

Índice general

	Página
1. Resumen.....	6
2. Introducción	7
3. Revisión Bibliográfica.....	9
3.1 Antecedentes generales sobre Enfermedades Cardiovasculares (ECV).....	9
3.1.1 Mortalidad.....	9
3.1.2 Prevalencia de Factores de riesgo Cardiovascular.....	9
3.2 Plaquetas.....	11
3.2.1 Estructura y Función plaquetaria.....	11
3.2.2 Receptores plaquetarios.....	13
3.3 Vías de señalización intracelular plaquetarias.....	14
a) Señalización vía adenilato ciclasa.....	14
b) Señalización por la cascada del fosfoinosítido.....	14
c) Señalización a través de la vía de las Mapas.....	15
3.3.1 Proteínas involucradas con la función plaquetaria.....	15
a) RTKs.....	15
b) MLCK.....	16
c) PTKs.....	16
d) PKA.....	16
e) PKC.....	17
3.4 Estudios de PKC en plaquetas.....	18
3.5 Métodos de estudio de PKC.....	22
4. Objetivos.....	26
4.1 Objetivo general.....	26
4.2 Objetivos específicos.....	26
5. Materiales y Métodos.....	27
5.1 Obtención y preparación de plaquetas.....	28
5.1.1 Selección de donante de muestra sanguínea.....	28
5.1.2 Muestra.....	28
a) Reactivos.....	28
b) Insumos.....	29
5.1.3 Obtención de plaquetas y lavado	29

5.1.3.1	Condiciones aplicadas.....	30
a)	pH.....	30
b)	Velocidad y Temperatura de centrifugación.....	31
c)	Temperatura	31
d)	Fuerza mecánica.....	32
a)	Reactivos.....	33
b)	Equipos	34
5.1.4	Preparación de las muestras.....	34
5.1.4.1	Lisado de plaquetas.....	34
a)	Reactivos.....	34
b)	Equipos.....	35
5.1.4.2	Cuantificación de proteínas por método de Bradford.....	35
a)	Reactivos.....	36
5.1.4.3	Preparación de proteínas plaquetarias.....	36
5.2	Western Blot.....	37
5.2.1	Electroforesis.....	37
5.2.2	Preparación del gel de poliacrilamida.....	37
a)	Reactivos.....	39
b)	Equipos.....	40
5.2.3	Condiciones de la electroforesis.....	41
5.2.4	Transferencia.....	42
5.2.4.1	Procedimiento.....	42
a)	Reactivos.....	43
b)	Equipos.....	43
5.2.5	Incubación con anticuerpos y revelado.....	44
5.2.5.1	Procedimiento.....	44
a)	Bloqueo de la membrana.....	44
b)	Incubación con anticuerpos y lavado de membrana.....	45
c)	Revelado.....	46
a)	Reactivos.....	46
b)	Equipo.....	47
6.	Resultados.....	48
6.1	Lavados plaquetarios.....	48
6.2	Lisado de plaquetas y cuantificación de proteínas.....	49
6.3	Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	50
6.4	Incubación con anticuerpos y revelado.....	52
7.	Discusión.....	54
8.	Conclusiones.....	57
9.	Referencias Bibliográficas.....	58
10.	Anexos.....	64

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Representación esquemática de la estructura de la plaqueta.....	12
Figura 2. Representación esquemática del receptor acoplado a proteína G y la activación de la PKC con la formación de segundos mensajeros.....	18
Figura 3. Tubos con sangre extraída de donante único y mantenidas en hielo...	29
Figura 4. Modelo de un gel de poliacrilamida polimerizado y montado en los soportes de la cámara de electroforesis.....	38
Figura 5. Dot blot realizado con las mismas muestras como control positivo del procedimiento.....	50
Figura 6. Gel de poliacrilamida teñido con Azul de Comassie G-250 evidenciando la presencia de proteínas plaquetarias en la muestra utilizada.....	52
Figura 7. Membrana revelada en un film indicando la banda correspondiente a la PKC isoformas α , β y γ	53

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Protocolo de la curva de calibración utilizada para la cuantificación de proteínas plaquetarias por el método de Bradford.....	35
Tabla 2. Volúmenes de las distintas soluciones empleados para preparar geles de aproximadamente 6x8 cm.....	35
Tabla 3. Resultado de los recuentos plaquetarios de diferentes muestras indicando las distintas condiciones aplicadas para cada una de ellas.....	48
Tabla 4. Curva de calibración para proteínas plaquetarias y muestras con las respectivas absorbancias.....	49
Tabla 5. Curva de concentraciones a partir de la muestra nº6.....	50