

UCH-FC
Biotecnología
C828
C.L



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO

**“PROTEÓMICA DIFERENCIAL: UNA HERRAMIENTA PARA
CONOCER EL AMBIENTE PROTEICO DEL CORAZÓN Y
PLASMA, DURANTE LA MOVILIZACIÓN DE CÉLULAS
TRONCALES MESENQUIMÁTICAS EN RATAS INFARTADAS”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

CAROLINA CORTÉS BROWN

Directora de Seminario de Título: Dra. Paulette Conget Molina



Octubre 2008
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta. Carolina Cortés Brown

“PROTEÓMICA DIFERENCIAL: UNA HERRAMIENTA PARA CONOCER EL AMBIENTE PROTEICO DEL CORAZÓN Y PLASMA, DURANTE LA MOVILIZACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMÁTICAS EN RATAS INFARTADAS”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Dra. Paulette Conget Molina
Directora Seminario de Título

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Paulette', written over a horizontal line.

Comisión de Evaluación

Dr. Alejandro Roth Metcalfe
Presidente Comisión

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line.



Dr. Ricardo Cabrera Paucar
Evaluador

A handwritten signature in blue ink, written over a horizontal line.

Santiago de Chile, 28 de enero de 2010



BIOGRAFIA



Nací en Santiago el año 1980, mi familia está conformada por mi madre, Lidia Brown Calderón, mi padre, Hernán Cortés Serrano, mi hermana menor, Claudia Cortés Brown, y mi abuela, Iris Serrano Pizarro. Es una hermosa familia, a ella, debo todo en la vida.

A temprana edad desarrollé mi primer emprendimiento biotecnológico, comercialicé entre mis vecinos un producto para “matar hormigas”, desarrollado en base a cascara de nueces verdes y agua. Hoy sé que la muerte de las hormigas no estaba ligada a los compuestos de la cascara de nuez, estas morían ahogadas, pero pese a ello estos fueron mis primeros pasos en la senda que he seguido en mi vida.

En el año 2002 ingresé a la carrera de Biotecnología con el interés de obtener conocimientos y habilidades que me permitiesen realizar investigación que tuviese un impacto importante en el bienestar de la población, pues tengo un particular interés en el área biomédica. Gracias a la carrera aprendí de disciplina y perseverancia, y fortalecí mi interés por el saber. Un hito importante fue el conocer a Ricardo Nilo, mi pololo, quien no sólo me entregó su amor incondicional sino que fue un gran apoyo en el desarrollo de mi memoria.

Al finalizar mi seminario de título, realicé un Magíster en Gestión Tecnológica. Actualmente, soy socia y Gerente General de Innpulso Ltda., empresa de Gestión Tecnológica que busca actuar como interface entre el mundo científico y el mundo empresarial, impulsando el desarrollo de innovaciones de base biotecnológica.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia, por el amor que siempre me han entregado, por la educación que hoy me permite ser quien soy, y por la confianza que permanentemente han depositada en mí. Agradezco a Dios por mi familia.

Doy las gracias a Ricardo, mi pololo, con quien no sólo nos une el amor de pareja sino también el amor por la ciencia. Agradezco el apoyo incondicional que me has entregado y tu paciencia en etapas difíciles, en las que el tiempo es un bien escaso. Soy muy feliz estando junto a ti.

A mis amigos les doy mil gracias, soy afortunada de tenerlos a mí lado. Paty Luz, Daniel Medina, Juan Ugalde, Rodrigo Somoza y Nicolás Nazal, gracias por todo el apoyo y cariño entregado durante el transcurso de esta memoria. Patricia González, Enzo Pantoja y Rodolfo Pardo, más que compañeros de oficina, amigos, los quiero mucho.

Agradezco a mi tutora, Dra. Paulette Conget, por todos los conocimientos entregados y al Dr. Ariel Orellana por todo el apoyo que me brindó durante las muchas horas que pase en su laboratorio. Agradezco a su grupo de investigación, es un grupo humano maravilloso, pase gratos momentos junto a ellos.

Finalmente, doy gracias a cada una de las personas con las que he compartido de alguna u otra forma en la vida, todas han marcado de alguna manera mi camino.



ABREVIATURAS

ADN:	ácido desoxirribonucleico
ADNmt:	ácido desoxirribonucleico mitocondrial
Apo:	apolipoproteína
ARN:	ácido ribonucleico
ARNm:	ácido ribonucleico mensajero
ASB-14:	3 - [N,N - Dimetil (3 - miristoilaminopropil) amonio] propanosulfonato amidosulfobetaina
ASC:	células troncales adultas
ATP:	trifosfato de adenosina
BSA:	albumina sérica bovina
°C:	grados Celsius
CA:	anhidrasa carbónica
CHAPS:	[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato
cm:	centímetros
cmH ₂ O:	centímetros de agua
CO ₂ :	dióxido de carbono
CRP:	proteína C-reactiva
CV:	coeficiente de variación
DTT:	ditiotreitól
EDTA:	ácido etileno diamino tetracético
EPC:	células precursoras endoteliales
Fe ²⁺ :	ion hierro (II) o ferroso



G:	Gaugh
G-CSF:	factor de estimulación de colonias de granulocitos
GDA:	guanina deaminasa
gr:	gramos
H ⁺ :	protón
HCl:	ácido clorhídrico
HCO ₃ ⁻ :	bicarbonato
HDL:	lipoproteínas de alta densidad
HGF:	factor de crecimiento de hepatocitos
HMGB1:	grupo de alta movilidad caja 1
H ₂ O:	agua
H ₂ O ₂ :	agua oxigenada
HPX:	hemopexina
HSC:	células troncales hematopoyéticas
hrs:	horas
IEF:	isoelectroenfoque
Ig:	inmunoglobulina
IL:	interleuquina
IM:	infarto al miocardio
IPG:	gradiente de pH inmovilizado
kDa:	kilodalton
Kg:	kilogramo
M:	molar
MCP:	proteína del cofactor de membrana

mg:	miligramos
min:	minutos
ml:	mililitro
mM:	milimolar
MSC:	células troncales mesenquimáticas
MS/MS:	espectrometría de masa en tándem
Ndufa 10:	deshidrogenasa (ubiquinona) 1 alfa subcomplejo 10
ng:	nanogramo
NL:	no lineales
nm:	nanómetros
NaF:	fluoruro de sodio
Na ₂ CO ₃ :	carbonato de sodio
NaHCO ₃ :	carbonato hidrogenado de sodio
Na ₃ VO ₄ :	ortovanadato de sodio
O ₂ ⁻ :	radical anión superóxido
PAGE:	electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS:	solución tampón fosfato
PDI:	proteína disulfuro isomerasa
pg:	picogramo
pI:	punto isoelectrico
PM:	peso molecular
PMSF:	fenilmetilsulfonil fluoruro
Prx:	peroxiredoxina
RE:	retículo endoplasmático

ROS:	especies reactivas de oxígeno
SDF-1:	factor derivado de célula estromal 1
SDS:	dodecil sulfato de sodio
TCEP:	tris (2-carboxietil) fosfina
TNF- α :	factor de necrosis tumoral alfa
Tris:	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
TTR:	transtiretina
μ l:	microlitro
μ M:	micromolar
μ m:	micrómetro
UPR:	respuesta a proteínas mal plegadas
V:	volt
%V:	porcentaje volumen
VEGF:	factor de crecimiento endotelial vascular
Vh:	volteos hora
W:	watt
XO:	xantina oxidasa

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Células troncales mesenquimáticas y su uso en terapia celular cardíaca	6
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	15
Objetivo General	15
Objetivos Específicos.....	15
CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO	16
Tipo estudio.....	16
Modelo animal	16
Diseño del estudio	16
Consideraciones bioéticas	18
REACTIVOS	19
METODOLOGÍA	21
Resección de ventrículo izquierdo	21
Obtención de plasma	21
Infarto cardíaco quirúrgico en ratas	22
Extracción de proteínas de ventrículo izquierdo	23

Remoción de albumina e inmunoglobulinas de las muestras de plasma.....	24
Cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford	24
Construcción de <i>pooles</i>	25
Corrida de la primera dimensión: Isoelectroenfoque	27
Pretratamiento de las muestras previo la corrida de la segunda dimensión	27
Corrida de la segunda dimensión	28
Tinción de las proteínas separadas en los geles bi-dimensionales	29
Tinción con Nitrato de Plata	29
Tinción con Deep Purple	30
Recorte virtual de imágenes	31
Sobreposición de imágenes	31
Generación de imágenes de fusión.....	32
Detección y cuantificación de spots	33
Identificación de las proteínas.....	35
RESULTADOS.....	37
Puesta a punto de un protocolo de extracción eficiente de proteínas de corazón de rata, estandarización de las condiciones de corrida para la primera y segunda dimensión, y determinación de la tinción más adecuada.....	37
Extracción de proteínas del ventrículo izquierdo de rata.....	37
Implementación de geles bi-dimensionales de proteínas de ventrículo izquierdo de rata.....	38
Optimización de la separación de las proteínas a nivel de la primera dimensión	38
Optimización de la resolución de los <i>spots</i> en la segunda dimensión.....	40

Optimización del enfoque de las proteínas durante la primera dimensión.....	41
Optimización de la separación de los <i>spots</i> a nivel de la segunda dimensión.....	42
Tinción de los geles bi-dimensionales de proteínas de ventrículo izquierdo de rata	43
Puesta a punto de un protocolo de extracción eficiente de proteínas de plasma de rata, estandarización de las condiciones de corrida para la primera y segunda dimensión, y determinación de la tinción más adecuada.....	45
Extracción de proteínas de sangre de rata.....	45
Remoción de albumina e inmunoglobulinas.....	45
Implementación de los geles bi-dimensionales de proteínas de plasma de rata.....	46
Implementación del modelo de infarto cardíaco quirúrgico en ratas	48
Identificación de las proteínas que se encuentran diferencialmente en el ventrículo izquierdo de ratas sham e infartadas al quinto día post-procedimiento quirúrgico.....	50
Identificación de las proteínas que se encuentran diferencialmente en el plasma de ratas sham e infartadas al quinto día post-procedimiento quirúrgico	56
DISCUSIÓN	61
Puesta a punto de un protocolo de extracción eficiente de proteínas de corazón y plasma de rata, estandarización de las condiciones de corrida para la primera y segunda dimensión, y determinación de la tinción más adecuada.....	61
Implementación de infarto quirúrgico en ratas	67
Identificación de las proteínas que se encuentran diferencialmente en el ventrículo izquierdo de ratas infartadas al quinto día post-IM.....	69
Anhidrasa Carbónica II.....	70
Cadena liviana de la Ferritina	71

Cadena pesada de la miosina, polipéptido 6 (fragmento)	73
Disulfuro isomerasa 3	74
DJ-1	76
Guanina desaminasa	76
NADH deshidrogenasa (ubiquinona) I alfa subcomplejo 10.....	77
Peroxirredoxina-3	79
Identificación de las proteínas que se encuentran diferencialmente en el plasma de ratas infartadas al quinto día post-IM, en las que se detectó la movilización de MSC	80
Apolipoproteína A-IV	81
Hemopexina.....	81
Proteína de Unión a Vitamina D.....	83
Transtiretina.....	84
Precusores de la cadena beta y gama del fibrinógeno	85
Visión general	86
CONCLUSIONES.....	90
PROYECCIONES	91
BIBLIOGRAFÍA.....	92

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Factores que se sugiere promueven la migración, movilización y <i>homing</i> de las MSC, HSC y EPC	11
Tabla 2: Elaboración de curva de calibración para cuantificación de proteínas.....	24
Tabla 3: Número aproximado de <i>spots</i> que pudo ser detectado utilizando diferentes tipos de tinciones con el apoyo del programa Delta 2D	44
Tabla 4: Proteínas secuenciadas de ventrículo izquierdo de rata.....	55
Tabla 5: Proteínas secuenciadas de plasma de rata.....	60

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de las arterias coronarias	4
Figura 2: Representación de los procesos de migración, movilización y <i>homing</i> de las células troncales mesenquimáticas.....	9
Figura 3: Diseño experimental.....	17
Figura 4: Construcción de los <i>Pooles</i>	26
Figura 5: Sobreposición de los geles sobre el gel maestro	32
Figura 6: Gel SDS-PAGE (12%) de proteínas de ventrículo izquierdo de rata.....	38
Figura 7: Optimización de la separación de proteínas totales en la primera dimensión.....	39
Figura 8: Optimización de la resolución de los <i>spots</i> en la segunda dimensión mediante la adición de un gel concentrador	40
Figura 9: Optimización del enfoque de las proteínas durante la primera dimensión mediante la adición de una solución de anfolitos, con un rango de pH 3-10, en el tampón de IEF.....	41
Figura 10: Optimización de la separación de los <i>spots</i> en la segunda dimensión mediante el uso de geles SDS-PAGE en gradiente.....	43
Figura 11: Uso de diferentes tinciones para la visualización de spots en geles bi-dimensionales.....	44
Figura 12: Gel SDS de proteínas de plasma de rata antes y después de la remoción de la albúmina usando el Aurum Serum Protein Mini kit	46

Figura 13: Geles bi-dimensionales de proteínas totales de plasma de rata depletadas y no depletadas.....	47
Figura 14: Cirugía para producir un IM permanente en ratas.....	49
Figura 15: Determinación macroscópica del IM	49
Figura 16: Gel SDS-PAGE de proteínas totales de ventrículo izquierdo de ratas sham e infartadas, al quinto día post-procedimiento quirúrgico	51
Figura 17: Geles bi-dimensionales de proteínas totales de ventrículo izquierdo de ratas sham e infartada, al quinto día post-procedimiento quirúrgico	52
Figura 18: Identificación de proteínas de ventrículo izquierdo de rata que presentan cambios significativos en su abundancia entre las condiciones sham e infartado, al quinto día post-procedimiento quirúrgico	54
Figura 19: Gel SDS-PAGE de proteínas totales de plasma de ratas sham e infartadas, al quinto día post-procedimiento quirúrgico.....	57
Figura 20: Geles bi-dimensionales de proteínas totales de plasma de ratas sham e infartadas, al quinto día post-procedimiento quirúrgico	58
Figura 21: Identificación de proteínas de plasma de rata que presentan cambios significativos en abundancia entre las condiciones sham e infartado, al quinto día post-procedimiento quirúrgico	59

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares aquejan a millones de personas en el mundo, siendo una de las más comunes el infarto al miocardio. Actualmente no existen tratamientos que permitan regenerar el tejido dañado, por lo que la terapia celular con células troncales destaca como una alternativa terapéutica para el tratamiento de esta patología pues existen evidencias de que estas células pueden circular por el torrente sanguíneo (movilización) y hacer *homing* en órganos lesionados.

El objetivo de esta tesis fue caracterizar, mediante un estudio proteómico, las proteínas existentes en el corazón y plasma de ratas infartadas al quinto día post-infarto, tiempo en el que ha sido detectada la presencia de células troncales mesenquimáticas en el torrente sanguíneo. Las proteínas que identificamos están relacionadas con la respuesta inflamatoria del organismo al estrés generado producto de un infarto al miocardio. Más aún, postulamos que alguna(s) de las proteínas de fase aguda detectadas en el torrente sanguíneo de ratas infartadas podrían estar involucradas en el proceso de movilización.

La identificación de estas proteínas es la primera aproximación que permitirá a nuestro grupo de investigación conocer los factores proteicos involucrados en este proceso, lo que podría permitir en el futuro potenciar este proceso ya sea a través de la optimización de la liberación de estos factores o por administración de ellos a los pacientes infartados.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases affect thousands of persons in the world, with the myocardial infarction being one of the most common. Nowadays, there are no treatments that allow damaged tissue regeneration and, therefore, the cell therapies with stem cells seems to be an interesting alternative for the treatment of this pathology since there are evidences that stem cells can circulate through the blood stream (mobilization) and perform homing in the injured tissues.

The objective of this thesis was characterize, through a proteomic approach, the proteins that are present in the plasma and heart from infarcted rats five days post-infarction, which is the period of time where the mesenchymal stem cells have been detected in the blood stream.

The proteins that were identified in this work could be related with the inflammatory response from the injured organism to the stress generated by the myocardial infarction. Moreover, we postulate that some of the acute phase proteins detected could be involved in the mobilization process.

The identification of these proteins is a first step that will grant our research group with the possibility to have knowledge of the protein factors involved in this process, which would permit in the near future to boost this response through the optimization of the release of these factors or through their administration to infarcted individuals.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares aquejan a millones de personas en el mundo, siendo una de las más comunes el infarto al miocardio (IM) (Behfar A. y Terzic A., 2007; De Celle T. y col., 2005). Según cifras de la Organización Mundial de la Salud, cada año mueren en el mundo 7,2 millones de personas y otras 20 millones se ven afectadas por esta enfermedad pero sobreviven. En Chile, el IM es la causa directa de muerte de aproximadamente el 8% de la población (Cesani P., 2005). Un tercio de los pacientes que presentan un IM fallecen antes de acceder a atención médica, principalmente por arritmias ventriculares que se presentan como latidos irregulares del corazón. Adicionalmente, durante el periodo de la hospitalización, mueren entre un 10% a un 15% de los pacientes por disfunción ventricular. Por otra parte, las expectativas de vida de los pacientes que sobreviven a un IM están disminuidas en relación a la población general. Así, entre el 4% al 10% de las personas que han sufrido un IM fallece en el primer año de vida posterior a su hospitalización, principalmente por reinfartos, insuficiencia cardiaca y arritmias, lo que refleja la gravedad e impacto que esta patología representa (Behfar A. y Terzic A., 2007; Oren H. y col., 2007; Cesani P., 2005).

El corazón es un órgano complejo formado por varios tipos de células, cada una con funciones altamente especializadas. Los cardiomiocitos son el tipo celular más abundante del tejido cardiaco, poseen características contráctiles, electrofisiológicas y estructurales únicas, las cuales permiten al corazón cumplir su función (Kehat I. y col., 2004). El corazón se encuentra altamente vascularizado, siendo irrigado por las dos primeras ramas de la aorta: la coronaria izquierda, originada en el seno de Valsalva

izquierdo, y la coronaria derecha, originada a partir del seno derecho. La coronaria derecha se distribuye por el surco aurículo-ventricular derecho, alcanzando la cruz del corazón. En este punto desciende por el surco interventricular posterior, originando la arteria descendente posterior. La coronaria izquierda muestra, en tanto, un tronco común inicial corto que se bifurca, originando la circunfleja y la arteria descendente anterior o interventricular anterior (Figura 1).

