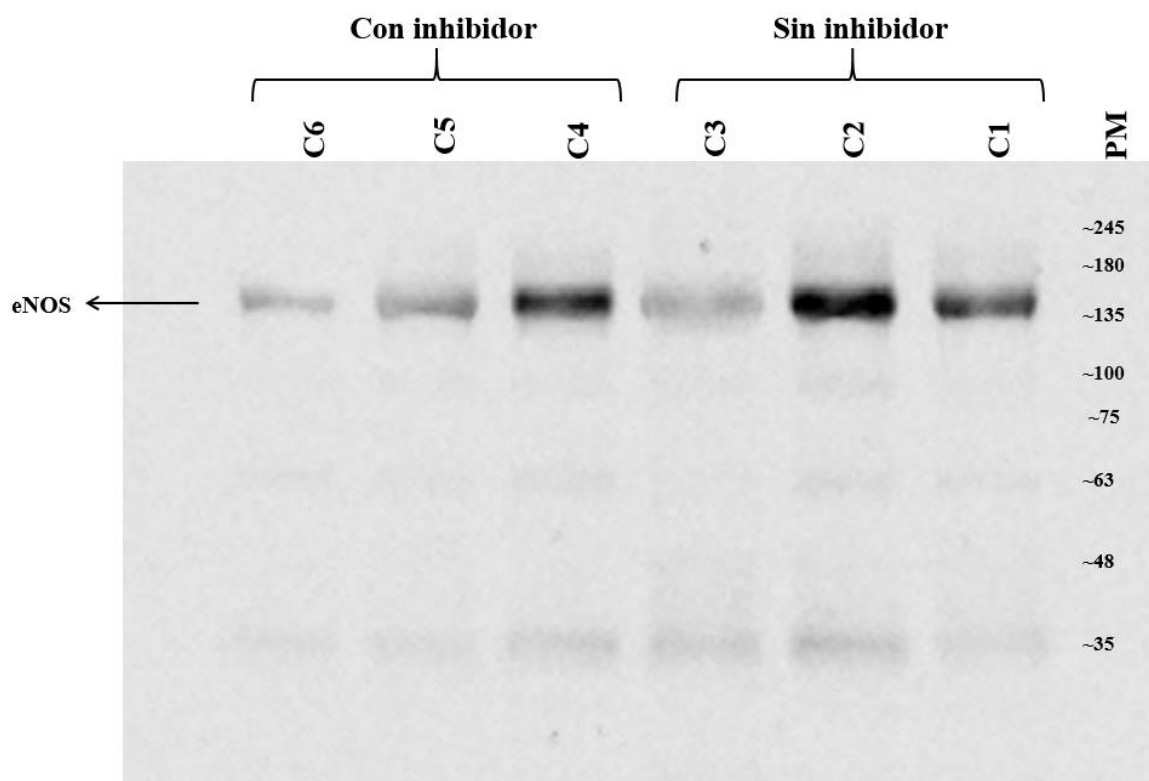


Figura 21: Niveles de expresión de óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Se realizó este análisis en ambos grupos de estudio a través de Western blot donde: C1: Corazón 1; C2: Corazón 2; C3: Corazón 3; C4: Corazón 4; C5: Corazón 5; C6: Corazón 6 y PM: Marcador de peso molecular (kDa). La banda correspondiente a eNOS es la ubicada aproximadamente a los 135 kDa.

7.8.1 CUANTIFICACIÓN DE PÍXELES

Al igual que en los ensayos anteriores se procedió a realizar una cuantificación de las bandas mediante píxeles, donde no se encontraron valores significativos ($p < 0,05$) de expresión de eNOS entre el grupo control y el sometido a GSNOR (figura 22). Esto sugiere que las diferencias en el grado de nitrosilación de las proteínas mitocondriales no se debe a una diferencia en la producción de NO en las distintas muestras.