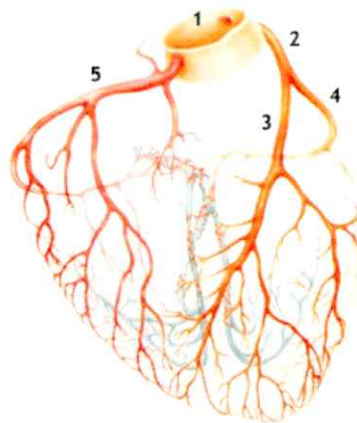


Figura 1: Esquema de las arterias coronarias (Federación Argentina de Cardiología). 1: porción inicial de la aorta; 2: arteria coronaria izquierda; 3: arteria descendente anterior; 4: arteria circunfleja; 5: arteria coronaria derecha; las venas coronarias están representadas en color celeste.

El IM se produce como resultado de la oclusión de alguna de las arterias que irrigan el corazón, pero ocurre con mayor frecuencia en la arteria descendente anterior, comprometiendo así principalmente al ventrículo izquierdo (Delgado R. y col., 1998). Aunque existen causas no ateroscleróticas de IM, la aterosclerosis coronaria es el principal determinante etiológico de esta patología (Cesani P., 2005). La aterosclerosis coronaria se origina con la penetración y acumulación sub-endotelial de colesterol y la posterior acumulación sub-intimal de macrófagos en la pared arterial, lo que conlleva a

la formación de una placa fibrosa. El endotelio que cubre las placas fibrosas se torna más permeable y puede romperse, provocándose así una trombosis brusca que tiene como resultado la obstrucción parcial o total del flujo sanguíneo (Pacheco D., 2004). Debido a la oclusión, la perfusión del tejido miocárdico se ve disminuida, produciéndose con ello una falla en el aporte de oxígeno y nutrientes, fenómeno conocido como isquemia. La isquemia comienza a producir áreas de necrosis en el subendocardio dentro de la primera hora posterior a la falta de sangre en la región. Después de las primeras 3 horas de la oclusión coronaria la necrosis comienza a extenderse hacia el tercio medio de la pared en la región isquémica. La necrosis transmural de toda el área isquémica se logra ver al tercer día posterior a la oclusión coronaria (Guadalajara J., 1996). La isquemia no solo produce la muerte de cardiomiocitos por necrosis, sino también por apoptosis y autofagia, los que dada la limitada capacidad regenerativa del corazón son reemplazados por fibroblastos y matriz extracelular, formándose así una escara que impide la contracción sincrónica del músculo cardíaco (Kunapuli S. y col., 2006; Kehat I. y col., 2004; Ren G. y col., 2003).

La isquemia trae consigo efectos metabólicos (aumento del contenido de lactato y disminución del pH, de adenosín trifosfato (ATP) y de creatinfosfato), mecánicos (disminución de la contractilidad y de la distensibilidad en la zona isquémica) y eléctricos (cambios en los potenciales de reposo y de acción, lo que se traduce en inestabilidad eléctrica y arritmias). El resultado final es la pérdida de la función cardíaca, lo que repercute a nivel sistémico y afecta la calidad de vida del paciente, representando un alto riesgo de mortalidad (Cesan P., 2005).

Actualmente, los tratamientos utilizados, terapias de reperfusión coronaria, apuntan a desobstruir la arteria ocluida, en un intento de restablecer el flujo sanguíneo para disminuir así el daño (muerte celular) y salvar la vida del paciente (Behfar A. y Terzic A., 2007). Estas terapias permiten salvar el miocardio viable y reducen el riesgo de muerte del paciente. La reperfusión se puede realizar usando fibrinolíticos, por angioplastia (dilatación del vaso ocluido con un cateter especial) o cirugía. La terapia más utilizada hoy en día es la angioplastia coronaria percutánea donde mediante el uso de prótesis endoluminales, denominadas *stents*, se dilata la arteria ocluida (De Celle T. y col., 2005). En los pacientes que logran sobrevivir se intenta prevenir el padecimiento de nuevos infartos cambiando sus hábitos de vida. Sin embargo, no existen hasta hoy tratamientos que permitan regenerar el tejido dañado. Es en este contexto donde la terapia celular usando células troncales destaca como una alternativa terapéutica para el tratamiento del IM.

Células troncales mesenquimáticas y su uso en terapia celular cardíaca

Una cadena ordenada de procesos que involucran la proliferación, migración y diferenciación celular conducen a la producción y mantención de la mayoría de los tejidos en los organismos adultos. La célula que inicia esta cadena ha sido llamada célula troncal (Minguell J. y col., 2001). Estas células se caracterizan por su capacidad de auto-renovarse y su potencial para dar origen a diversos linajes celulares, para lo cual requieren de condiciones microambientales adecuadas (Caplan I. y Dennis J., 2006). En función del estado de desarrollo del individuo del cual se originan, existen dos tipos de células troncales, las embrionarias y las adultas (ASC). Dentro de este último grupo

encontramos a las hematopoyéticas (HSC) y las mesenquimáticas (MSC), ambas localizadas en la medula ósea de los huesos trabeculares de individuos adultos. Debido a que las HSC y MSC se aíslan fácilmente, son multipotentes y presentan gran plasticidad, es decir, poseen la capacidad de dar origen a tipos celulares de tejidos distintos al del cual provienen, ambos tipos de células troncales se sugieren como herramientas terapéuticas atractivas para una gran variedad de patologías (Raff M., 2003). En el caso particular del IM, tanto las HSC como las MSC han sido utilizadas en cardiomioplastía, estrategia que consiste en el trasplante intracardiaco o intracoronario de células ya sea indiferenciadas o diferenciadas, con el fin de mejorar la función cardíaca (Berry M. y col., 2006; Minguell J. y Erices A., 2006; Orlic D. y col., 2001; Berardy AC. y col., 1995).

Respecto de las HSC, existe controversia acerca de su capacidad de regenerar el miocardio pues se ha mostrado que estas no poseen la capacidad de transdiferenciar hacia cardiomiocitos (Murry C. y col., 2004; Orlic D. y col., 2001). En el caso de las MSC, los estudios son menos controversiales ya que las evidencias apuntan a que estas células son efectivamente capaces de diferenciarse a cardiomiocitos (Kawada H. y col., 2004; Shim W. y col., 2004; Fukuda K., 2003; Hattan N. y col., 2003). También ha sido descrito que las MSC contribuyen a la regeneración del miocardio dada su capacidad de liberar factores tróficos que podrían estar potenciando la neovascularización, inhibiendo la formación de la escara o la apoptosis de los cardiomiocitos (Caplan I. y col., 2006). Por otra parte, en casi todos los estudios en que se ha realizado cardiomioplastía con células troncales se ha mostrado algún efecto benéfico sobre la función cardíaca (Chen SL. y col., 2004; Min J. y col., 2002; Shake J. y col., 2002). Sin embargo, la

cardiomioplastia con células troncales aisladas *in vitro* posee la desventaja de ser invasiva pues requiere de dos intervenciones quirúrgicas, una para aspirar la médula ósea y otra para implantar las células, y en algunos casos tardía, debido a que el período de tiempo necesario para la expansión y obtención de un número suficiente de células supera el tiempo de formación de la escara, que es de aproximadamente 21 días luego del infarto (Lu L. y col., 2004). Adicionalmente, existen evidencias que durante la expansión *in vitro* de las células ocurre envejecimiento celular, lo que implica una disminución en el potencial de diferenciación a los diferentes linajes (Bonab y Col, 2006.). Por otro lado, hay complicaciones asociadas a la manipulación *ex vivo*, ya que hay estudios que demuestran la producción de microembolias durante la infusión intracoronaria con la resultante disminución del aporte sanguíneo al miocardio (Bigalli y Col, 2005).

En los últimos años se han incrementado las evidencias que apuntan a que las células troncales son capaces de migrar desde la medula ósea, circular por la sangre periférica - proceso que se conoce como movilización - y alojarse en órganos lesionados - proceso conocido como *homing* (Figura 2).

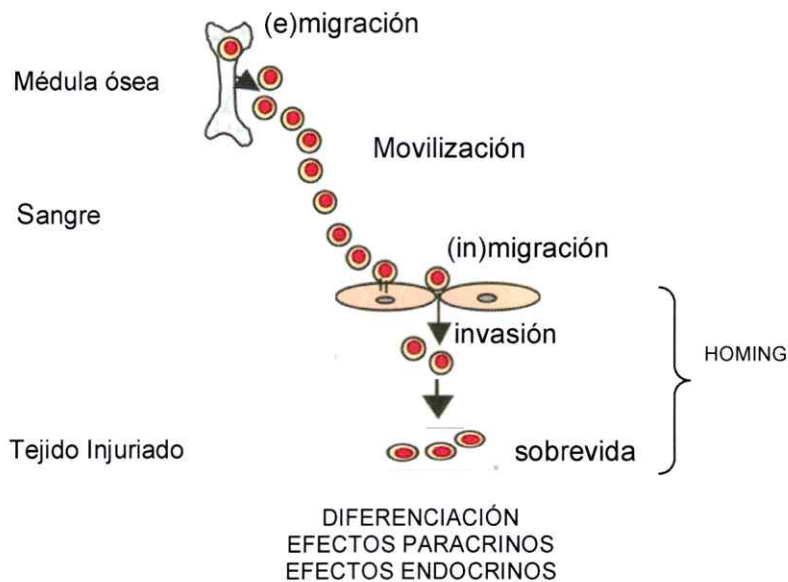


Figura 2. Representación esquemática de los procesos de migración, movilización y homing de las células troncales mesenquimáticas. Las MSC emigran desde la médula ósea hacia el torrente sanguíneo en donde se movilizan hasta hacer *homing* en el tejido lesionado.

Aparentemente, estos procesos ocurrirían fisiológicamente, pero se harían significativos bajo condiciones fisiopatológicas (Penn M. y col., 2004; Jackson K. y col., 2001). Así, Quaini y col. observaron en el corazón de hombres que habían sido trasplantados con un órgano femenino, la presencia de células que poseían cromosoma Y y que expresaban marcadores de cardiomiocitos, de células endoteliales o de células de músculo liso (Quaini F. y col., 2002). Estas células que poseían cromosoma Y fueron caracterizadas como de estirpe hematopoyético dada su expresión de los marcadores tales como c-kit, MDR1 o Sca-1. De igual forma, Deb y col. observaron en los corazones de mujeres que habían sido sometidas a un trasplante de médula ósea proveniente de un donante varón, cardiomiocitos que poseían cromosoma Y (Deb A. y col., 2003). Lo anterior es llamativo debido a que el proceso inflamatorio que se genera producto del rechazo es

muy similar al que se produce por un IM, por lo que podría producirse el mismo fenómeno durante un IM. Por otra parte, nuestro grupo ha demostrado la presencia de MSC en el torrente sanguíneo de ratas al tercer, quinto y séptimo día post-IM, siendo el quinto día donde la respuesta es más robusta (Luz P., 2007). En conjunto, estas evidencias sugieren que cuando el corazón sufre un proceso inflamatorio, células derivadas de la médula ósea se movilizan y hacen *homing* en el tejido cardiaco, donde se diferencian al menos a cardiomiocitos.

El o los factores involucrados en cada uno de estos procesos no son del todo claros y tampoco es claro si son compartidos por algunos de ellos. En el caso de la movilización, nuestro laboratorio lo plantea como un proceso activo. Es decir, debe existir en el torrente sanguíneo uno más factores en el momento que se este produciendo la movilización de las células troncales para que estas se mantengan en circulación. Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio demuestran que MSC humanas inyectadas en ratones *nude* a las pocas horas de haber sido inyectadas ya no se encuentran en el torrente sanguíneo, sino en lugares como la medula ósea, bazo, pulmón, huesos, entre otros. En base a ello es que proponemos a la movilización de las células troncales como un proceso activo, el que requiere que el o los factores estén presentes para que este fenómeno se mantenga en el tiempo.

En consecuencia, nuestro grupo de investigación propone la implementación de lo que podríamos llamar una cardiomioplastia *in vivo*. Para ello, es necesario identificar él o los factores que inducen movilización de las MSC en el torrente sanguíneo producto de un IM.

En la tabla 1 se resumen los factores de migración, movilización y *homing* reportados a la fecha para MSC, HSC y células precursoras endoteliales (EPC).

Tabla 1: Factores que se sugiere promueven la migración, movilización y *homing* de las MSC, HSC y EPC.

FACTOR DE	TIPO CELULAR		
	Célula Troncal Mesenquimática	Célula Troncal Hematopoyética	Célula Precursora Endotelial
Migración	Wnt (Neth P. y col., 2006) HGF (Forte G. y col., 2006)	HMGB1 (Palumbo R. y Bianchi M., 2004) VEGF (Rafii S. y col., 2002)	VEGF (Rafii S. y col., 2002)
Movilización	G-CSF (Fukuda K. y Fujita J., 2005; Kawada H. y col., 2004)	G-CSF (Leone A. y col., 2005)	G-CSF (Fujita J. y col., 2007)
Homing	nd	SDF-1 (Askari A. y col., 2003)	nd

nd: no descrito.

En el caso particular de las MSC, se ha sugerido que las proteínas Wnt y HGF podrían estar involucradas en la migración de estas células (Neth P. y col., 2006; Forte G. y col., 2006). Por otra parte, se ha mostrado que la administración de G-CSF a animales luego de un IM induce la movilización de una línea celular con características de MSC (Fukuda K. y Fujita J., 2005; Kawada H. y col., 2004).

Puesto que el objetivo de nuestro grupo es identificar los factores proteicos producidos por el corazón infartado que inducen la movilización de las MSC, en la presente tesis se caracterizaron las proteínas existentes en el corazón y plasma de ratas infartadas, en el momento en que se están movilizando las MSC en el torrente sanguíneo. Para ello se realizó un estudio proteómico diferencial en tejidos obtenidos desde animales infartados quirúrgicamente y animales controles, operados pero no infartados, obtenidos al quinto día post-IM. Este día fue escogido en base a los resultados obtenidos por Luz (2007), en el que se demuestra la aparición de MSC en el torrente sanguíneo de ratas al quinto día post-IM y a los datos de Allers y col. (2004) bajo los cuales planteamos el proceso de movilización como un proceso activo.

La proteómica es el estudio del conjunto de proteínas presentes en una célula, tejido u organismo en un momento determinado y bajo condiciones determinadas, es decir, del proteoma (Zerkowski H. y col., 2004; Macri J. y Rapundalo S., 2001). En el caso del IM, la proteómica diferencial ha mostrado que efectivamente hay un cambio en el patrón proteico producto de la isquemia y la reperfusión en corazón y plasma de ratas post-IM (Fert-Bober J. y col, 2008). Sin embargo, en varios de ellos la función de las proteínas diferencialmente expresadas no ha sido esclarecida ya que el objetivo de dichos estudios era identificar nuevos marcadores moleculares de mejor valor predictivo para el IM y su evolución (Sakai J. y col., 2003).

Conocer las proteínas que se expresan diferencialmente en el corazón y plasma de individuos infartados en los cuales se están movilizando las MSC es la primera etapa en la identificación de los factores proteicos involucrados en este proceso. Si bien solo se establece una correlación, esto permite identificar proteínas candidatas cuya función

debe ser evaluada empíricamente para determinar si efectivamente son capaces de promover la movilización de las MSC durante un IM. Este conocimiento permitirá en el futuro potenciar la movilización de las MSC ya sea a través de la optimización de la liberación de estos factores o por administración de ellos a los pacientes infartados. Este tratamiento en conjunto con la angioplastia permitiría la llegada masiva de MSC al corazón infartado y su regeneración, con lo cual aumentaría tanto la expectativa como la calidad de vida de los pacientes infartados.

HIPÓTESIS

En el proteoma del plasma y corazón de ratas infartadas, en las que es posible detectar movilización de MSC, existen proteínas expresadas diferencialmente respecto de las ratas no infartadas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Comparar el ambiente proteico del corazón y plasma de ratas infartadas, en las que es posible detectar movilización de MSC, con el de ratas control.

Objetivos específicos

1. Poner a punto un protocolo de extracción eficiente de proteínas totales de corazón y plasma de rata.
2. Estandarizar las condiciones de corrida para la primera y segunda dimensión, y determinar la tinción más adecuada para las muestras de proteínas totales de corazón y plasma de rata.
3. Implementar el modelo de IM quirúrgico en ratas.
4. Identificar las proteínas que se encuentran diferencialmente en el ventrículo izquierdo de ratas control e infartadas al quinto día post-procedimiento quirúrgico.
5. Identificar las proteínas que se encuentran diferencialmente en el plasma de ratas control e infartadas al quinto día post-procedimiento quirúrgico.
6. Proponer candidatos, presentes en el proteoma del corazón ó plasma de ratas infartadas, a factores de movilización de MSC.

CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO

Tipo de estudio

El presente trabajo corresponde a un estudio experimental, en modelo animal, de controles y casos.

Modelo animal

Se usaron ratas (*Rattus norvegicus*) macho *Sprague Dawley* de entre 300 y 400 gr. provenientes del bioterio de la Pontificia Universidad Católica de Chile (Santiago, Chile). Durante el estudio los animales se mantuvieron en jaulas individuales, con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La habitación contaba con temperatura controlada (21 °C), con agua y alimento (alimentación estándar, pellet) *ad libitum*.

Diseño del estudio

Las muestras utilizadas en este estudio consistieron de proteínas totales extraídas a partir de ventrículo izquierdo y plasma obtenidos desde dos grupos experimentales: ratas a las que se les ligó dicha arteria permanentemente (ratas infartadas) y ratas a las que se les realizó el procedimiento quirúrgico pero no se les ligó la arteria coronaria descendente anterior (ratas sham o control) (Figura 3).

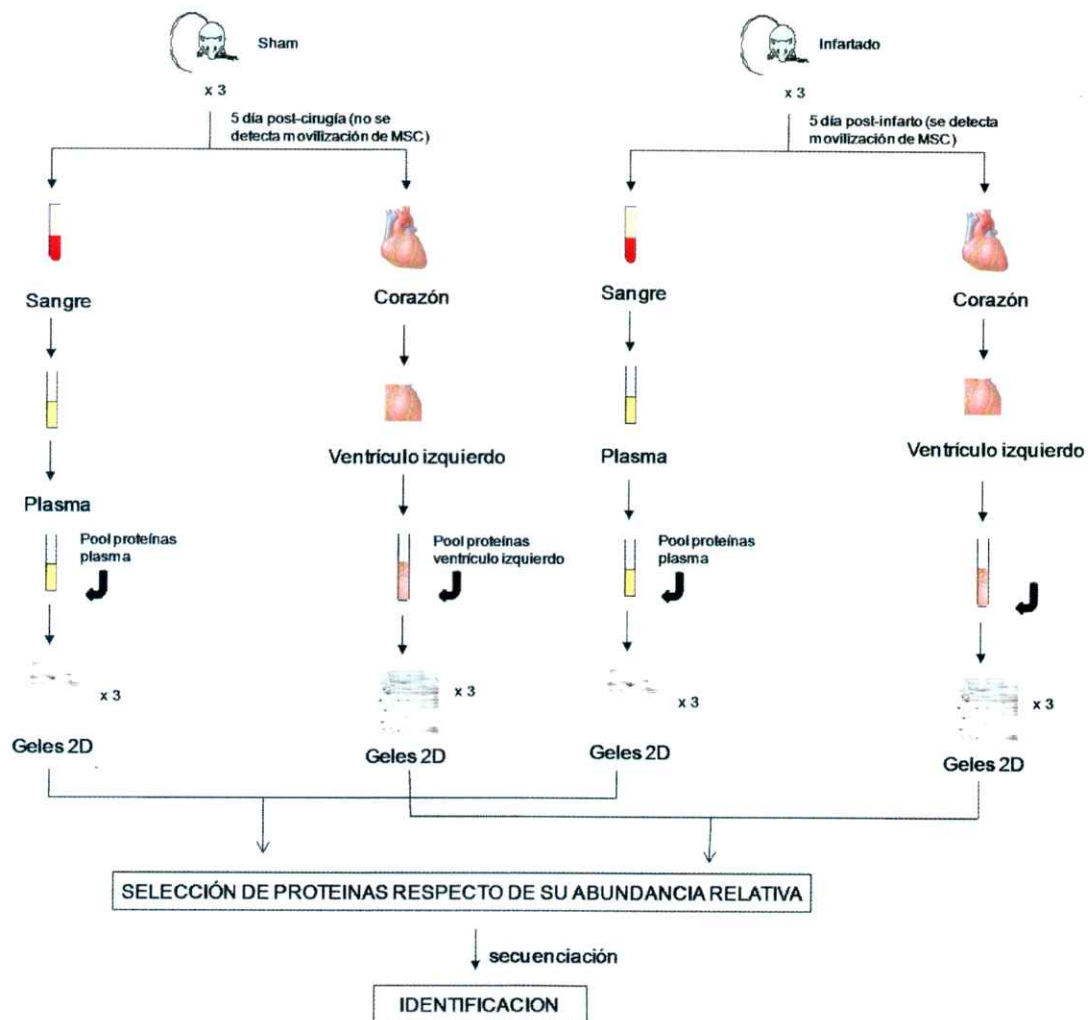


Figura 3: Diseño experimental. Muestras de plasma y ventrículo izquierdo provenientes de ratas sham y ratas infartadas al quinto día post-IM fueron utilizadas para la extracción de proteínas totales. Las muestras de proteínas totales pertenecientes a un mismo tejido y a un mismo grupo experimental fueron usadas para formar *pools*. Las proteínas de cada *pool* fueron separadas por peso molecular (PM) y punto isoeléctrico (pI) mediante el uso de geles bi-dimensionales. Luego de hacer un análisis para determinar que proteínas presentaban una abundancia diferencial en las muestras de la condición infartada, las proteínas que pudieron ser detectadas en geles teñidos con la tinción Coomassie fueron secuenciadas e identificadas.

Para eliminar las diferencias de abundancia de proteínas entre tejidos pertenecientes a animales de un mismo grupo experimental, que pueden presentar diferencias en su

proteoma debido a su respuesta particular al ambiente que los rodea, se utilizó como estrategia el análisis de *pools* (Figura 3):

- *Pool* de tres muestras de proteínas totales de ventrículo izquierdo extraídas desde el corazón de ratas al quinto día post-IM.
- *Pool* de tres muestras de proteínas totales de ventrículo izquierdo extraídas desde el corazón de ratas sham al quinto día post-cirugía.
- *Pool* de tres muestras de proteínas totales de plasma extraídas desde la sangre de ratas al quinto día post-IM.
- *Pool* de tres muestras de proteínas totales de plasma extraídas desde la sangre de ratas sham al quinto día post-cirugía.

Consideraciones bioéticas

Los procedimientos experimentales realizados en los animales utilizados en este trabajo, fueron aprobados por el Comité de Bioética, Facultad de Medicina, Clínica Alemana-Universidad del Desarrollo, y se realizaron de acuerdo a las normas bioéticas internacionales establecidas por la UNESCO/OMS/CIOMS en 1949 sobre los principios éticos internacionales para la investigación biomédica con animales.

REACTIVOS

Ácido acético, Merck.

Acrilamida, Winkler.

ASB-14, Calbiochem.

Anfolitos (pH 3-10), Bio-Rad.

Azul de bromofenol, Sigma.

Bis-acrilamida, Sigma.

CHAPS, US Biological.

Deep Purple, GE.

DTT, Winkler.

EDTA, Merck.

Etanol, Merck.

Glicerol, Merck.

Glicina, US Biological.

HCl, Merck.

Heparina, Laboratorio Chile.

Iodoacetamida, Applichem.

Ketamina, Laboratorio Biosano.

Leupeptina, Sigma.

NaF, Sigma.

Na₂CO₃, Merck.

NaHCO₃, Merck.

Na₃VO₄, Sigma.

PBS, Gibco.

Pepstatina, Sigma.

PMSF, Sigma.

Povidona yodada, Volta pharmaceuticals.

SDS, Sigma.

Strips pH 3-10 NL (17 cm), Bio-Rad.

TCEP, Sigma.

Tiourea, JT Baker.

Tris, US Biological.

Urea, Merck.

Xilazina, Alfasan. Woerden.

METODOLOGÍA

Resección de ventrículo izquierdo

Las ratas fueron sedadas con vapores de Sebofluorano y anestesiadas por vía intraperitoneal con una mezcla Xilacina 10 mg/Kg y Clorhidrato de Ketamina 100 mg/Kg para enseguida ser sometidos a eutanasia por dislocación cervical. Posteriormente se abrió el tórax y se extrajo el corazón para luego disectar el ventrículo izquierdo. Los ventrículos fueron lavados dos veces con PBS 1x con el fin de eliminar la sangre y sumergidos en nitrógeno líquido para ser guardados a -80°C hasta su posterior procesamiento.

Obtención de plasma

Las ratas fueron sedadas con vapores de Sebofluorano y anestesiadas vía intraperitoneal con una mezcla Xilacina 10 mg/Kg y Clorhidrato de Ketamina 100 mg/Kg. Una vez que las ratas se encontraban profundamente anestesiadas se llevó a cabo la extracción de 3 ml de sangre realizando una punción cardíaca, con una aguja de 21G y una jeringa de 6 ml que contenía heparina 40 U/ml. Posteriormente los animales fueron sometidos a eutanasia por dislocación cervical.

La sangre en las jeringas fue depositada suavemente en tubos de 1,5 ml para posteriormente ser centrifugada a 12.000 x g durante 15 min. a 4°C. Se colectó el plasma y se descartó el precipitado. Las muestras de plasma se guardaron a -80°C hasta su posterior procesamiento.

Cabe destacar que para el análisis proteómico sólo se utilizaron muestras de plasma de ratas en las que detectamos la presencia MSC al quinto día post-IM. En el caso de las muestras de corazón no fue posible corroborar que se estaba trabajando con muestras provenientes de ratas en las que hayamos detectado la presencia de MSC debido a que la punción cardiaca para obtener la muestra de sangre generaba daño en el corazón de los animales, lo que podría alterar los resultados del posterior análisis proteómico.

Infarto cardiaco quirúrgico en ratas

Las ratas se infartaron mediante la oclusión del segmento proximal de la arteria coronaria descendente anterior. Para esto los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de una mezcla de Xilacina 10 µg/kg y clorhidrato de ketamina 50 µg/kg. Posteriormente se depiló el tórax de las ratas y se limpió con el antiséptico povidona iodada. Las ratas fueron intubadas con una bránula de teflón número 16G para ser ventiladas con ayuda de un ventilador mecánico neonatal. Los animales fueron ventilados con una presión inspiratoria de 35 cmH₂O y una frecuencia de 70 ciclos/minuto durante el procedimiento. Luego de cortar la piel con bisturí, se continuó con disección roma divulsionando los músculos pectorales hasta acceder a la parrilla costal. A continuación, para acceder a la cara anterior del corazón, se efectuó una toracotomía izquierda por el cuarto espacio intercostal izquierdo y se realizó el reconocimiento y la ligación de la rama descendente anterior de la arteria coronaria izquierda con sutura de seda 6-0. El tórax fue cerrado por planos mediante sutura y luego las ratas fueron dejadas en recuperación. En el caso de las ratas operadas pero no

infartadas (control), se procedió de igual manera que en el caso anterior pero sin realizar la ligación de la coronaria luego de su reconocimiento.

Una vez terminado el procedimiento quirúrgico las ratas estuvieron en observación hasta que despertaran de la anestesia, en ese momento fueron extubadas y regresadas a sus jaulas hasta el quinto día post-IM cuando se disectó el corazón o el plasma. Se consideró quirúrgicamente infartados sólo aquellos animales en que se observaba macroscópicamente el área isquémica a lo largo del ventrículo izquierdo.

Extracción de proteínas de ventrículo izquierdo

Para este fin se utilizó un protocolo adaptado del publicado por Stanley B. y col. en el 2003. Los ventrículos izquierdos que se encontraban almacenados a -80°C desde que habían sido disectados, se sumergieron en nitrógeno líquido para posteriormente pulverizarlos en un mortero. El polvo obtenido para cada ventrículo fue traspasado a un tubo corex de 10 ml que se encontraba frío, pues había sido mantenido en un recipiente con hielo, y resuspendido en 2 ml de tampón de extracción [EDTA 2 mM, NaF 10 mM, Na_3VO_4 200 μM , PMSF 250 μM , Leupeptina 1 μM , Pepstatina 1 μM , Tris-HCl (pH 6,8) 20 mM, Urea 7 M, Tiourea 2 M, ASB-14 0,4 %]. Luego, la mezcla se homogenizó utilizando un vortex por 5 min. a velocidad media y se centrifugó a 16.000 x g durante 30 min. a temperatura ambiente. Este procedimiento se realizó a temperatura ambiente debido a que la urea cristaliza a baja temperatura. El sobrenadante, el cual contenía las proteínas, fue alicuotado y guardado a -80°C hasta su posterior utilización.

Remoción de la albúmina e inmunoglobulinas de las muestras del plasma

Las muestras de plasma fueron tratadas de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, con el Kit Aurum serum protein mini (Bio-Rad). Este Kit utiliza columnas que contienen una mezcla de Affi-Gel Blue (Bio-Rad) y Proteína A que selectivamente unen y remueven albúmina e inmunoglobulinas (Ig), respectivamente.

Cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford

Para la cuantificación de las proteínas se usó el procedimiento de Bradford (Bradford M., 1976) modificado para placas de ELISA de 96 pocillos. Una curva de calibración con 0, 2, 4, 6 y 8 μg de Albumina Sérica Bovina (BSA) fue hecha cada vez que se determinó la concentración de proteínas de una nueva muestra, tal como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 2: Elaboración de curva de calibración para cuantificación de proteínas.

BSA (μg)	BSA* (μl)	H ₂ O destilada (μl)	TAMPÓN
0	0	98	2
2	1	97	2
4	2	96	2
6	3	95	2
8	4	94	2

*2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

En el caso de las muestras, se agregaron en los pocillos 2 μl de muestra y 98 μl de H₂O destilada. Posteriormente, tanto en los pocillos de la curva de calibración como a los que contenían las muestras se les agregó 250 μl de una solución Bradford que había sido previamente filtrada y se midió la absorbancia a 590 nm en un espectrofotómetro.

Cabe destacar que previamente a la medición, tanto las muestras de proteínas totales de ventrículo izquierdo como de plasma debieron ser diluidas 20 y 50 veces, respectivamente. Ello debido a que su alta concentración generaba resultados durante la medición que se encontraban fuera del rango lineal de la técnica.

Construcción de *pooles*

Se extrajeron las proteínas totales de las muestras obtenidas de tres individuos pertenecientes a cada condición. Una vez que se determinó la concentración de proteínas en dichas muestras, 150 μg de proteínas totales de cada una de ellas se mezclaron en tubos de 1,5 ml según muestra y condición, y se homogenizaron cuidadosamente con la ayuda de una micropipeta de 200 μl (Figura 4).

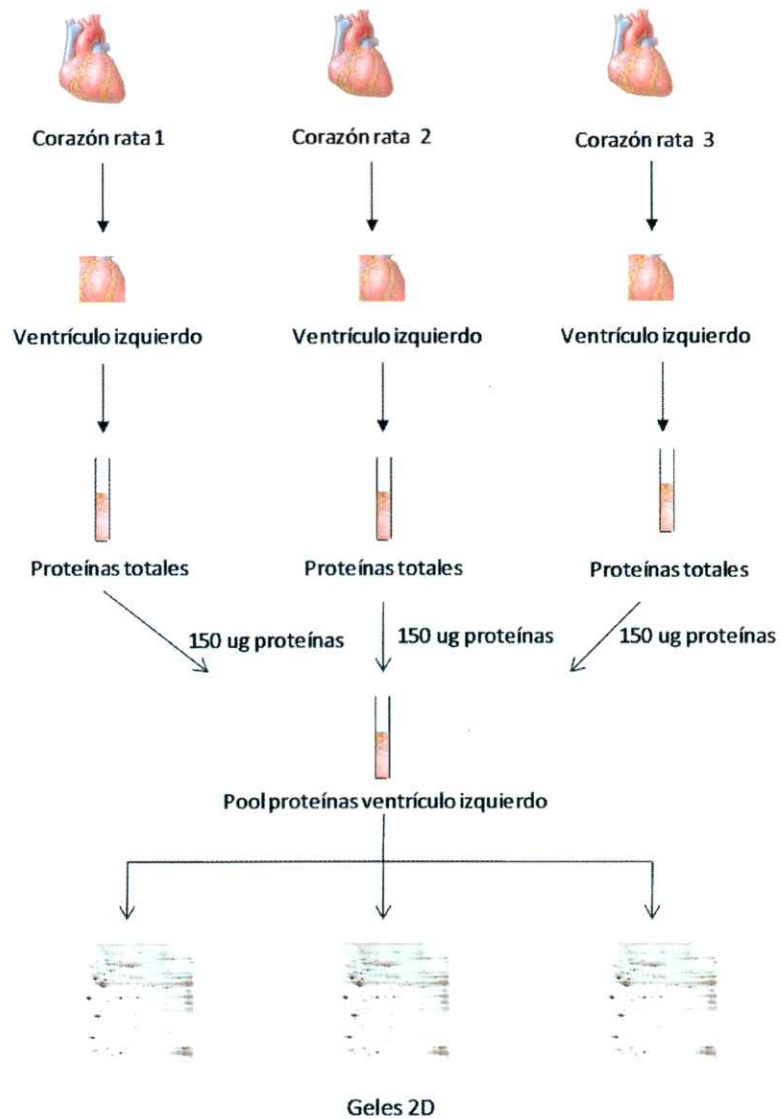


Figura 4: Construcción de los Pools. Para el análisis de las muestras se extrajeron las proteínas totales de tres muestras biológicas pertenecientes a una misma condición, rata infartada o sham, y luego se mezclaron cantidades iguales de proteínas totales. Cada *pool* fue corrido por triplicado en geles bi-dimensionales.

Corrida de la primera dimensión: Isoelectroenfoque

Tanto las muestras que contenían los *pools* como el tampón de isoelectroenfoque (IEF) [Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 4%, EDTA 2 mM, Anfólitos (pH 3-10) 0,5%] se descongelaron en un baño a 25°C durante 15 min. y se homogenizaron utilizando una micropipeta. Los agentes reductores DTT 1 M y TCEP 0,1 M se descongelaron a temperatura ambiente.

En tubos de 1,5 ml se agregaron 6,2 µl de DTT, 15,5 µl de TCEP, una cantidad de muestra tal que contuviera 100 µg de proteínas totales y tampón de IEF hasta completar los 310 µl. Se homogenizó, se incubó en un baño a 25°C por 15 min. y se centrifugó a 12.000 x g durante 1 min. a temperatura ambiente. Se sacaron los geles de primera dimensión (*strips*) pH 3-10 no lineales (NL), se cargaron los 310 µl que contienen las muestras en la bandeja de IEF y se colocaron suavemente los *strips* con ayuda de pinzas, cuidando que no quedaran burbujas. Se incubó a temperatura ambiente por media hora para posteriormente colocar un *wicks* sobre cada electrodo de los pocillos de la cámara que contenían las muestras. Finalmente se puso la bandeja en la cámara de IEF, se colocó sobre cada *strip* 1,6 ml de aceite mineral y se les rehidrató activamente a 50 V por 9 hrs. Luego, se realizó el isoelectroenfoque a 100 V por 25 Vh, a 500 V por 125 Vh, a 1000 V por 250 Vh y finalmente se dejó alcanzar los 65.000 Vh. Tanto el proceso de rehidratación como el de isoelectroenfoque se realizaron a 20°C.

Pretratamiento de las muestras previo la corrida de la segunda dimensión

Después del IEF los *strips* fueron incubados, en agitación suave, durante 15 min. con 3 mL de tampón de equilibrio [glicerol 20%, SDS 2%, Tris (pH 8,8) 375 mM, Urea 6 M,

DTT 65 mM]. Posteriormente los *strips* se colocaron cuidadosamente sobre papel absorbente con la ayuda de pinzas con la finalidad de eliminar de los *strips* el excedente de tampón de equilibrio. En una segunda etapa los *strips* fueron incubados, en agitación suave, por 15 min. en el mismo tampón pero que contenía iodoacetamida 6,7 mM en lugar de DTT. Luego los *strips* se colocaron cuidadosamente sobre papel absorbente con la ayuda de pinzas para eliminar el excedente de tampón.

Corrida de la segunda dimensión

Se cortó totalmente el plástico sobrante del extremo ácido y parte del básico de los *strips* previamente equilibrados. Se tomaron los *strips* por el trozo de plástico sobrante con ayuda de una pinza y fueron sumergidos en tampón de corrida 1x (Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1%). Se colocaron los *strips* sobre geles en gradiente (11,5 - 14%) de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) que poseían 17 cm. de ancho por 17 cm. de alto, dentro de los cuales 2 cm. del largo correspondían a gel concentrador de poliactilamida al 4,5%. Durante este proceso se tuvo especial cuidado de que no quedaran burbujas en la interfase *strip*-gel. Posteriormente se colocó sobre cada *strip* azul de bromofenol para demarcar el frente. Se montaron los geles en la cámara para correr la segunda dimensión y se corrieron hasta alcanzar los 2550 Vh. Las condiciones de corrida fueron en frío (baño a 9°C), a corriente constante, pudiendo alcanzar un máximo de 300 V y 30 W en cada corrida.