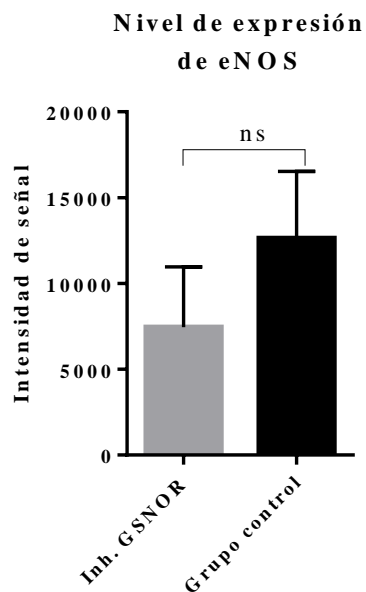


Figura 22: Cuantificación de los niveles de expresión de óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Se observan los niveles de expresión de eNOS en el grupo control (columna negra) y el grupo sometido al inhibidor (columna gris), aunque se ve una leve diferencia en los niveles de expresión en ambos grupos, la diferencia no fue estadísticamente significativa (ns: $p > 0,05$).

8. DISCUSIÓN

Las enfermedades cardiovasculares, específicamente el infarto agudo al miocardio, actualmente son una de las principales causas de muerte en el mundo, lo cual se ve potenciado por los estilos de vida poco saludables que la población ha adquirido durante las últimas décadas. Según datos otorgados por la organización mundial de la salud (OMS), durante el año 2012, en todo el mundo murieron 17,5 millones de personas por enfermedades cardiovasculares. Además otro de los datos que se destaca es que más del 75% de las muertes producidas por estas patologías se asocia a países de ingresos bajos y medios, por lo que el estilo de vida tal como se mencionó anteriormente es fundamental en la prevención de estas patologías (78).

Tal como se mencionó en capítulos anteriores, la restitución del flujo sanguíneo después de un proceso de isquemia prolongado en el músculo cardíaco, si bien es fundamental para que el corazón vuelva a funcionar, también puede producir un aumento en el daño del tejido cardíaco. Esto debido a alteraciones bioquímicas y estructurales que ocurren en el corazón, proceso denominado como isquemia reperfusión (79). Dentro de las estructuras celulares principalmente afectadas durante este proceso encontramos la mitocondria, la cual sufre diversas alteraciones, como variaciones de pH, del potencial redox mitocondrial, que a su vez conllevan a alteraciones en la cadena transportadora de electrones, permitiendo así la apertura del poro de transición mitocondrial, lo que predispone al cardiomiocito a la necrosis y a la activación de vías proapoptóticas (3, 80). Por tanto, esto posiciona al poro de permeabilidad mitocondrial y sus componentes como una de las dianas para prevenir el daño cardíaco.

Dentro de los parámetros de estudio a los que se sometieron los corazones de rata utilizados encontramos la medición de enzimas cardíacas, específicamente lactato deshidrogenasa (LDH) y creatina quinasa (CK) (figuras 14 y 15). En el caso de la enzima

lactato deshidrogenasa durante la etapa basal se observaron diferencias significativas entre el grupo sometido al inhibidor y el grupo control a los 0 minutos ($p < 0,001$) y a los 10 minutos ($p = 0,001$). Además, al minuto 0 de reperfusión hubo un aumento significativo de LDH en el grupo control ($p < 0,001$) lo que permitió observar el efecto de la droga, que disminuye significativamente los niveles de LDH en los corazones sometidos a inhibidor de GSNOR, el aumento dramático de LDH en la etapa de reperfusión se puede asociar a lo propuesto por Halestrap y col. (2006) que menciona que mPTP permanece cerrado durante la isquemia, y se abre al inicio de la reperfusión lo que conlleva a la ruptura de membranas y posterior muerte celular con liberación de enzimas (81).

En cuanto a la creatina kinasa, se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en la etapa basal, específicamente a los 10 ($p = 0,0076$) y 15 minutos ($p = 0,0045$, siendo mayores los niveles de CK en el grupo control, lo que sugiere que efectivamente el inhibidor de GSNOR tiene un efecto positivo sobre el tejido cardíaco sometido a isquemia reperfusión, situación similar ocurrió al tiempo 0 post isquemia donde los niveles de la enzima en el grupo control aumentaron significativamente ($p = 0,0218$), lo que da cuenta del nivel de injuria que genera el proceso de isquemia en el tejido cardíaco, tal como se refleja en un estudio realizado por Yang y col. (2018), donde se sometieron corazones de ratas a isquemia por 30 minutos y 2 horas de reperfusión tratados con polisacáridos de alcanfor y se observó que en el grupo control los niveles de CK aumentaban dramáticamente luego de la isquemia, no así en el caso de los corazones tratados (82).