Tinción de las proteínas separadas en los geles bi-dimensionales

Las proteínas en los geles se fijaron en 200 ml de una solución de fijación (etanol 30% y ácido acético 10%), por al menos 12 hrs. a temperatura ambiente y en agitación suave.

Tinción con Nitrato de Plata

Se retiró la solución de fijación con la ayuda de una jeringa y se lavaron los geles 3 veces con 200 ml de etanol 30% v/v. Cada lavado tuvo una duración de 12 min. en agitación suave. Posteriormente, los geles se lavaron 2 veces por 10 min. en agitación suave con 200 ml de agua destilada. Una vez finalizados los lavados se agregó a los geles 200 ml de una solución de sensibilización (0,025% p/v de ditionito de sodio) por 1 min. en agitación suave. Se eliminó la solución de sensibilización y se lavó los geles 3 veces por 20 seg. con 100 ml de agua destilada. Posteriormente se agregó 200 ml de tinción de plata (0,2% p/v de Nitrato de plata y $8,1 \times 10^{-3}$ v/v de formaldehído en agua destilada), dejando los geles en esta solución por 20 min. en agitación suave. Una vez finalizado este periodo de tiempo, los geles fueron lavados con 200 ml. de agua destilada durante 1 min. y posteriormente se agregó 60 ml. de solución de revelado (6% p/v de Na_2CO_3 y $4,84 \times 10^{-3}$ v/v de formaldehído en agua destilada). Se agitó los geles manualmente y se eliminó la solución rápidamente una vez que se oscureció con ayuda de la jeringa. Luego se agregó a los geles 140 ml de la solución de revelado y se agitó manualmente de forma suave hasta que fue posible visualizar las proteínas. Para detener la reacción se agregó 100 ml de una solución de ácido acético 3,5% v/v, se dejó burbujear la solución por unos segundos y luego se eliminó con ayuda de una jeringa. Posteriormente, se agregó a los geles otros 100 ml de ácido acético 3,5% por 1 min.

Finalmente, los geles fueron lavados 3 veces con agua destilada durante 10 min. en agitación suave.

Tinción con Deep Purple

Se retiró la solución de fijación con ayuda de una jeringa y se agregaron 200 ml de solución de lavado (NaHCO_3 35 mM, Na_2CO_3 300 mM). Los geles se mantuvieron durante 30 min. en la solución, a temperatura ambiente y en agitación suave. Diez minutos antes de retirar la solución se sacó la tinción Deep Purple que se encontraba guardada a -20°C . Pasados los 30 min. se retiró la solución y se agregó en oscuridad una solución de trabajo que consistía en 188 μl de Deep Purple en 150 ml. de agua destilada. Se incubó durante 1 hr. en oscuridad, a temperatura ambiente y agitación suave. Posteriormente se retiró esta solución y se agregaron en oscuridad 200 ml de una solución de estabilización (7,5% v/v ácido acético). Los geles se mantuvieron durante 15 min. en esta solución y se repitió la operación. Finalmente los geles se escanearon con un laser de una longitud de onda de 635 nm en el modo *low sample intensity* del Sistema Posphorimaging para captura de imágenes digitales (Molecular Imager FX Systems de Bio-rad, USA).

Recorte virtual de imágenes

Después que los geles fueron escaneados, las imágenes fueron recortadas con ayuda del programa Quantity One, utilizado para capturar las imágenes. El recortar las imágenes permitió mas adelante hacer un mejor solapamiento (*warping*) de estas mismas y obtener una mayor cantidad de datos utilizables. Al recortar se eliminaron todos aquellos

spots que se ubicaban en los extremos de los geles y que no estaban bien enfocados, pues no podían ser utilizados para determinar cambios en la abundancia de esas proteínas.

Sobreposición de imágenes

Las imágenes cortadas fueron cargadas en el programa para análisis de geles bi-dimensionales llamado Delta 2D versión 3.2, en donde se realizó en una primera etapa la sobreposición de los geles. La sobreposición de las imágenes de los geles es una de las etapas más importantes y difíciles en el análisis de los geles bi-dimensionales, ésta tiene como finalidad el remover las distorsiones existentes en los geles SDS-PAGE que pertenecen a un mismo grupo causadas por su calentamiento durante la corrida y así poder generar imágenes de fusión.

Primero se designó cual sería el gel maestro para cada condición (control o infartado) y tejido. Esto se hizo determinando visualmente aquel gel que contaba con un mayor número de *spots* bien resueltos. Luego se sobrepuso cada uno de los otros geles del grupo con su gel maestro por medio de la herramienta del programa Delta 2D que permite al usuario hacer vectores entre los geles. Estos vectores permiten que el programa detecte que cierto *spot* que se encuentra en un gel es el mismo que está en el gel maestro (Figura 5). Durante esta etapa, se usó la opción del programa "modo global" de unión de *spots*, la que permite detectar más fácilmente si existe algún error al momento de trazar un vector, es decir, si se está uniendo por medio de ellos *spots* que no corresponden a la misma proteína.

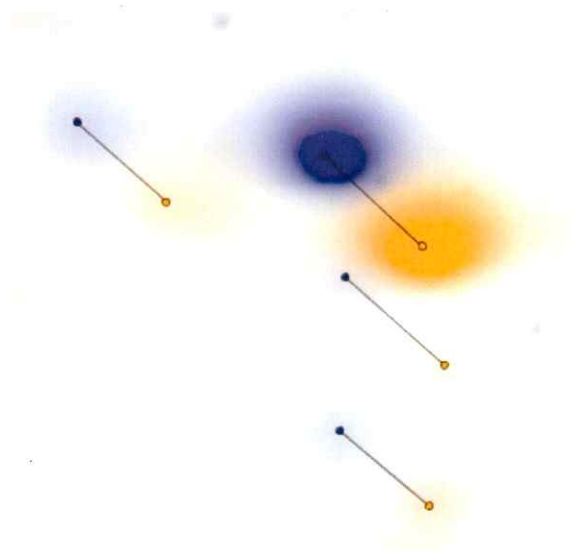


Figura 5: Sobreposición de los geles sobre el gel maestro. El mejor gel de cada condición fue designado como gel maestro. Luego se superpuso cada uno de los otros dos geles del grupo con su gel maestro usando una herramienta del programa Delta 2D, que permite hacer vectores entre los *spots* de diferentes geles. En la imagen, los *spots* que se encuentran en color azul son los del gel maestro y los naranjos corresponden a otro gel del grupo al que pertenece el gel maestro. Los vectores son trazados por el usuario del programa y tienen como finalidad unir *spots* que corresponden a una misma proteína en dos geles diferentes.

Generación de imágenes de fusión

El programa Delta 2D cuenta con una herramienta que permite hacer imágenes de fusión. Las imágenes de fusión combinan múltiples imágenes de geles en una sola nueva imagen. Una imagen de fusión se genera con la finalidad de detectar posteriormente, a través del programa, los *spots* que se encuentran presentes en ella y luego transferir los *spots* detectados a cada uno de los geles pertenecientes al grupo, esto facilita el trabajo y ahorra tiempo pues ya no es necesario detectar los *spots* en cada gel perteneciente a un grupo.

Se hicieron imágenes de fusión para cada una de las condiciones y tejido, combinando las imágenes de los tres geles de cada grupo. El algoritmo utilizado para este fin fue el

de fusión promedio (*average fusion*), algoritmo recomendado en el manual del programa para ser usado para comparación estadística o variación experimental entre réplicas.

Detección y cuantificación de *spots*

En una primera etapa se detectaron la totalidad de los *spots* en la imagen de fusión para cada grupo. El programa para detectar los *spots* requiere de ciertos parámetros. Los valores utilizados para esos parámetros fueron escogidos luego de realizar una serie de pruebas que permitieron obtener un menor número de detecciones inespecíficas, por ejemplo, acúmulos de tinción. Los parámetros utilizados fueron los siguientes:

- Región de ruido local: 34

Este parámetro designa el tamaño de la región utilizada en el gel para la determinación del ruido local en las etapas de cuantificación.

- Tamaño del *spot* promedio: 11

Este parámetro permite al programa separar, de forma más precisa, *spots* que se superponen parcialmente, así como distinguir un *spot* del ruido presente en el gel.

- Porcentaje de sensibilidad: 20%

Este parámetro permite controlar cuan estricto es el programa para discriminar entre *spots* y señales pequeñas, como por ejemplo polvo o acúmulos de tinción presentes en la imagen del gel.

Adicionalmente, se escogió la opción del programa para demarcar los *spots* de manera modelada, es decir, que estos fuesen circulares.

Una vez que los *spots* fueron detectados a través del programa, se limpió manualmente la imagen de fusión. Con esta limpieza se eliminó todo aquello que el programa detectó como un *spot* pero en realidad era sólo ruido, como los acúmulos inespecíficos de

tinción, los cuales se identifican porque tienen un tamaño mucho menor que un *spot* y un cociente intensidad/área muy alto.

Posteriormente, utilizando una herramienta con la que cuenta el programa, se transfirieron todos los *spots* desde cada imagen de fusión a su respectivo grupo de geles. Una vez transferidos los *spots*, se procedió a realizar la cuantificación con la finalidad de determinar cambios en abundancia que fuesen significativos. Para ello, se generaron tablas con los valores de volúmenes (V) y de porcentaje de volumen (%V) de cada *spot*, siendo el volumen el producto del área por la intensidad de cada *spot*, mientras que el %V consiste de la razón entre el volumen de un *spot* determinado y la sumatoria de los volúmenes de todos los *spots* presentes en el gel. El %V es utilizado con la finalidad de normalizar los geles, por ejemplo, ante diferencias en el grado de tinción de estos. Si un gel se tiñó en mayor grado, el V de cada *spot* será mayor al de un gel que se tiñó en menor grado, esta diferencia se elimina al utilizar el %V.

Los valores del %V de cada réplica de un determinado *spot* fueron promediados y se obtuvo el valor de desviación estándar. A partir de los valores obtenidos para los diferentes *spots* en las distintas condiciones, se realizó la normalización de los datos mediante el método descrito por el grupo de Kreil en el año 2004. Posteriormente los datos se ingresaron en el programa de análisis de datos MeV v4.0, en donde se realizó la prueba estadística t de Student. Ello permitió determinar si los cambios eran estadísticamente significativos ($p < 0,005$).

Identificación de las proteínas

Una vez que se reconocieron los *spots* que cambiaban significativamente entre las muestras obtenidas de los 2 grupos experimentales, estos fueron aislados desde geles bi-dimensionales teñidos con la tinción de Coomassie coloidal descrita por el grupo de Giavalisco en el año 2005. Debido a que esta tinción es menos sensible que la tinción fluorescente Deep purple, se cargaron 250 µg de proteínas totales en los geles bi-dimensionales con la finalidad de poder visualizar el mayor número de *spots* posibles. Los *spots* se escindieron con ayuda de una punta para micropipeta y fueron puestos dentro de un tubo plástico de 1,5 ml. Cabe destacar que no todos los *spots* que presentaban cambios significativos pudieron ser escindidos pues algunos de ellos no pudieron ser visualizados.

La secuenciación de las proteínas contenidas en los *spots* se realizó mediante la técnica de espectrometría de masa en tandem (MS/MS) y el análisis de la secuenciación utilizando el programa MASCOT, que a través de los péptidos que entrega el análisis por MS/MS es capaz de identificar el mejor *hit* de esos péptidos contra las bases de datos existentes, en el Centro de Proteómica de la Universidad de Cambridge en Inglaterra (www.bio.cam.ac.uk/proteomics). En este caso se escogió el mejor *hit*, es decir, el mejor *score* entregado por el programa, para cada proteína que estuviera relacionado con *Ratus norvegicus*. El *score* entrega una medida de la probabilidad de que el resultado obtenido al realizar la comparación entre la secuencia obtenida y las secuencias contenidas en la base de datos sea al azar. Por lo tanto, al utilizar este criterio durante el análisis disminuimos la posibilidad de que la identidad de la proteína secuenciada se deba a un resultado falso-positivo. Adicionalmente, se utilizó el

porcentaje de cobertura como otro criterio para determinar la veracidad de los resultados obtenidos. El porcentaje de cobertura indica el porcentaje de la secuencia total de una proteína que es cubierto por los fragmentos secuenciados mediante espectrometría de masa.

Finalmente, para cada proteína identificada se buscó su secuencia aminoacídica completa en la base de datos publica del NCBI (www.pubmed.com) y a través del sistema de análisis de proteínas del SIB (www.expasy.org) se calculó el PM y el pI teóricos de dichas proteínas.

RESULTADOS

Puesta a punto de un protocolo de extracción eficiente de proteínas de corazón de rata, estandarización de las condiciones de corrida para la primera y segunda dimensión, y determinación de la tinción más adecuada

Todas las metodologías fueron estandarizadas utilizando muestras de ventrículo izquierdo de ratas que no habían sido sometidas a ningún tipo de intervención quirúrgica. Por lo tanto, todos los resultados que se describirán a continuación tienen relación con este tipo de animales.

Extracción de proteínas del ventrículo izquierdo de rata

Para extraer y solubilizar las proteínas de ventrículo izquierdo de corazón de rata se utilizó un protocolo basado en el descrito por el grupo de Stanley en el año 2003 (Stanley B. y col., 2003). A este protocolo se le hicieron algunas modificaciones que permitieron visualizar un mayor número de *spots* y con mejor resolución, como se verá más adelante.

El protocolo de Stanley y col. (2003) se basa en la homogenización directa del tejido con un tampón de extracción que contiene el detergente ASB-14 y la posterior solubilización en un tampón de IEF que contiene el detergente CHAPS. Cuando se examinaron los homogenizados preparados con este tampón de extracción, en un gel SDS-PAGE, fue posible observar un bandeo claro y limpio, en donde se apreciaron proteínas en un rango de PM desde 14 kDa hasta 116 kDa (Figura 6). Dado que se obtuvo un buen patrón de bandeo en el gel SDS-PAGE se procedió a evaluar la muestra en un gel bi-dimensional.

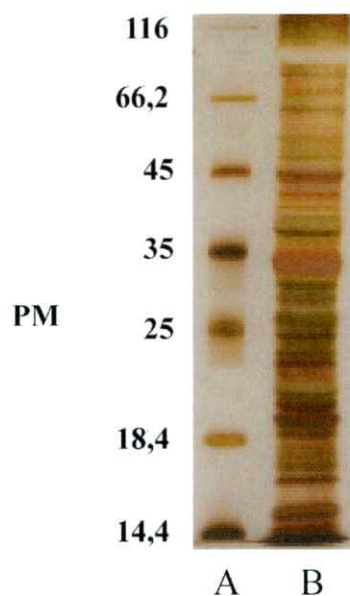


Figura 6: Gel SDS-PAGE (12%) de proteínas de ventrículo izquierdo de rata. En el carril A se observan las bandas obtenidas al cargar 1 μg del estándar de PM. En tanto que el carril B se observa el bandeo obtenido al cargar 4 μg de proteínas totales, extraídas con el protocolo adaptado de Stanley B y col., 2003. El gel fue teñido con Nitrato de plata.

Implementación de geles bi-dimensionales de proteínas de ventrículo izquierdo de rata

La muestra de proteínas totales solubilizadas en el tampón de IEF fue cargada en un gel bi-dimensional de manera de separar las proteínas por pI y PM. Con el objetivo de mejorar la resolución de las proteínas en los geles bi-dimensionales se hicieron una serie de pruebas tanto a nivel de la primera como de la segunda dimensión.

- Optimización de la separación de las proteínas a nivel de la primera dimensión

En la primera dimensión, las proteínas son separadas por pI, a través de un gel con un gradiente de pH inmovilizado (IPG *strip*). Actualmente, se encuentran comercialmente disponibles una variada gama de *strips* de diferente largo y rangos de pH, esto debido a que las muestras de proteínas provenientes de distintas fuentes no son homogéneas (no

todas sus proteínas se distribuyen en un mismo rango de pH) o en algunas ocasiones el blanco de estudio puede ser no las proteínas totales de una muestra sino un determinado grupo de ellas. Los *strips* pueden presentar rangos de pH lineales (L) y no lineales (NL), en estos últimos cada unidad de pH no cubren la misma área del gel.

Las proteínas de ventrículo izquierdo de rata fueron separadas en primera instancia en dos tipos de *strips* de 17 cm con un rango de pH de 3 a 10, L y NL. Como se observa en la Figura 7, las proteínas de ventrículo izquierdo de rata se ubicaron principalmente en un rango de pH de 4 a 8, y se obtuvo una mejor separación con el *strip* NL que permite justamente expandir más esa zona.

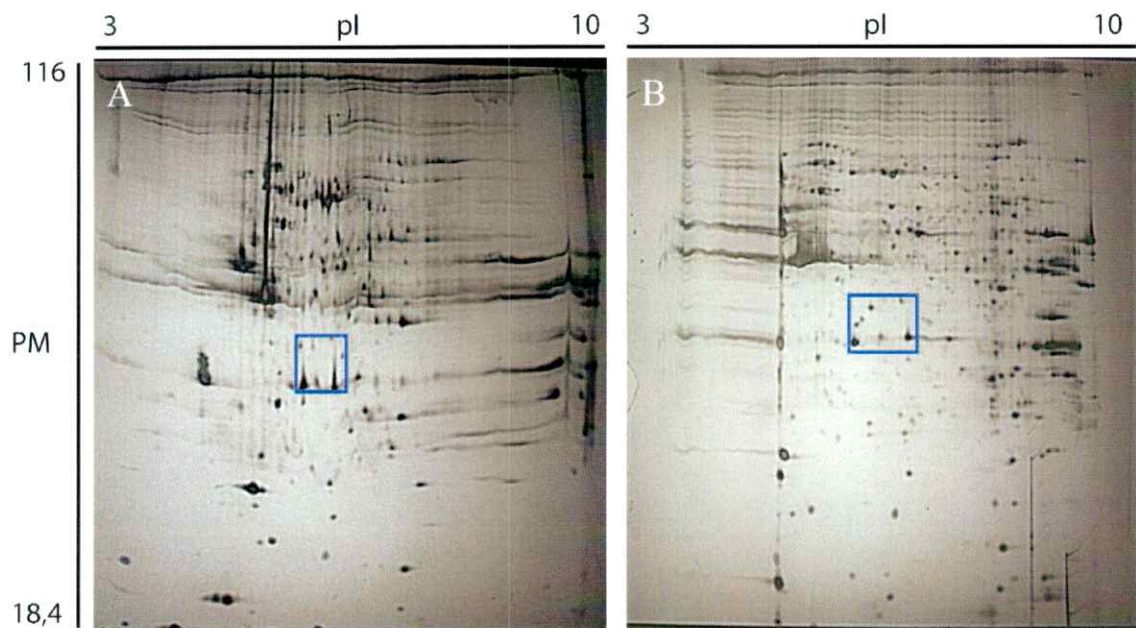


Figura 7: Optimización de la separación de proteínas totales en la primera dimensión. Geles bi-dimensionales en los que se cargaron 100 μg de proteínas totales de ventrículo izquierdo de rata, las que fueron separadas en la primera dimensión en *strip* 3-10 L (A) o *strip* 3-10 NL (B), y posteriormente por PM en geles SDS-PAGE al 12%. Ambos geles fueron teñidos con Nitrato de plata.

- Optimización de la resolución de los spots en la segunda dimensión

Si bien se obtuvo una mejor separación de las proteínas por pI con un *strip* NL, no todos los *spots* se presentaron con forma de circunferencia, como es de esperar en el caso ideal para geles bi-dimensionales (Figura 8 A y B). Es por ello que para intentar solucionar este problema se utilizó un gel concentrador al 4,5% en la parte superior de la segunda dimensión hecha al 12%. Como se puede apreciar en la Figura 8 C, de esa forma el problema fue mitigado.

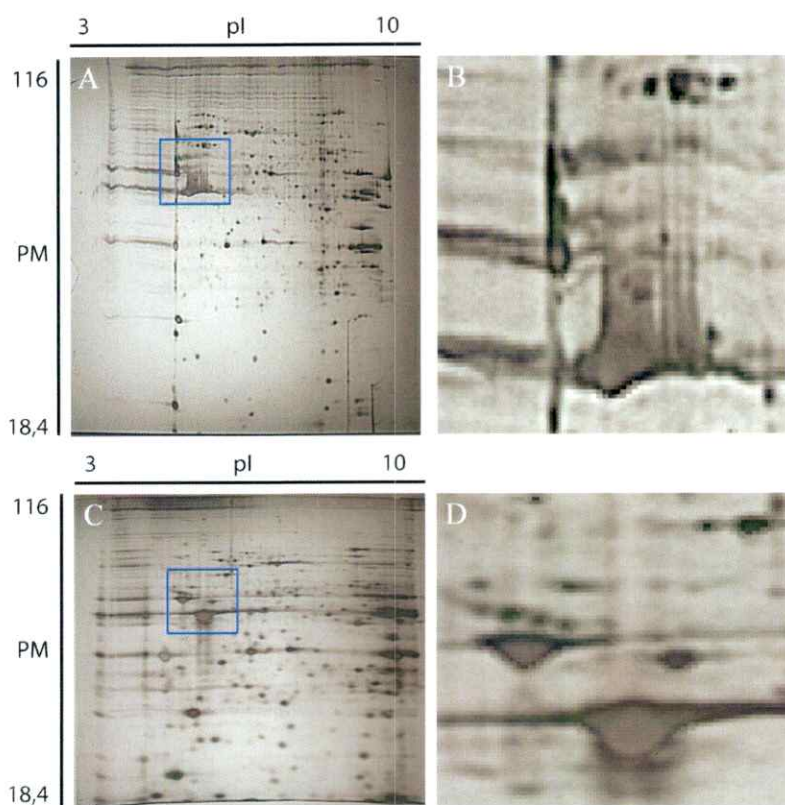


Figura 8: Optimización de la resolución de los spots en la segunda dimensión mediante la adición de un gel concentrador. Cien microgramos de proteínas totales de ventrículo izquierdo de rata fueron separadas por pI en un *strip* 3-10 NL y posteriormente por PM en un gel SDS-PAGE al 12%. (A) Fotografía de un gel bi-dimensional que fue hecho sin gel concentrador en la segunda dimensión. (B) Ampliación de una de las zonas del gel en A (cuadro azul), en que se visualiza la distorsión en la separación de las proteínas (C) Fotografía de un gel bi-dimensional al que se le adiciono un gel concentrador al 4,5% en la segunda dimensión (D) Ampliación de una de las zonas del gel en C (cuadro azul), en la que se visualiza la resolución de los *spots* luego de la adición de un gel concentrador. Los geles fueron teñidos con Nitrato de plata.

- Optimización del enfoque de las proteínas durante la primera dimensión

Como es posible apreciar en la Figura 9 A y B, otro problema detectado fue el precario enfoque de algunas las proteínas con pI inferiores a 4, produciéndose así el fenómeno conocido como “*Streaking horizontal*”.

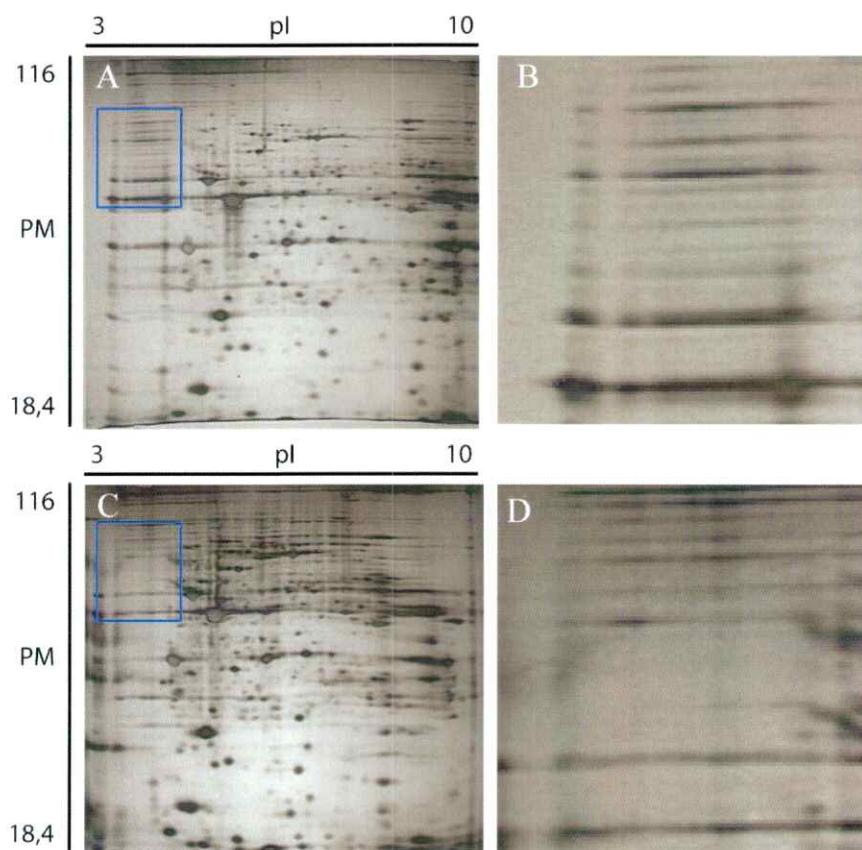


Figura 9: Optimización del enfoque de las proteínas durante la primera dimensión mediante la adición de una solución de anfólitos, con un rango de pH 3-10, en el tampón de IEF. Cien microgramos de proteínas totales de ventrículo izquierdo de rata fueron separadas por pI en *strips* 3-10 NL y posteriormente por PM en geles SDS-PAGE al 12%. (A) Fotografía de un gel bi-dimensional en que se cargaron proteínas que fueron resuspendidas en un tampón de IEF sin anfólitos. (B) Ampliación de una de las zonas del gel en A (cuadro azul), en la que se observa el mal enfoque de las proteínas. (C) Fotografía de un gel bi-dimensional en que se cargaron proteínas que fueron resuspendidas en un tampón de IEF que contenía anfólitos pH 3-10 (D) Ampliación de una de las zonas del gel en C (cuadro azul), en la que se observa la forma en que enfocaron las proteínas luego de ser resuspendidas en un tampón de IEF que contenía anfólitos. Los geles fueron teñidos con Nitrato de plata.

Para intentar solucionar este problema se utilizó una solución de anfolitos con un rango de pH 3-10, los que fueron incorporados al tampón de IEF. Como se observa en la Figura 9 C, esto permitió disminuir notoriamente el problema de *streaking* horizontal.

- *Optimización de la separación de los spots a nivel de la segunda dimensión*

Si bien en un caso ideal se espera que cada *spot* presente en un gel bi-dimensional corresponda a una proteína, existen algunos autores que han reportado que esto no es así en todos los casos (Campostrini N. y col., 2005; Krah A. y col., 2004). Frente a esta situación se decidió optar por la generación de gradientes de poliacrilamida en la segunda dimensión, los cuales, en comparación a los geles con porcentaje de poliacrilamida uniforme, son capaces de separar con mayor eficiencia las proteínas que presentan un valor de PM cercano. Basados en el rango de PM de las proteínas totales de ventrículo izquierdo de rata se hicieron geles SDS-PAGE con un gradiente de poliacrilamida del 12 al 14%. Este tipo de gel efectivamente mejoró la separación de los *spots* pues se logró visualizar con la ayuda del programa Delta 2D aproximadamente 150 *spots* más que con los geles de porcentaje de poliacrilamida fijo (Figura 10).

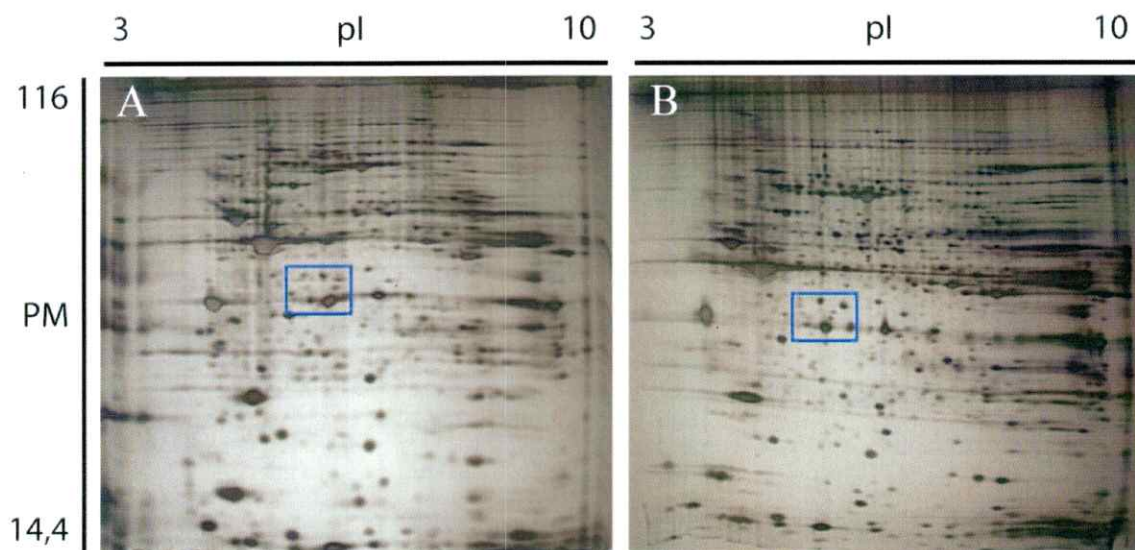


Figura 10: Optimización de la separación de los *spots* en la segunda dimensión mediante el uso de geles SDS-PAGE en gradiente. Cien microgramos de proteínas totales de ventrículo izquierdo de rata fueron separadas por pI en un *strip* 3-10 NL y posteriormente por PM. (A) Fotografía de un gel bi-dimensional en el que se utilizó un gel SDS-PAGE al 12% en la segunda dimensión. (B) Fotografía de un gel bi-dimensional en el que se utilizó un gel SDS-PAGE en gradiente (12-14%) en la segunda dimensión. Los cuadros azules, ubicados en una misma región de los geles, indican una zona para comparar la distribución de los *spots*. Los geles fueron teñidos con Nitrato de plata.

Tinción de los geles bi-dimensionales de proteínas de ventrículo izquierdo de rata

Existen variados protocolos de tinción de geles bi-dimensionales, los cuales presentan ventajas y desventajas inherentes a cada una de ellas. Con el fin de poder visualizar un mayor número de *spots* se probaron 3 diferentes tipos de tinciones: Coomassie coloidal, Nitrato de plata y Deep Purple. El Coomassie coloidal resultó ser la tinción más ineficiente, pues permitió visualizar un número claramente inferior de *spots* en comparación con las otras tinciones (Tabla 3). Por otro lado, si bien la tinción con plata y la tinción fluorescente Deep Purple permitieron visualizar un número muy similar de *spots*, la tinción Deep Purple logró disminuir notablemente el ruido causado por la tinción que se acumula inespecíficamente, lo que es posible observar en la Figura 11.

Tabla 3: Número aproximado de *spots* que pudo ser detectado utilizando diferentes tipos de tinciones con el apoyo del programa Delta 2D.

TINCIÓN	NÚMERO DE <i>SPOTS</i> VISUALIZADOS
Coomassie coloidal	~ 600
Nitrato de plata	~1.000
Deep Purple	~1.000

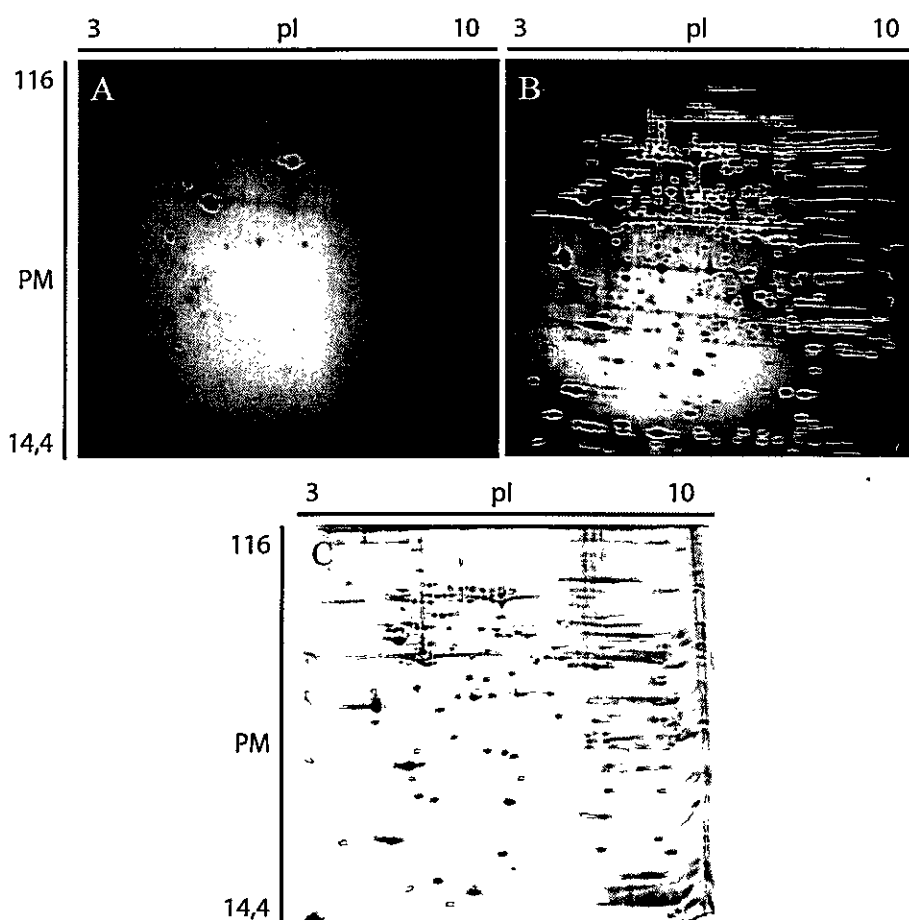


Figura 11: Uso de diferentes tinciones para la visualización de *spots* en geles bi-dimensionales. Cien microgramos de proteínas totales fueron separadas por pI en un *strip* 3-10 NL y posteriormente por PM en un gel SDS-PAGE en gradiente (12-14%). (A) Fotografía de un gel bi-dimensional en que las proteínas fueron teñidas con Coomassie coloidal. (B) Fotografía de un gel bi-dimensional en que las proteínas fueron teñidas con Nitrato de plata. (C) Fotografía de un gel bi-dimensional en que las proteínas fueron teñidas con Deep Purple.

Puesta a punto de un protocolo de extracción eficiente de proteínas de plasma de rata, estandarización de las condiciones de corrida para la primera y segunda dimensión, y determinación de la tinción más adecuada

Todas las metodologías fueron estandarizadas utilizando muestras de plasma de ratas que no habían sido sometidas a ningún tipo de intervención quirúrgica. Por lo tanto, todos los resultados que se describirán a continuación tienen relación con este tipo de animales.

Extracción de proteínas de sangre de rata

Para obtener el plasma sanguíneo, fracción en donde se encuentran las proteínas, las muestras de sangre se centrifugaron según el protocolo descrito en la sección Métodos. Luego, para solubilizar las proteínas se utilizó el mismo tampón de IEF que para las muestras de ventrículo. El protocolo fue evaluado mediante geles SDS-PAGE y geles bi-dimensionales.

Cuando las muestras de plasma fueron corridas en un gel SDS-PAGE fue posible observar un bandeo claro y limpio, en donde la mayor parte de las proteínas tenían un PM superior a los 35 kDa (Figura 12 A y B).

Remoción de albúmina e inmunoglobulinas

Mucho se ha discutido en la literatura acerca de que las proteínas de plasma son difíciles de resolver en geles bi-dimensionales debido a la presencia de proteínas muy abundantes como la albúmina y las Ig, las cuales constituyen entre un 60-80% de las proteínas

totales (Björhall K y col. 2005). La presencia de estas proteínas se plantea que apantalla a otras y limita la cantidad de proteínas que pueden ser resueltas.

Para remover de las muestras tanto la albúmina como las IgG se utilizó el Aurum Serum Protein Mini Kit. Como se puede apreciar en la Figura 12 tanto la albúmina como las Ig fueron removidas paralelamente al ser tratadas las muestras con el *Kit*. Además se observó que algunas proteínas fueron removidas inespecíficamente.

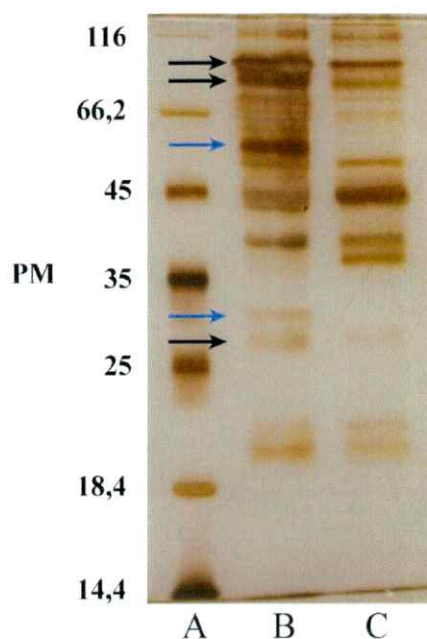


Figura 12: Gel SDS de proteínas de plasma de rata antes y después de la remoción de la albúmina usando el Aurum Serum Protein Mini kit. En el carril A se observan las bandas obtenidas al cargar 2 μg del estándar de PM. En los carriles B y C se observa el bandeado obtenido al cargar 4 μg de proteínas totales de plasma y de la muestra deplétada de albúmina e IgG, respectivamente. El gel fue teñido con Nitrato de plata. Las flechas negras indican de mayor a menor PM: albúmina, cadena pesada de la IgG y cadena liviana de la IgG. Las flechas azules indican algunas de las proteínas perdidas luego del tratamiento de la muestra con el *kit*.