Esto se puede asociar a que los corazones utilizados durante la etapa basal aún no han sido sometidos a grandes niveles de isquemia por lo que en este caso actuarían generando un efecto cardioprotector los niveles de S-nitrosilación endógena, lo que se reflejaría en un menor daño cardíaco y por ende menores niveles de enzimas cardíacas en el líquido de perfusión. Además, en el caso del grupo tratado con inhibidor de GSNOR, la inhibición de esta enzima potencia la actividad cardioprotectora, lo que permite que el grupo sometido a la droga en esta etapa del proceso presente niveles de daño cardíaco menores (59).

Una de las moléculas a la que más efectos cardioprotectores se le han asociado es el óxido nítrico (NO), el cual a través de una reacción denominada S-nitrosilación tiene un efecto positivo sobre el tejido cardíaco. Esta reacción se caracteriza porque permite la formación de enlaces nitrosotioles a nivel postraduccional al agregar grupos NO al grupo tiol presente en la cisteína, impidiendo de esta forma la oxidación de las proteínas cardíacas ricas en estos residuos y específicamente inhibe la apertura del poro de permeabilidad mitocondrial, lo que genera efectos positivos sobre el tejido cardíaco afectado por procesos de isquemia y la posterior reperfusión (71).

La técnica de biotin switch es la única que se dirige al átomo de azufre en una proteína S-nitrosilada. Como emplea el etiquetado covalente de las proteínas S-nitrosiladas, puede detectar estas proteínas individuales en una mezcla compleja, ya que el etiquetado se agrega a la proteína de interés. Como se observa en la figura 16 existe la presencia de proteínas mitocondriales S-nitrosiladas, las cuales fueron sometidas a una separación con estreptavidina-agarosa que solo separa proteínas que son altamente biotiniladas. Se realizó un Western blot, evidenciando cinco proteínas mitocondriales específicas, las cuales eran de menor a mayor peso molecular: IMS Cyt c que funciona como transportador electrónico mitocondrial entre los complejos respiratorios III y IV, CypD que actúa como regulador del poro mitocondrial, VDAC-1 que funciona como un poro no selectivo para aniones y cationes, Core-I asociada al complejo III que está implicada principalmente en la cadena transportadora de electrones, y el complejo V de la ATP sintasa que permite el transporte de protones a través de la membrana mitocondrial interna para la producción de ATP (17).

Posteriormente se midió los niveles de expresión de las distintas proteínas mitocondriales S-nitrosiladas, es decir, el complejo V, IM Core-I, VDAC-1, CypD y Cyt-c, con el objetivo de evaluar la existencia de algún predominio en la S-nitrosilación de algunas de las proteínas mencionadas, ya sea en muestras de homogeneizado de corazón de rata sin inhibidor de la GSNOR y en muestras sometidas a tratamiento de inhibición enzimática de la GSNOR (figura 17). En todos los casos se observó un aumento en los

niveles de S-nitrosilación de las proteínas en las muestras de homogeneizado de corazón de rata que fueron sometidas al inhibidor de la GSNOR, en comparación con el grupo control que eran las muestras no tratadas con el inhibidor. Sin embargo, solamente en el nivel de S-nitrosilación de la ciclofilina D (Cyp D) (figura 17D) se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,0314$), siendo la diferencia entre el resto de las proteínas no significativa ($p>0,05$). La ciclofilina D tal como se mencionó anteriormente es una importante proteína ubicada en la matriz mitocondrial, cuya función es regular la activación del poro de permeabilidad mitocondrial cuya apertura permite la entrada de calcio a la mitocondria, de acuerdo a estudios realizados por Clarke y col. (2002) la ciclosporina A y la sangliferina A tienen la capacidad de inducir la inhibición de CypD, afectando de este modo el efecto regulador de esta proteína e impidiendo la apertura del poro de permeabilidad mitocondrial (83, 84). De este modo la ciclofilina D al ser la proteína que regula el poro de permeabilidad mitocondrial, puede ser target de inductores o inhibidores de la apertura del poro, por lo tanto, la SNO de esta a nivel fisiológico, actuaría generando un efecto cardioprotector en procesos de isquemia reperfusión.

Otro de los estudios realizados (figura 18) fue un Western blot con muestras de homogeneizado de corazón de rata, al igual que en el experimento anterior, tres de ellos fueron usados como grupo control y tres fueron sometidos al inhibidor de GSNOR, evidenciando la existencia de las distintas proteínas mitocondriales presentes en cada una de las muestras, es decir, el complejo V, IM Core-I, VDAC-1, CypD e IMS Cyt c. Además, en dicho Western blot fue cargada una muestra que correspondía a pellet de corazón y dos muestras que correspondían a sobrenadantes de corazón, estas últimas presentando una menor cantidad de proteínas mitocondriales, evidenciado por una menor intensidad en la expresión de la banda en el Western blot, en comparación con el pellet de corazón que se obtendrá mediante una centrifugación de la muestra quedando en su contenido una mayor cantidad de proteínas mitocondriales.

Del Western blot que muestra las proteínas mitocondriales de los homogeneizados de corazón de rata, se les realizó la cuantificación de píxeles para obtener los niveles de

expresión de las distintas proteínas mitocondriales (figura 19), haciendo la comparación para cada una de ellas entre el grupo control (corazones sin inhibidor de GSNOR) y los corazones que fueron sometidos al inhibidor enzimático de la GSNOR. Para cada una de las proteínas no se observaron mayores diferencias en el nivel de expresión de ellas, por lo tanto, la comparación no tuvo diferencias significativas entre ambos grupos de estudio. GSNOR desempeña un papel importante en la regulación de los niveles de S-nitrosilación al mediar el catabolismo. En un estudio realizado por Lima y col. (2009) se demostró que eliminar genéticamente la GSNOR tiene una función protectora en corazones masculinos (72), probablemente por los niveles mejorados de proteínas S-nitrosiladas. Sin embargo, según lo descrito en el estudio de Qin Shao y col. (2016), la actividad de GSNOR es significativamente mayor en los corazones femeninos, por lo tanto, es poco probable que los inhibidores de GSNOR contribuya al aumento en los niveles de S-nitrosilación (85).

En la figura 20 se analizó la relación entre el grado de S-nitrosilación y las proteínas mitocondriales totales (el complejo V, IM Core-I, VDAC-1, CypD e IMS Cyt c), tanto en las muestras controles como en las sometidas al inhibidor de GSNOR, donde se observó que las figuras 20B, 20C y 20E no se encontró significancia alguna ($p > 0,05$). Sin embargo, en la figura 20A, que corresponde al complejo V ($F_1 F_0$ ATP sintasa) se observó una diferencia entre los grupos, siendo mayor la relación SNO/Total complejo V, de esta proteína en las muestras sometidas a inhibidor de GSNOR ($p = 0,05$), así también se observó un aumento significativo de la misma relación para la Cyp D ($p = 0,05$). Como ya se mencionó anteriormente el complejo V se caracteriza por ser un complejo enzimático, compuesto por múltiples dominios proteicos como el dominio catalítico, el dominio translocador y el tallo lateral que contiene la proteína OSCP, que se caracteriza por conferir sensibilidad a oligomicina, actuando como punto de regulación del complejo V. Además, investigaciones recientes realizadas por Giorgio y col. (2018) han propuesto que la ciclofilina D tiene un efecto inhibitor del 30% de la actividad de $F_1 F_0$ ATP sintasa, esta inhibición se realiza a través de la inhibición farmacológica de ciclofilina D con moléculas como la ciclosporina A, lo que conlleva a la inhibición del complejo a través de la interacción de la ciclofilina D con la proteína OSCP (39).

La S-nitrosilación es una modificación dependiente del óxido nítrico, el cual se genera por la NO sintasa (NOS) en el miocardio. Existen varias isoformas NOS constitutivas, la NOS endotelial (eNOS) y la NOS neuronal (nNOS), así como una isoforma inducible (iNOS). De esta forma, otro de los estudios realizados a través de un Western blot, fue el análisis de los niveles de óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), ya sea para los grupos control (sin inhibidor de GSNOR) y para el grupo que fue sometido al inhibidor de GSNOR. Con esto se pudo evidenciar la presencia de esta isoforma de NOS en todas las muestras de corazón, la cual corresponde a la banda ubicada aproximadamente en el peso molecular de 135 kDa (figura 21). Estudios realizados por Scherrer-Crosbie y col. (2001) demostraron que eNOS está involucrado luego de un infarto agudo al miocardio y que ratones que son deficientes en eNOS exhiben una mayor mortalidad y remodelación adversa post infarto agudo al miocardio (86). Por el contrario, se ha demostrado que la sobreexpresión de eNOS miocárdica mejora los efectos del infarto agudo al miocardio (87), sin embargo, debe seguir estudiándose la base molecular para esto.