Implementación de geles bi-dimensionales de proteínas de plasma de rata

Las muestras tanto tratadas como no tratadas con el *kit* fueron cargadas en geles bi-dimensionales de manera de separar las proteínas por pI y PM. En los geles bi-

dimensionales de proteínas de plasma que no fueron depletadas fue posible observar *spots* bien definidos y enfocados, y se detectaron cerca de 350 *spots*. En el caso de los geles bi-dimensionales de proteínas de plasma depletadas, no se obtuvieron geles de buena calidad al cargar 100 μg de proteínas, ya que muchas de las proteínas no lograron enfocar correctamente. Este problema fue solucionado al cargar 30 μg de proteínas pero esto generó una disminución en el número de proteínas detectadas, aproximadamente 300 *spots*, por lo que se descartó el uso del *Kit* (Figura 13).

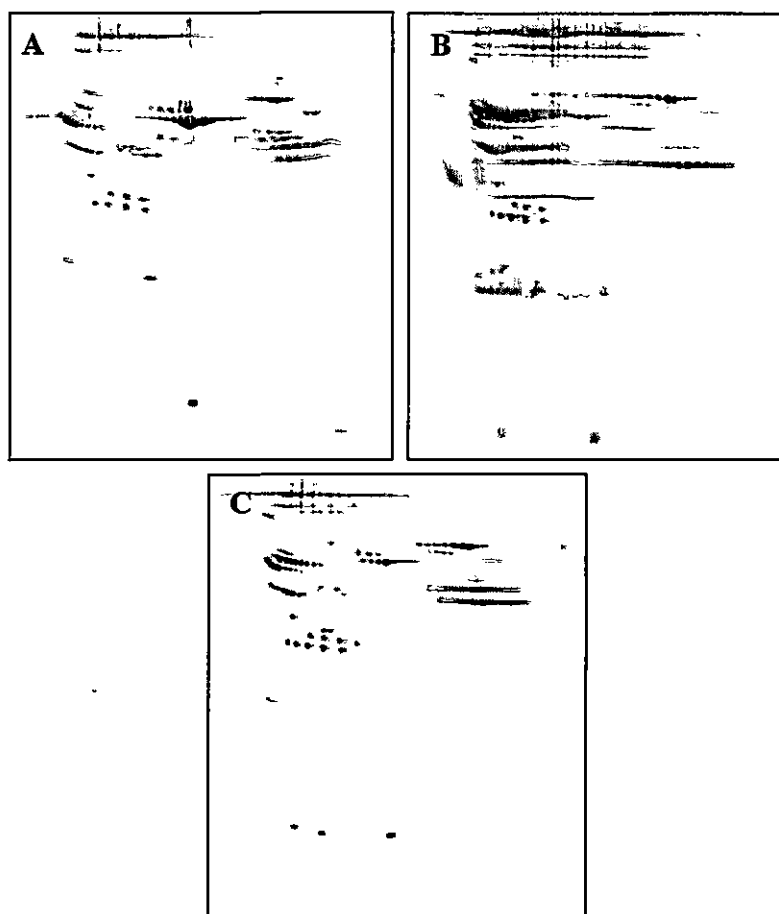


Figura 13: Geles bi-dimensionales de proteínas totales de plasma de rata depletadas y no depletadas. Geles bi-dimensionales en gradiente (11,5 – 14%) de 17 cm. de ancho por 17 cm. de alto. (A) Fotografía de un gel bi-dimensional en el que se cargaron 100 μg de proteínas totales de plasma de rata no depletado. (B) Fotografía de un gel bi-dimensional en el que se cargaron 100 μg de proteínas totales de plasma de rata depletado. (C) Fotografía de un gel bi-dimensional en el que se cargaron 30 μg de proteínas totales de plasma de rata depletado. Los geles fueron teñidos con la tinción fluorescente Deep Purple.

Implementación del modelo de infarto cardiaco quirúrgico en ratas

Se implementó el modelo de infarto cardiaco quirúrgico permanente en ratas mediante la ligación de la arteria coronaria descendente anterior siguiendo la técnica descrita por Piddo y colaboradores (1996) (Figura 14), ya que está ha sido reportada como una técnica de baja mortalidad en ratas y que la mantención de los animales infartados no requiere soportes adicionales. Además, ha sido descrita como altamente reproducible (Piddo A. y col., 1996; Hu K. y col., 1996).

En nuestras manos, el porcentaje de sobrevida tanto de las ratas sham como de las infartadas fue del 85% al quinto día post-procedimiento quirúrgico, en tanto que en el 83% de los animales infartados fue posible observar macroscópicamente la escara de color blanquecina al momento de extraer el corazón, junto con el adelgazamiento de la pared ventricular (Figura 14 B y D). La muerte de las ratas se produjo fundamentalmente durante la operación, siendo la principal causa una insuficiencia respiratoria peri-operatoria. Al realizar la necropsia, se observó que 5/6 animales fallecidos mostraban evidencias de infección pulmonar por *Mycoplasma pulmonis*.

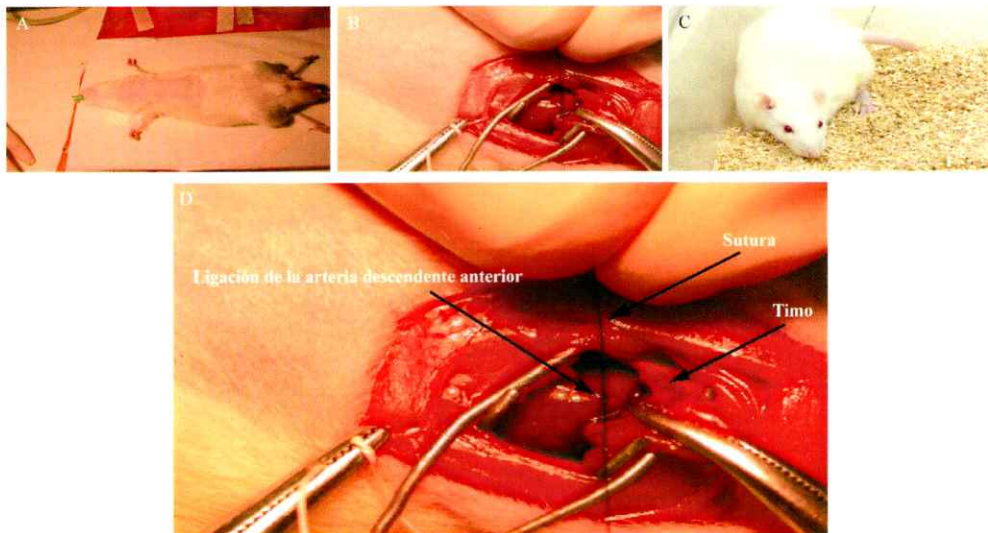


Figura 14: Cirugía para producir un IM permanente en ratas. (A) Fotografía de una rata anestesiada e intubada para ser ventilada durante el procedimiento quirúrgico. (B) Fotografía del momento en que se ligo la arteria descendente anterior. (C) Fotografía de una rata al quinto día de haber sido infartada quirúrgicamente. (D) Imagen ampliada de la fotografía B que permite observar con mayor claridad el momento de la ligación de la arteria. Las flechas negras indican el timo (órgano que debe ser desplazado para poder acceder al corazón), la sutura con la cual se ligó la arteria coronaria descendente anterior y el sitio donde se efectuó la ligación.

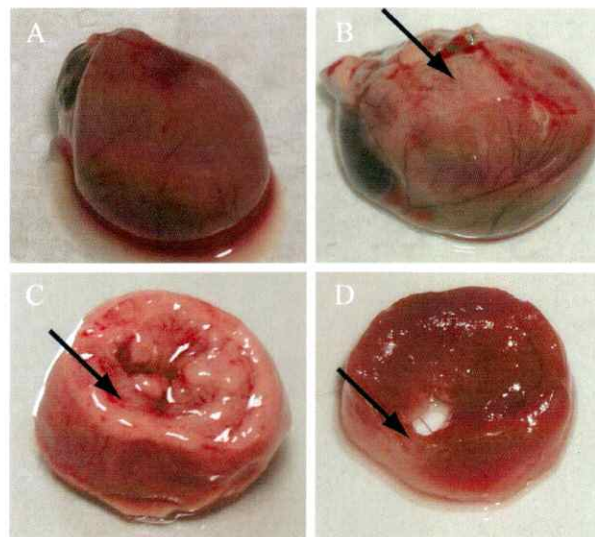


Figura 15: Determinación macroscópica del IM. (A) Fotografía de un corazón proveniente de una rata sham al quinto día post-procedimiento quirúrgico (B) Fotografía de un corazón proveniente de una rata infartada a la que se le extrajo el corazón al quinto día post-IM. En el corazón infartado es posible apreciar la escara de color blanquecino que se extiende a lo largo del ventrículo izquierdo (flecha negra). (C) Corte transversal del corazón de una rata sham al quinto día post-procedimiento quirúrgico (D) Corte transversal del corazón de una rata infartada a la que se le extrajo el corazón al quinto día post-IM. En el corazón infartado es posible apreciar el adelgazamiento de la pared del ventrículo izquierdo. En las fotografías C y D la flecha negra indica la pared ventricular izquierda.

Identificación de las proteínas que se encuentran diferencialmente en el ventrículo izquierdo de ratas sham e infartado al quinto día post-procedimiento quirúrgico.

Los resultados obtenidos por Luz y col. (2007) demostraron que es posible detectar MSC en el torrente sanguíneo de ratas infartadas al tercer, quinto y séptimo día post-IM, con un máximo al quinto día post-IM (presencia de MSC en el torrente sanguíneo en un 80% de los animales). Dado que se desconoce la ventana de tiempo en la que es generada la señal de movilización de MSC, se escogió el día en que se observó un mayor número de animales en los que existía movilización de MSC para realizar los análisis proteómicos, es decir, todos los análisis se realizaron comparando el proteoma del ventrículo izquierdo de ratas sham versus el de ratas infartadas, transcurridos cinco días del procedimiento quirúrgico.

Con el fin de poder comparar el proteoma del ventrículo izquierdo de los animales que se encontraban en la condición antes señalada, se extrajeron las proteínas totales de tres muestras biológicas pertenecientes a la condición sham y tres muestras biológicas pertenecientes a la condición infartada, las que fueron agrupadas según su condición para generar *pools* de acuerdo al protocolo descrito en la metodología. Una vez constituidos los *pools*, las muestras se cargaron en un gel SDS-PAGE para separar las proteínas por PM, y en geles bi-dimensionales para separarlas tanto por pI como por PM, lo que permite visualizar un mayor número de proteínas.

En el gel SDS-PAGE no se observan grandes variaciones en el patrón de bandeo para las distintas replicas técnicas, lo que demuestra el buen nivel de repetibilidad alcanzado entre los geles en que se cargaron proteínas de una misma condición (Figura 16).

En el caso de los geles bi-dimensionales la situación no fue muy diferente pues se logró obtener geles con un patrón de *spots* muy similares entre los geles en que se cargaron proteínas de una misma condición. En la Figura 17 se muestra un gel bi-dimensional representativo de proteínas totales de ventrículo izquierdo de rata sham e infartada, respectivamente.

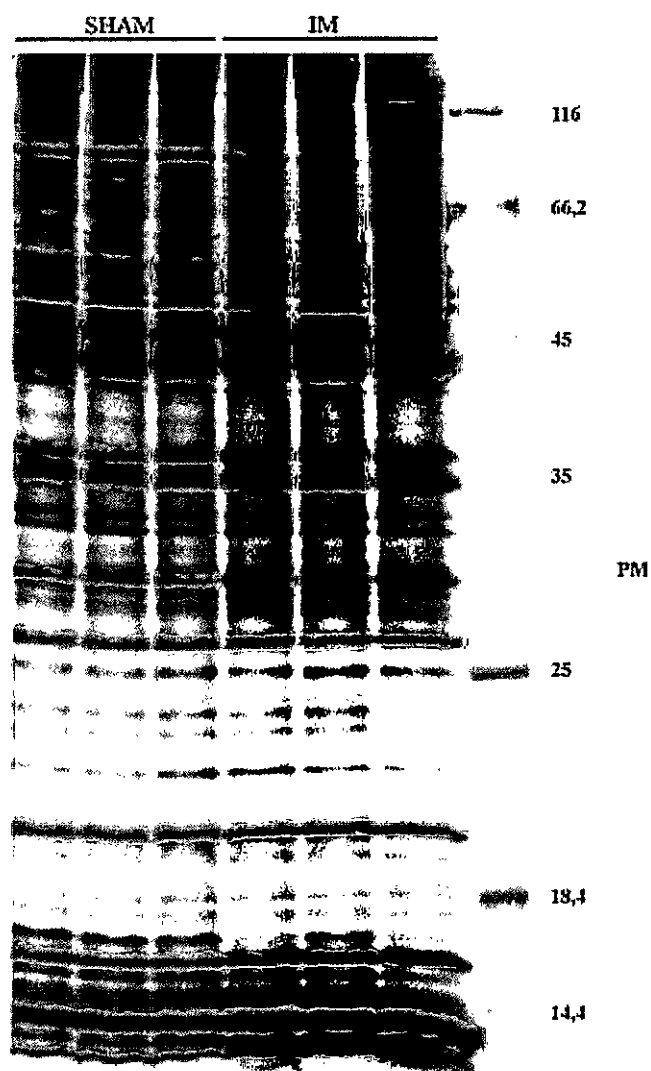


Figura 16: Gel SDS-PAGE de proteínas totales de ventrículo izquierdo de ratas sham e infartadas, al quinto día post-procedimiento quirúrgico. Cuatro microgramos de proteínas totales provenientes del *pool* perteneciente a la condición sham y 4 μg del *pool* perteneciente a la condición infartada, fueron separadas por PM en un gel SDS-PAGE de 17 cm de largo al 12%. Se cargó 2 μg de un estándar de PM. El gel fue teñido con la tinción fluorescente Deep Purple.

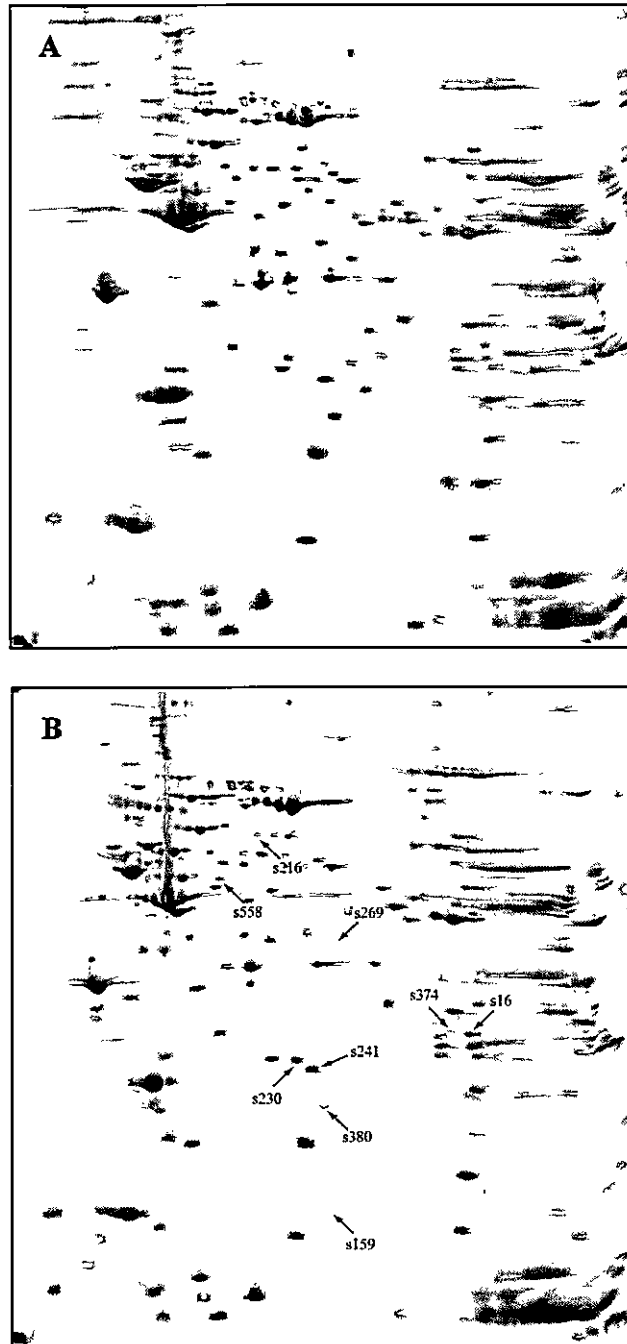


Figura 17: Geles bi-dimensionales de proteínas totales de ventrículo izquierdo de ratas sham e infartada, al quinto día post-procedimiento quirúrgico. Cien microgramos de proteínas provenientes del *pool* perteneciente a la condición control (A) y de la condición infartado (B) fueron separadas por pI y pM en geles bi-dimensionales. Los geles SDS-PAGE de 17 cm de ancho por 17 cm de alto utilizados en la segunda dimensión fueron hechos con un gradiente de poliacrilamida del 11,5 al 14%. Los geles fueron teñidos con la tinción fluorescente Deep Purple. Los números (sN°) indican la ubicación en el gel de los *spots* que cambian su abundancia y que fueron secuenciados.

Para los *spots* de cada condición se determinó el coeficiente de variación (CV), parámetro que permite discriminar si la abundancia de las proteínas permanece constante entre las distintas replicas. Dicho coeficiente se obtiene al dividir el valor de la desviación estándar del %V de un *spot* por el valor promedio del %V de ese *spot* en particular. Al realizar este cálculo el resultado no fue superior a 0,5 para la mayoría de las proteínas (dato no mostrado). Este número representa la máxima variación sugerida por algunos autores para las desviaciones propias de los geles bi-dimensionales (Cloe L. y col., 2003; Molloy M. y col., 2003).

A pesar de que se utilizó un gel SDS-PAGE que tenía 17 cm de largo para separar las proteínas por PM, no fue posible detectar un mayor número de bandas que las observadas en un gel de tamaño estándar (Figura 16). En el caso de los geles bi-dimensionales (Figura 17) sí fue posible detectar diferencias en el patrón de abundancia de las diferentes condiciones. Del total de *spots* analizados, 25 cambiaron significativamente. Cabe destacar que de los 1000 *spots* detectados, 601 de ellos fueron analizables por estar bien resueltos y por su buen nivel de repetibilidad entre las replicas. En la mayoría de los casos las diferencias resultaron ser sutiles, siendo difícil apreciarlas a simple vista. Con la ayuda del programa Delta 2D y el posterior análisis estadístico fue posible determinar los cambios significativos entre ambas condiciones, ya sea aumento o disminución en la abundancia de algunos de los *spots*.