Finalmente, todos los efectos del inhibidor de GSNOR mencionados anteriormente se vieron respaldados por la figura 22, donde se evaluó el nivel de expresión del óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en los homogenizados cardiacos llegando a la conclusión de que en ambos grupos los niveles de expresión de esta enzima no eran distintos ($p > 0,05$). De este modo los niveles significativos de S-nitrosilación detectados anteriormente en las figuras 17 y 20, podrían estar relacionados al efecto inhibitor sobre GSNOR de la droga utilizada en el estudio y no a una elevación de los niveles de eNOS.

9. CONCLUSIÓN

La isquemia reperfusion es un proceso fisiopatológico que genera distintas alteraciones a nivel intracelular, especialmente a nivel de la mitocondria donde genera cambios metabólicos y estructurales, los cuales en tejidos como el cardiaco conlleva a un aumento del daño tisular, lo que genera un aumento en la liberación de enzimas cardiacas tales como lactato deshidrogenasa y creatina kinasa. En relación a nuestros resultados, ante la presencia del inhibidor de GSNOR, disminuyó la liberación de estas enzimas durante el proceso de isquemia reperfusion.

El empleo de un inhibidor de GSNOR aumentó los niveles de S-nitrosilación de la ciclofilina D (CypD) y del complejo V (F₁ F₀ ATP sintasa) detectados a través de la técnica del biotin switch, cuya acción es actuar como regulador del poro de permeabilidad mitocondrial, complejo proteico crucial en la patogénesis del daño por isquemia reperfusion, sin embargo, no se encontraron aumentos significativos para el complejo I/III, VDAC y Cyt-c.

La utilización de la técnica del biotin switch, es una forma muy útil para evaluar la S-nitrosilación en muestras biológicas, sin embargo, se caracteriza porque es una técnica cuyo comportamiento depende de factores tanto físicos como químicos que afectan la unión de los nitrosioles, como la luminosidad, agentes reductores y las temperaturas elevadas.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. De Micheli A, Iturralde P, Aranda A. Orígenes del conocimiento de la estructura y función del sistema cardiovascular. 2013. p. 225-31.
2. Gómez LA. [Cardiovascular diseases: a public health problem and a global challenge]. *Biomedica*. 2011;31(4):469-73.
3. Morciano G, Giorgi C, Bonora M, Punzetti S, Pavasini R, Wieckowski MR, et al. Molecular identity of the mitochondrial permeability transition pore and its role in ischemia-reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015;78:142-53.
4. Moreno PR, del Portillo JH. Isquemia miocárdica: conceptos básicos, diagnóstico e implicaciones clínicas. Segunda parte. *Revista Colombiana de Cardiología*. 2016;23(6):500-7.
5. María Cristina EF. Prevención del riesgo cardiovascular: políticas chilenas. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2012;23(6):651-5.
6. Karch J, Molkenin JD. Identity of the elusive mitochondrial permeability transition pore: what it might be, what it was, and what it still could be. *Current Opinion in Physiology*. 2018;3:57-62.
7. Ong S-B, Samangouei P, Kalkhoran SB, Hausenloy DJ. The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015;78:23-34.
8. 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.
9. Gonzalez DR, Treuer A, Sun QA, Stamler JS, Hare JM. S-Nitrosylation of cardiac ion channels. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2009;54(3):188-95.
10. Al-Salam S, Hashmi S. Myocardial Ischemia Reperfusion Injury: Apoptotic, Inflammatory and Oxidative Stress Role of Galectin-3. *Cell Physiol Biochem*. 2018;50(3):1123-39.

11. Kong L, Liang F, Chen Y, Wei M, Sun N, Zhu J, et al. [Na⁺/Ca²⁺ exchanger mediates ischemia-reperfusion injury by activation of CaMKII in isolated rat heart]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2018;43(1):28-34.
12. Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP, Vrints CJ. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *Int J Cardiol*. 2005;100(2):179-90.
13. Gutiérrez H, Iñarra F, Galván G, Valenzuela J, Chávez J. Utilidad de la infusión intracoronaria de *Alteplase* con microcatéter en síndromes coronarios agudos. México: *Revista Mexicana de Cardiología*; 2017.
14. Hansson MJ, Llwyd O, Morin D, de Paulis D, Arnoux T, Gouarné C, et al. Differences in the profile of protection afforded by TRO40303 and mild hypothermia in models of cardiac ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol*. 2015;760:7-19.
15. Harris DA, Das AM. Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart. *Biochem J*. 1991;280 (Pt 3):561-73.
16. Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33(6):1065-89.
17. Kwong Jennifer Q, Molckentin Jeffery D. Physiological and Pathological Roles of the Mitochondrial Permeability Transition Pore in the Heart. *Cell Metabolism*. 2015;21(2):206-14.
18. Briston T, Selwood DL, Szabadkai G, Duchen MR. Mitochondrial Permeability Transition: A Molecular Lesion with Multiple Drug Targets. *Trends Pharmacol Sci*. 2018.
19. Bonora M, Bononi A, De Marchi E, Giorgi C, Lebedzinska M, Marchi S, et al. Role of the c subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Cell Cycle*. 2013;12(4):674-83.
20. Haworth RA, Hunter DR. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Arch Biochem Biophys*. 1979;195(2):460-7.
21. Halestrap AP. What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol*. 2009;46(6):821-31.
22. Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res*. 2004;61(3):372-85.

23. Crompton M, Virji S, Ward JM. Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem.* 1998;258(2):729-35.
24. Grimm S, Brdiczka D. The permeability transition pore in cell death. *Apoptosis.* 2007;12(5):841-55.
25. Millay DP, Sargent MA, Osinska H, Baines CP, Barton ER, Vuagniaux G, et al. Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy. *Nat Med.* 2008;14(4):442-7.
26. Parodi-Rullán RM, Soto-Prado J, Vega-Lugo J, Chapa-Dubocq X, Díaz-Cordero SI, Javadov S. Divergent Effects of Cyclophilin-D Inhibition on the Female Rat Heart: Acute Versus Chronic Post-Myocardial Infarction. *Cell Physiol Biochem.* 2018;50(1):288-303.
27. Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, et al. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature.* 2005;434(7033):652-8.
28. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature.* 2005;434(7033):658-62.
29. Szabó I, De Pinto V, Zoratti M. The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. II. The electrophysiological properties of VDAC are compatible with those of the mitochondrial megachannel. *FEBS Lett.* 1993;330(2):206-10.
30. Messina A, Reina S, Guarino F, De Pinto V. VDAC isoforms in mammals. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1818(6):1466-76.
31. Klingenberg M. The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1778(10):1978-2021.
32. Brustovetsky N, Tropschug M, Heimpel S, Heidkämper D, Klingenberg M. A large Ca²⁺-dependent channel formed by recombinant ADP/ATP carrier from *Neurospora crassa* resembles the mitochondrial permeability transition pore. *Biochemistry.* 2002;41(39):11804-11.
33. Kolbe HV, Costello D, Wong A, Lu RC, Wohlrab H. Mitochondrial phosphate transport. Large scale isolation and characterization of the phosphate transport protein from beef heart mitochondria. *J Biol Chem.* 1984;259(14):9115-20.