La Figura 18 ilustra los cambios en la abundancia de los 9 *spots* seleccionados para su identificación mediante espectrometría de masa (MS/MS), siendo considerados positivos debido a que su *mouse score* estaba por sobre un percentil de significancia del 95%. La Tabla 4 resume algunas de las características e información de estas proteínas.

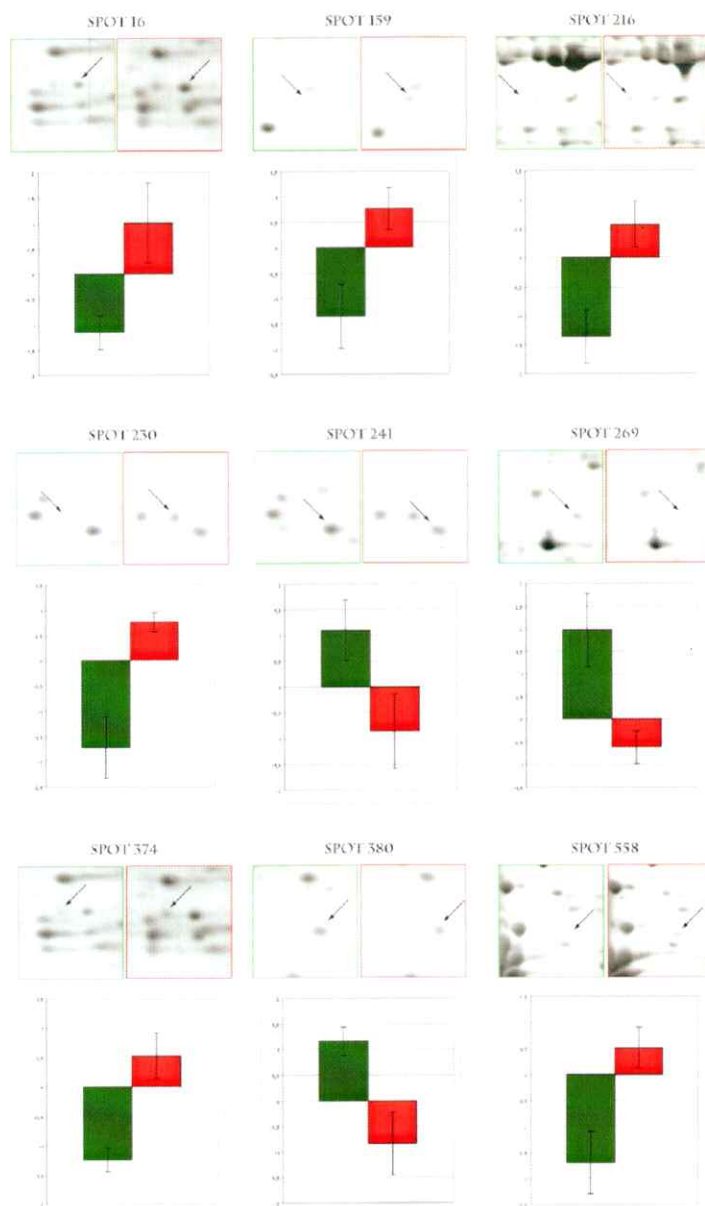


Figura 18: Identificación de proteínas de ventrículo izquierdo de rata que presentan cambios significativos en su abundancia entre las condiciones sham e infartado, al quinto día post-procedimiento quirúrgico. Cambios estadísticamente significativos en la abundancia de varias proteínas fueron identificados en geles bi-dimensionales. En la figura se representan en forma de barras, con sus respectivas desviaciones estándar, los cambios en la abundancia de las proteínas secuenciadas. La localización de las proteínas en geles representativos de cada condición se ilustra en recuadros que se encuentran sobre sus respectivas barras, con una flecha indicando específicamente el *spot* analizado, mientras que el número de cada proteína se encuentra en la parte superior de cada esquema. Las barras, al igual que los recuadros de color verde, representan las proteínas en la condición sham mientras que las barras y recuadros de color rojo representan la condición infartado. El eje de las ordenadas corresponde a unidades arbitrarias y el análisis fue realizado sobre la base de los resultados obtenidos desde 3 replicas técnicas.

Tabla 4. Proteínas secuenciadas de ventrículo izquierdo de rata. Se muestra la identidad y algunas características de nueve proteínas que presentan una abundancia diferencial en el ventrículo izquierdo de ratas infartadas que movilizan MSC en el torrente sanguíneo.

Nº de spot	gi	Nombre	pI/PM ^{Teóricas}	Abundancia	Score	% de cobertura
s16	9506445	Anhídrida Carbonica 2	6,9/29,1	↑	541	53,5
s159	55778687	Cadena liviana 1 de la Ferritina	6,0/20,7	↑	263	47,5
s216	38382858	Disulfuro Isomerasa 3	5,9/56,6	↑	1160	52,3
s230	8393804	Cadena pesada de la Miosina, polipeptido 6	5,6/223,5	↑	459	5,6
s241	11968132	Peroxióxido 3	7,1/28,3	↓	333	30,4
s269	62531217	Ndufa10	7,6/40,5	↓	394	40,6
s374	9506445	Anhídrida Carbonica 2	6,9/29,1	↑	453	43,1
s380	16924002	DJ-1	6,3/20,0	↓	152	57,7
s558	7533042	Guanina desaminasa	5,5/50,9	↑	326	36,8

Identificación de las proteínas que se encuentran diferencialmente en el plasma de ratas sham e infartadas al quinto día post-procedimiento quirúrgico.

Se comparó el proteoma del plasma de ratas sham con el de ratas infartadas, que se encontraban en el quinto día de ocurrido el procedimiento quirúrgico. Al igual que en el caso de las muestras de proteínas de ventrículo izquierdo de rata se logró una buena repetibilidad al nivel del bandeo en el gel SDS-PAGE como en el patrón de *spots* de los geles bi-dimensionales. El coeficiente de variación no fue superior a 0,5 para la mayoría de los *spots* (dato no mostrado).

A diferencia del gel SDS-PAGE (Figura 19), los geles bi-dimensionales (Figura 20) permitieron detectar diferencias en el patrón de abundancia de las diferentes condiciones, y con la ayuda del programa Delta 2D y el posterior análisis estadístico fue posible detectar cambios significativos entre ambas condiciones. Del total de los *spots* analizados, 40 de ellos cambiaron significativamente. Cabe destacar que de los 350 *spots* detectados, 269 de ellos fueron analizables.

La figura 21 ilustra los cambios en la abundancia de los 9 *spots* seleccionados para su identificación mediante espectrometría de masa (MS/MS), siendo considerados positivos debido a que su *mowse score* estaba por sobre un percentil de significancia del 95%. En la Tabla 5 resumen la información de estas proteínas.

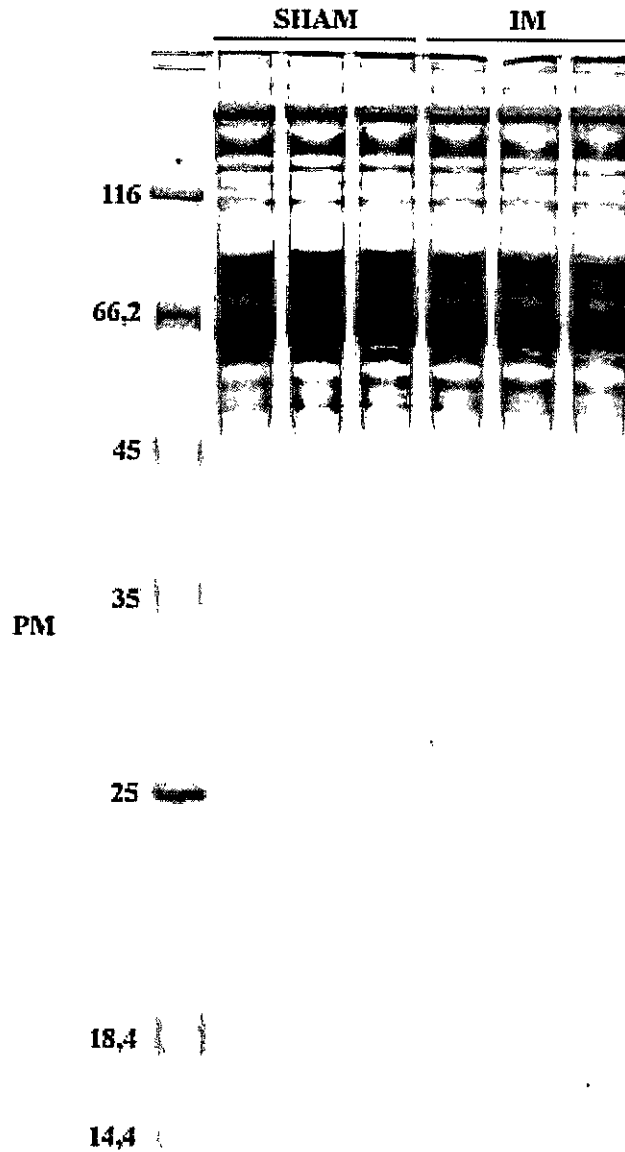


Figura 19: Gel SDS-PAGE de proteínas totales de plasma de ratas sham e infartadas, al quinto día post-procedimiento quirúrgico. Cuatro microgramos de proteínas totales provenientes del *pool* perteneciente a la condición sham y 4 μg del *pool* perteneciente a la condición infartada, fueron separadas por PM en un gel SDS-PAGE de 17 cm de largo al 12%. Para determinar de manera aproximada el rango de PM que tenían las proteínas se cargó 2 μg de un estándar de PM. El gel fue teñido con la tinción fluorescente Deep Purple.



Figura 20: Geles bi-dimensionales de proteínas totales de plasma de ratas sham e infartadas, al quinto día post-procedimiento quirúrgico. Cien microgramos de proteínas totales provenientes del *pool* perteneciente a la condición sham (A) y pertenecientes a la condición infartado (B) fueron separadas por pI y PM en geles bi-dimensionales en gradiente (11,5 – 14%) de 17 cm de ancho por 17 cm de alto. Los geles fueron teñidos con la tinción fluorescente Deep Purple. Los números (sN°) indican la ubicación en el gel de los *spots* que cambian su abundancia y que fueron secuenciados.

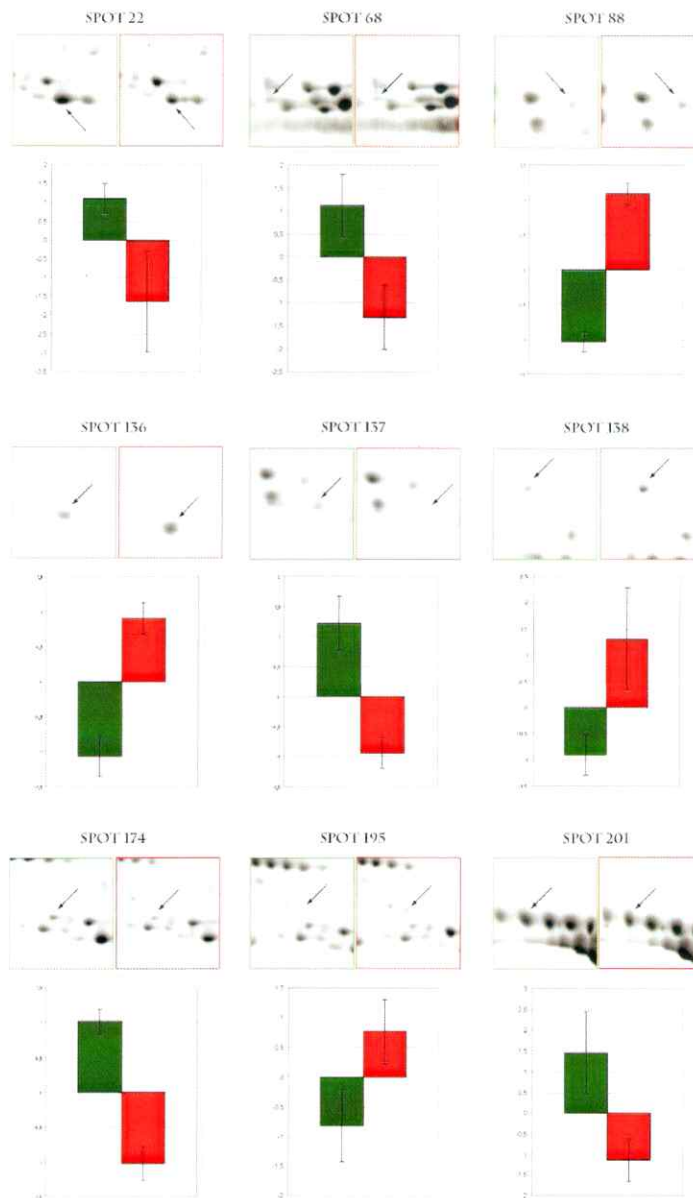


Figura 21: Identificación de proteínas de plasma de rata que presentan cambios significativos en abundancia entre las condiciones sham e infartado, al quinto día post-procedimiento quirúrgico. Cambios estadísticamente significativos en la abundancia de varias proteínas fueron identificados en geles bi-dimensionales. En la figura se representan en la forma de barras con la desviación estándar de las mediciones realizadas los cambios en la abundancia de las proteínas enviadas a secuenciar. La localización de las proteínas en geles representativos de cada condición se ilustra en recuadros que se encuentran a la derecha de sus respectivas barras, con una flecha indicando específicamente el *spot* analizado, mientras que el número de cada proteína se encuentra en la parte superior de cada esquema. Las barras, al igual que los recuadros de color verde, representan las proteínas en la condición sham mientras que las barras y recuadros de color rojo representan la condición infartado. El eje de las ordenadas corresponde a unidades arbitrarias y el análisis fue realizado sobre la base de los resultados obtenidos desde 3 replicas técnicas.

DISCUSIÓN

Puesta a punto de un protocolo de extracción eficiente de proteínas de corazón y de plasma de rata, estandarización de las condiciones de corrida para la primera y segunda dimensión, y determinación de la tinción más adecuada

La etapa más importante en el proceso de obtención de geles bi-dimensionales es la preparación de la muestra. Cualquier modificación introducida artefactualmente en esta etapa puede invalidar más tarde los resultados (Macri J. y col., 2001). De esa forma, el excelente poder de resolución de los geles bi-dimensionales es un “arma de doble filo”, ya que no discrimina entre modificaciones post-traduccionales y modificaciones artefactuales (Jäger D. y col. 2002).

No existe un método único para la preparación de muestras, ellos varían según la naturaleza de éstas y según lo que se desee analizar (proteínas con determinadas características físicoquímicas o una determinada localización subcelular, entre otras), pero existen algunas consideraciones generales que deben ser tomadas en cuenta para cualquier tipo de muestra. El tampón de extracción de proteínas seleccionado debe ser capaz de solubilizar la mayor cantidad posible de proteínas de un tejido/célula o compartimiento celular. Para ello debe lograr romper enlaces iónicos, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro, en condiciones que deben ser compatibles con el IEF (Shaw M. y Riederer B., 2003).

En el caso de las muestras de corazón existen en la literatura una serie de protocolos para la extracción de proteínas, debido al amplio uso de la proteómica como herramienta

para el estudio de las alteraciones en la abundancia de proteínas en diferentes enfermedades cardíacas los que, en su gran mayoría, tienen como fin identificar nuevos marcadores moleculares (McGregor E. y Dunn M., 2006; Loscalzo J., 2003; Dos Remedios C. y col., 2003; Jäger D. y col., 2002; Macri J. y Rapundalo S., 2001). El protocolo utilizado en esta tesis para la extracción de proteínas de corazón mostró ser eficiente pues al correr geles SDS-PAGE fue posible apreciar un patrón de bandas discretas, en donde se observaron proteínas en un rango de PM desde 14 kDa hasta 116 kDa (Figura 5). Además, el rendimiento fue adecuado ya que la cantidad de proteínas obtenidas a partir de 100 mg de tejido fue de alrededor de 8 mg, lo que permitió disponer de una cantidad adecuada de cada muestra, tomando en cuenta que por lo general, en un gel bi-dimensional se utilizan entre 50 µg y 500 µg de proteínas.

Para la obtención de proteínas totales de plasma y suero también existen una serie de protocolos. En este caso, a diferencia de lo que ocurre al extraer proteínas desde un tejido, su obtención es más simple debido a que las proteínas ya se encuentran en solución. Así, el énfasis está puesto en el desarrollo de técnicas que permitan remover las proteínas más abundantes que pueden enmascarar a otras proteínas - como es el caso de la albúmina que representa cerca del 55% de las proteínas totales del plasma en humano - y limita la cantidad de proteínas que más tarde pueden ser visualizadas en un gel bi-dimensional (Colantonio D. y col., 2005; Fu Q. y col., 2005; Björhall K. y col., 2004; Ahmed N. y col., 2003). Este problema se acrecienta producto del amplio rango dinámico de las proteínas presentes en este tipo de muestras pues es posible encontrar proteínas como la albúmina que tiene un rango normal de concentración de $35-50 \times 10^9$ pg/ml y proteínas como la interleuquina-6 (IL-6) que tiene un rango normal de

concentración de 0-5 pg/ml, de manera que el rango dinámico en este sistema es de cerca de nueve ordenes de magnitud (Hunsucker S. y Duncan M., 2006; Anderson N. y Anderson N., 2002). Es por ello que se planteó, en el transcurso de este trabajo, el uso de técnicas especialmente diseñadas para la remoción de proteínas abundantes en el plasma. Los resultados obtenidos al tratar las muestras de plasma con el *kit* “Aurum serum protein mini”, utilizado para remover albúmina e Ig, no fueron los esperados. Si bien se logró remover un buen porcentaje de ambas proteínas también se observó la remoción inespecífica de otras. En geles SDS-PAGE se observó que algunas de las bandas que aparecían en las muestras de plasma no tratado no se encontraban presentes en las muestras depletadas (Figura 11). Este resultado podría deberse a que uno de los componentes del *kit* es el fluoróforo “Cibacron Blue F3GA”, que tiene una alta capacidad de unir albúmina pero no es selectivo para ella y, si bien en el desarrollo del *kit* se han optimizado las condiciones que permiten aumentar la afinidad por las moléculas de albúmina, esto no es garantía de que no ocurrirá remoción inespecífica. Dado que se desconoce a priori cuales proteínas están involucradas en el proceso de movilización de las MSC es importante poder analizar el mayor número posible de proteínas, por lo que la pérdida de algunas proteínas durante el tratamiento dirigido a la remoción de albuminas e Ig no responde a las necesidades del estudio.