34. Alcalá S, Klee M, Fernández J, Fleischer A, Pimentel-Muñoz FX. A high-throughput screening for mammalian cell death effectors identifies the mitochondrial phosphate carrier as a regulator of cytochrome c release. *Oncogene*. 2008;27(1):44-54.
35. Alavian KN, Beutner G, Lazrove E, Sacchetti S, Park HA, Licznarski P, et al. An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F1FO ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(29):10580-5.
36. Liu S, Charlesworth TJ, Bason JV, Montgomery MG, Harbour ME, Fearnley IM, et al. The purification and characterization of ATP synthase complexes from the mitochondria of four fungal species. *Biochem J*. 2015;468(1):167-75.
37. Vinothkumar KR, Montgomery MG, Liu S, Walker JE. Structure of the mitochondrial ATP synthase from. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(45):12709-14.
38. Preiss L, Langer JD, Yildiz Ö, Eckhardt-Strelau L, Guillemont JE, Koul A, et al. Structure of the mycobacterial ATP synthase Fo rotor ring in complex with the anti-TB drug bedaquiline. *Sci Adv*. 2015;1(4):e1500106.
39. Giorgio V, Fogolari F, Lippe G, Bernardi P. OSCP subunit of mitochondrial ATP synthase: Role in regulation of enzyme function and of its transition to a pore. *Br J Pharmacol*. 2018.
40. Giorgio V, von Stockum S, Antoniel M, Fabbro A, Fogolari F, Forte M, et al. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(15):5887-92.
41. Lu P, Lill H, Bald D. ATP synthase in mycobacteria: special features and implications for a function as drug target. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1837(7):1208-18.
42. Karch J, Kwong JQ, Burr AR, Sargent MA, Elrod JW, Peixoto PM, et al. Bax and Bak function as the outer membrane component of the mitochondrial permeability pore in regulating necrotic cell death in mice. *Elife*. 2013;2:e00772.
43. Whelan RS, Konstantinidis K, Wei AC, Chen Y, Reyna DE, Jha S, et al. Bax regulates primary necrosis through mitochondrial dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(17):6566-71.
44. Balaban RS. The role of Ca(2+) signaling in the coordination of mitochondrial ATP production with cardiac work. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1787(11):1334-41.

45. Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, et al. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*. 2011;476(7360):341-5.
46. Palty R, Silverman WF, Hershinkel M, Caporale T, Sensi SL, Parnis J, et al. NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(1):436-41.
47. Tsai MF, Jiang D, Zhao L, Clapham D, Miller C. Functional reconstitution of the mitochondrial Ca²⁺/H⁺ antiporter Letm1. *J Gen Physiol*. 2014;143(1):67-73.
48. Piantadosi CA. Regulation of mitochondrial processes by protein S-nitrosylation. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(6):712-21.
49. Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev*. 2008;88(2):581-609.
50. Mewton N, Croisille P, Gahide G, Rioufol G, Bonnefoy E, Sanchez I, et al. Effect of cyclosporine on left ventricular remodeling after reperfused myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(12):1200-5.
51. Yu X, Ge L, Niu L, Lian X, Ma H, Pang L. The Dual Role of Inducible Nitric Oxide Synthase in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: Friend or Foe? *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:8364848.
52. Picón-Pagès P, Garcia-Buendia J, Muñoz FJ. Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018.
53. Iyer AK, Rojanasakul Y, Azad N. Nitrosothiol signaling and protein nitrosation in cell death. *Nitric Oxide*. 2014;42:9-18.
54. Sun J, Murphy E. Protein S-nitrosylation and cardioprotection. *Circ Res*. 2010;106(2):285-96.
55. Kanai AJ, Pearce LL, Clemens PR, Birder LA, VanBibber MM, Choi SY, et al. Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(24):14126-31.
56. Lacza Z, Pankotai E, Busija DW. Mitochondrial nitric oxide synthase: current concepts and controversies. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14:4436-43.
57. Foster MW, Hess DT, Stamler JS. Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends Mol Med*. 2009;15(9):391-404.

58. Guo Y, Li Q, Wu WJ, Tan W, Zhu X, Mu J, et al. Endothelial nitric oxide synthase is not necessary for the early phase of ischemic preconditioning in the mouse. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;44(3):496-501.
59. Hayashida K, Bagchi A, Miyazaki Y, Hirai S, Seth D, Silverman MG, et al. Improvement in Outcomes After Cardiac Arrest and Resuscitation by Inhibition of S-Nitrosoglutathione Reductase. *Circulation.* 2018.
60. Schiewer CE, Müller CS, Dechert S, Bergner M, Wolny JA, Schünemann V, et al. Effect of Oxidation and Protonation States on [2Fe-2S] Cluster Nitrosylation Giving {Fe(NO)}. *Inorg Chem.* 2018.
61. Nikolaienko R, Bovo E, Zima AV. Redox Dependent Modifications of Ryanodine Receptor: Basic Mechanisms and Implications in Heart Diseases. *Front Physiol.* 2018;9:1775.
62. Devarie-Baez NO, Zhang D, Li S, Whorton AR, Xian M. Direct methods for detection of protein S-nitrosylation. *Methods.* 2013;62(2):171-6.
63. Wang H, Xian M. Chemical methods to detect S-nitrosation. *Curr Opin Chem Biol.* 2011;15(1):32-7.
64. Jaffrey SR, Snyder SH. The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Sci STKE.* 2001;2001(86):p11.
65. 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.
66. Jensen DE, Belka GK, Du Bois GC. S-Nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *Biochem J.* 1998;331 (Pt 2):659-68.
67. Barnett SD, Buxton ILO. The role of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in human disease and therapy. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2017;52(3):340-54.
68. Hur MW, Edenberg HJ. Cloning and characterization of the ADH5 gene encoding human alcohol dehydrogenase 5, formaldehyde dehydrogenase. *Gene.* 1992;121(2):305-11.
69. Fernández MR, Biosca JA, Parés X. S-nitrosoglutathione reductase activity of human and yeast glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and its nuclear and cytoplasmic localisation. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60(5):1013-8.
70. Galter D, Carmine A, Buervenich S, Duester G, Olson L. Distribution of class I, III and IV alcohol dehydrogenase mRNAs in the adult rat, mouse and human brain. *Eur J Biochem.* 2003;270(6):1316-26.

71. 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).
72. Lima B, Lam GK, Xie L, Diesen DL, Villamizar N, Nienaber J, et al. Endogenous S-nitrosothiols protect against myocardial injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(15):6297-302.
73. González A. *Principios de Bioquímica Clínica y Patología Molecular* 2010.
74. Lehninger A. *Principios de Bioquímica* 2007.
75. DdiUd T. Comité institucional de ética, cuidado y uso de animales de laboratorio (CIEQUAL) 2016 [Available from: <http://di.utralca.cl/html/comites/ciecual.html>].
76. Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 2011;50(6):940-50.
77. Theriault M. *Reconocimiento inmune de Candida Albicans en el pez cebra Maine*: Maine University; 2016.
78. OMS. *Cardiovascular Diseases* 2019 [Available from: https://www.who.int/cardiovascular_diseases/es/].
79. Zhang J, Zhou H, Liu J, Meng C, Deng L, Li W. Protective effects of hydrogen inhalation during the warm ischemia phase against lung ischemia-reperfusion injury in rat donors after cardiac death. *Microvasc Res.* 2019:103885.
80. Huang S, Zheng B, Jin X, Yu Q, Zhang X, Sun X, et al. Blockade of Cyclophilin D Attenuates Oxidative Stress-Induced Cell Death in Human Dental Pulp Cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:1729013.
81. Halestrap AP. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans.* 2006;34(Pt 2):232-7.
82. Yang Y, Han C, Wang Y, Zhang X, Guo L, Guan Q. [Protective effect of polysaccharide pretreatment on myocardial ischemia reperfusion injury in rats]. *Wei Sheng Yan Jiu.* 2018;47(6):988-92.
83. Clarke SJ, McStay GP, Halestrap AP. Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A. *J Biol Chem.* 2002;277(38):34793-9.

84. Ostadal B, Drahota Z, Houstek J, Milerova M, Ostadalova I, Hlavackova M, et al. Developmental and sex differences in cardiac tolerance to ischemia-reperfusion injury: the role of mitochondria. *Can J Physiol Pharmacol*. 2019;1-7.
85. Shao Q, Fallica J, Casin KM, Murphy E, Steenbergen C, Kohr MJ. Characterization of the sex-dependent myocardial S-nitrosothiol proteome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;310(4):H505-15.
86. Scherrer-Crosbie M, Ullrich R, Bloch KD, Nakajima H, Nasser B, Aretz HT, et al. Endothelial nitric oxide synthase limits left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation*. 2001;104(11):1286-91.
87. Janssens S, Pokreisz P, Schoonjans L, Pellens M, Vermeersch P, Tjwa M, et al. Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 improves left ventricular performance and reduces compensatory hypertrophy after myocardial infarction. *Circ Res*. 2004;94(9):1256-62.