La electroforesis en geles bi-dimensionales es uno de los métodos más utilizados para el análisis y caracterización de proteínas. La técnica permite separar moléculas cargadas, y explota diferencias en movilidad de las proteínas cuando se les somete a la acción de un campo eléctrico, permitiendo además obtener una alta resolución, ya que es posible resolver mezclas complejas de proteínas en un único evento experimental. La separación

se hace inicialmente en base al pI de las proteínas, y en un segundo paso, por su PM mediante una electroforesis en geles SDS-PAGE. El desarrollo de gradientes preestablecidos de pH (IPG: Immobilized pH Gradient Strips) utilizados en la primera dimensión ha contribuido sustancialmente a la gran acogida de la técnica. Estos gradientes de pH inmovilizados han dado lugar a una gran repetibilidad, permitiendo un mejor análisis de los resultados obtenidos (Hunsucker S. y Duncan M., 2006).

Con el objetivo de mejorar la resolución de las proteínas de corazón en los geles bi-dimensionales se hizo una serie de pruebas, tanto a nivel de la primera como de la segunda dimensión. En la actualidad es posible disponer comercialmente de *strips* con diferentes gradientes de pH, con extremos comprendidos entre pH 3 a pH 12, y diferentes largos que van desde 7 a 24 cm. En una primera etapa se escogió utilizar las condiciones de isoelectroenfoque que permitían obtener un panorama general, es decir, se utilizaron *strips* con un rango de pH amplio. Se determinó que se obtenían mejores resultados a nivel de la separación de las proteínas de corazón en la primera dimensión al utilizar un *strip* con un rango de pH de 3 a 10 NL. Esto se debe a que las proteínas obtenidas desde el ventrículo izquierdo de rata poseían en su mayoría un pI en el rango de 4 a 8, rango en el que los *strips* con gradientes de pH NL permiten separar mejor las proteínas con estos PI (Figura 7).

Por otra parte, para mejorar la resolución de los *spots* en la segunda dimensión se reemplazó el uso de un sistema continuo, en el que existe un único gel separador, por un sistema discontinuo o de Laemmli, en el que existe un gel concentrador y un gel separador. Esto permitió que los *spots* que presentaban “forma de cometa” se delimitaran y fueran circulares (Figura 8). Esta modificación se obtuvo gracias al efecto

del gel concentrador, el que permite que las proteínas ingresen al gel separador prácticamente al mismo tiempo, por efecto de su tamaño de poro y pH, lo que mejora considerablemente la resolución de los geles.

En una tercera etapa se adicionó anfolitos con un rango de pH 3-10 con el fin de solucionar el problema de “*streaking*” horizontal, fenómeno que se produce debido a la dificultad en enfocar de algunas proteínas, las cuales se presentan como bandas en lugar de hacerlo como círculos. Los anfolitos son moléculas pequeñas, solubles y anfotéricas, con alta capacidad tamponante cerca de su pI. Estas moléculas aumentan la solubilidad de las proteínas al ayudar a estabilizar sus cargas e inhiben la interacción entre las proteínas y las inmobilinas presentes en los *strips* usados para el IEF (Cañas B. y col., 2007; Khoudoli G. y col., 2004). El adicionar estas moléculas permitió eliminar casi por completo el problema de *streaking* debido a que estas moléculas incrementan el enfoque de las proteínas en la primera dimensión al aumentar su solubilidad (Figura 9) (Swatton JE. y col., 2004).

Por otra parte, para mejorar la separación de las proteínas en la segunda dimensión, se sustituyeron los geles con concentración uniforme de acrilamida (12%) por geles que tenían un gradiente creciente de concentración de acrilamida (11,5%-14%) y en consecuencia un gradiente decreciente en el tamaño de poro. Esto permitió que se pudiese apreciar un mayor número de *spots* debido a que con los geles en gradiente se incrementa el rango de pesos moleculares que pueden resolverse en un mismo gel comparados con los que poseen un porcentaje de poliacrilamida fijo (Figura 10) (Suurs y col., 1989).

Finalmente, se intentó aumentar el número de *spots* que podían ser visualizados por medio de diferentes tipos de tinciones. En este caso se utilizaron tres tipos de tinción: Coomassie coloidal – que tiene un límite de detección de entre 8-10 ng de proteína - tinción con Nitrato de plata – la cual posee una mayor sensibilidad que la tinción de Coomassie ya que tiene un límite de detección de entre 3-5 ng, pero que posee un pobre rango dinámico además de teñir ácidos nucleicos y lipopolisacáridos lo que puede generar ruido; y la tinción fluorescente Deep Purple – esta tinción posee una gran sensibilidad pues puede detectar menos de 1 ng de proteínas, siendo específica para este tipo de macromoléculas (Miller I. y col., 2006). Cabe destacar que el protocolo utilizado para extraer las proteínas desde corazón no tenía incorporado pasos que permitieran eliminar algunos contaminantes como ácidos nucleicos o lipopolisacáridos, sólo se realizaba una centrifugación hacia el final del protocolo, por lo que es muy probable que este tipo de contaminantes generaran ruido al teñir los geles con Nitrato de plata. Los mejores resultados se obtuvieron con la tinción fluorescente, pues además de que el número de *spots* que se logró visualizar eran prácticamente el mismo que con Nitrato de plata, se eliminó gran parte del ruido que se observaba con esta última tinción (Figura 11).

En el caso de los geles bi-dimensionales de plasma se utilizaron las condiciones de corrida optimizadas para muestras de proteínas totales de ventrículo, ya que pese a que no se puede hacer una equivalencia general entre los geles bi-dimensionales de estos dos tipos de muestras, esto podría facilitar de algún modo la detección de alguna o algunas proteínas comunes para ambas muestras.

Por otra parte, en el caso de las muestras de plasma que fueron tratadas con el *Kit* de remoción de albumina e Ig, no fue posible cargar 100 µg de proteínas totales tal como se hizo tanto con las muestras no depletadas como las de ventrículo. Ello debido a que se generaban dificultades con el enfoque de las proteínas (Figura 13). Estas dificultades de enfoque pueden haberse dado por alguno de los componentes del tampón de elusión de las proteínas desde la columna. Este problema no ocurrió al cargar 30 µg de proteínas, lo que implicaba estar cargando menos de un tercio del tampón de elusión utilizado al cargar 100 µg de proteínas durante el IEF.

Implementación del modelo de infarto cardiaco quirúrgico en ratas

La investigación de enfermedades utilizando tejidos humanos puede ser compleja debido a factores tales como la escasa disponibilidad de muestras - lo que genera tamaños muestrales pequeños - el estado de la enfermedad y la heterogeneidad de los individuos, la que está dada por la variabilidad genética y la historia médica de los pacientes. Una aproximación alternativa es el uso de modelos animales para la investigación médica, los que pueden ser utilizados para entender cómo se produce, cómo evoluciona o cómo puede ser tratada una determinada enfermedad (McGregor E. y Dunn M., 2006). Actualmente existen varios modelos animales para una serie de enfermedades humanas tales como el Alzheimer, hipertrofia cardiaca, hipertensión, enfermedades y fallas cardiacas, entre otras, y muchos de ellos han sido utilizados para análisis proteómicos (Jin X. y col., 2006; Lan X. y col., 2005; Fisher S. y Marber M., 2002; Schwertz H. y col., 2002). Particularmente para el estudio del IM el animal más utilizado es la rata

(Zerkowski H. y col., 2004). Uno de los aspectos de la fisiología cardiovascular de la rata que la hacen un mejor modelo que otros animales pequeños, como el ratón o el conejo, es el poseer características macro hemodinámicas que se asemejan más a la humana, como son la presión arterial y el volumen sanguíneo, a excepción de frecuencia cardíaca que es mayor en las ratas.

En nuestro laboratorio se implementó la técnica de infarto quirúrgico permanente en ratas por medio de la oclusión de la arteria coronaria descendente anterior pues, tal como ya se mencionó, en humanos es la arteria que con mayor frecuencia se ocluye y resulta en un IM (Hansen B., 1982; Moore R., 1948).

El área miocárdica irrigada por la arteria coronaria descendente anterior es extensa, debido a que a partir de esta nacen muchas ramas. Por lo tanto, la oclusión proximal permite generar un aumento del área infartada con respecto a ese mismo procedimiento realizado en una región más distal al nacimiento de la arteria. Dado que las ratas presentan una mayor reserva de función ventricular estas logran sobrevivir a infartos de tamaño importante (Moisés V. y col., 2000; Litwin S. y col., 1994). A infartos de igual tamaño – porcentaje de perímetro infartado – las ratas mantienen una mejor función ventricular que los humanos. Esto explica que los animales infartados por medio de esta técnica sobrevivan, siendo en el caso de esta tesis la sobrevivencia superior al 80% al quinto día después de realizada la oclusión permanente de la arteria coronaria descendente.

En los individuos que han sufrido un IM se reconoce macroscópicamente la necrosis después de 24 horas de establecida la isquemia. Ésta se presenta como un territorio mal delimitado, de color pálido amarillento, a veces con focos hemorrágicos. En los días siguientes aparece claramente delimitada por sus contornos cartográficos, color amarillo

opaco y un halo hemorrágico (Chuaqui B., 2005). A la vez, es posible apreciar un adelgazamiento de la pared del ventrículo tras el infarto (Bertomeu-González V. y col., 2005). Es por esto que tanto el enblanquecimiento así como el adelgazamiento de la pared del ventrículo izquierdo fueron utilizados como indicadores de infarto en las ratas. Con el modelo de infarto quirúrgico implementado fue posible visualizar en el 83% de los animales tanto la escara de color blanquecino-amarillenta como el adelgazamiento de la pared del ventrículo izquierdo, lo que refleja la efectividad de la estrategia utilizada (Figura 15).

Identificación de las proteínas que se encuentran diferencialmente en el ventrículo izquierdo de ratas infartadas al quinto día post-IM

El desarrollo de esta tesis permitió demostrar que, en el ventrículo izquierdo de ratas, 25 proteínas presentan una abundancia distinta al quinto día post-IM entre individuos infartados y no-infartados. Para determinar la identidad de estas proteínas estas fueron enviadas a secuenciar vía espectrometría de masas. Cabe destacar que a pesar de que la tinción fluorescente Deep Purple es compatible con la espectrometría de masas, no se disponía de un transiluminador que permitiera visualizar y escindir los *spots* a simple vista. Debido a ello se utilizó Coomassie coloidal para teñir los geles de donde se escindirían las proteínas que serían secuenciadas. El Coomassie coloidal, a diferencia de la tinción con Nitrato de plata, también es compatible con la espectrometría de masas, pero para intentar solucionar el problema de su menor sensibilidad fue necesario cargar una mayor cantidad de proteínas totales. Pese a ello no fue posible visualizar las 25

proteínas que presentaron una abundancia diferencial en las muestras de ventrículo izquierdo de animales infartados, por lo que se secuenciaron sólo aquellas que eran fácilmente reconocibles. Las 9 proteínas identificadas son:

Anhidrasa carbónica II (↑ ↑)

La anhidrasa carbónica (CA) fue descubierta por primera vez en eritrocitos humanos en el año 1932. Actualmente han sido reportadas más de 15 isoenzimas de CA entre las que destaca la CA II por tener una mayor eficiencia catalítica (Chen J. y col., 2007; Vuillemin M. y Pexieder T., 1997). La CA juega un rol importante en el metabolismo del dióxido de carbono y la regulación del pH intracelular (Chen J. y col., 2007). Esta enzima cataliza la reacción reversible que involucra la hidratación del dióxido de carbono (CO_2) y la deshidratación del ácido carbónico (H_2CO_3).

La CA II es una proteína citoplasmática de 29 kDa que se encuentra presente en los glóbulos rojos y en una amplia variedad de tejidos. En adición a su función en la hidratación reversible del CO_2 que produce HCO_3^- y protones (H^+), la CA II juega un rol en la mantención del balance ácido-base, el intercambio iónico y la secreción de fluidos (Vuillemin M. y Pexieder T., 1997).

Es conocido que algunas isoformas de la CA son expresadas por las células cardiacas, aunque su actividad ha sido descrita como relativamente modesta. La isoforma II de la CA no fue identificada en el miocardio hasta el año 1997, cuando estudios llevados a cabo por el grupo de Vandervelde mostraron la presencia de la proteína en zonas específicas del ventrículo izquierdo de embriones de ratones (Vandervelde S. y col., 2006; Vuillemin M. y Pexieder T., 1997). Hasta el año 2005 la CA II nunca había sido

identificada en miocardio de algún organismo adulto. Estudios realizados ese año utilizando el análisis de *microarray* de corazones humanos adultos permitieron identificar ARNm de CA II en este tejido y recientes estudios mostraron evidencias de la expresión de CA II en cardiomiocitos de ratón aislados utilizando inmunoblotting (Alvarez B. y col., 2007).

Los resultados de esta tesis reflejan por primera vez un aumento en la abundancia de la proteína CA II en individuos infartados, aumento que podría estar relacionado con la disminución en el pH que se genera en las células cardiacas luego de ocurrido un IM (Cesan P., 2005).

Por otra parte, luego de un IM no solo se genera la remodelación de la zona infartada sino también de la zona no infartada, la que se caracteriza por una respuesta hipertrófica que funcionalmente compensa, al menos inicialmente, la pérdida de cardiomiocitos (Anversa y col., 1985). Un estudio realizado en el año 2007 indicó que la inhibición de CA II y otras isoformas de CA previenen y revierten la hipertrofia de los cardiomiocitos, lo que sugiere que la inhibición de CA podría representar una aproximación terapéutica efectiva para la mitigación del fenotipo hipertrófico de los cardiomiocitos de la zona no infartada (Alvarez B. y col., 2007).

Cadena liviana de la Ferritina (↑)

La Ferritina es una proteína que está compuesta por dos tipos de subunidades, una cadena pesada de 21 kDa (H) y una cadena liviana de 19 kDa (L). En las células de los mamíferos, la Ferritina funcional consta de 24 subunidades totales. La función principal de la Ferritina es el almacenamiento de hierro intracelular y la detoxificación. La

subunidad H cataliza el primer paso en el almacenamiento del hierro, o sea, la oxidación del ion ferroso (Fe^{2+}). La subunidad L cataliza la formación del núcleo férrico en el seno de la molécula. La proporción de las subunidades H y L varía entre las especies y los tipos de tejido. La Ferritina del hígado y del bazo, órganos conocidos como almacenadores de hierro, está compuesta predominantemente por la subunidad L, mientras que en órganos con bajo contenido de hierro, tales como el corazón y el páncreas, está compuesta principalmente por la subunidad H (Grange E. y col., 2006; You S. y col., 2003; Cairo G. y col., 1991).

Existen reportes de que ocurre regulación de los niveles de las subunidades H y L a nivel transcripcional, post-transcripcional y traduccional. Varios estudios han concluido que la Ferritina protege las células del estrés oxidativo por medio de la mantención de la homeostasis del hierro. Estos estudios demuestran que un incremento en los niveles de Ferritina reducen el pool de hierro lábil y limitan el Fe^{2+} disponible para participar en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (You S. y col., 2003; Cairo G. y col., 1991).

En un estudio realizado por el grupo de You en el año 2003, pacientes con arterosclerosis coronaria, patología que es reconocida como una enfermedad inflamatoria, presentaron un aumento en los niveles de Ferritina por lo que se planteó que la proteína podría estar siendo sobrerregulada por citoquinas proinflamatorias, tales como el factor necrótico tumoral α (TNF- α) e IL-1 α . Más aún, se postuló que un incremento en la expresión de la cadena liviana de la Ferritina podría ser un marcador de inflamación, pero quedó abierta la pregunta sobre si el incremento en la expresión de esta proteína es una causa o una consecuencia de la arterosclerosis coronaria.

En la presente tesis fue posible observar un aumento en la abundancia de la cadena liviana de la Ferritina. El IM está asociado con una respuesta inflamatoria que probablemente este gatillando un aumento en los niveles de la cadena liviana de la Ferritina como estrategia para proteger al órgano del fuerte estrés oxidativo que se genera. Así, los resultados obtenidos en esta tesis y los resultados del grupo de You permiten sugerir que tal vez el aumento en la expresión de la proteína podría ser una consecuencia del proceso inflamatorio que acompaña a la arterosclerosis coronaria.

Por otra parte, es importante destacar que nuestros datos nos indican que durante el IM se genera una regulación de los niveles de las subunidades H y L, que favorecen la formación de la unidad liviana. Como ya fue mencionado anteriormente, el corazón en condiciones estables es un órgano con bajo contenido de hierro, en el cual la ferritina está compuesta principalmente por la subunidad H, a diferencia de lo que ocurre en órganos almacenadores de hierro.

Cadena pesada de la miosina, polipéptido 6 (fragmento) (↑)

La miosina es una proteína hexamérica compuesta por un par de cadenas pesadas de miosina y dos pares de cadenas livianas (no idénticas). Esta es una de las moléculas con un importante significado funcional para la mejora en la respuesta cardíaca pues representa el motor molecular del músculo.

Existen dos tipos de cadenas pesadas en el corazón de los mamíferos, la cadena pesada α y la β . La cadena pesada α de la miosina tiene una mayor actividad ATPasa que la cadena pesada β , y en corazones roedores, la velocidad contráctil se correlaciona con la cantidad relativa de cada miosina. Corazones que expresan más la cadena pesada α

poseen una velocidad contráctil más rápida que aquellos que expresan mayormente la cadena pesada β . La cadena pesada de la miosina, polipéptido 6, es una cadena pesada del tipo α (Miyata S. y col, 2000).

Se ha reportado que en los ventrículos cardiacos de mamíferos pequeños, la cadena pesada α representa más del 90% del total, mientras que en humanos la cadena pesada β predomina, ya que corresponde al 95% del total (Miyata S. y col, 2000; Nakao K. y col., 1997).

Cuando se produce un IM se gatilla la fragmentación de las cadenas livianas y pesadas de la miosina. No es posible detectar en el plasma los fragmentos de la cadena pesada de la miosina antes de 2 días de ocurrido el IM y los niveles superiores se detectan 5 a 6 días más tarde (Hornykewycz S. y col., 1994).

Los resultados de esta tesis indican un aumento en la abundancia de un fragmento de la cadena pesada de la miosina 6, lo que podría ser el resultado de la proteólisis que podría estar ocurriendo durante la necrosis celular.

Disulfuro isomerasa 3 (↑)

Las proteínas disulfuro isomerasas (PDIs) constituyen una familia de enzimas estructuralmente relacionadas que catalizan la formación de enlaces disulfuro, y la reducción o isomerización de proteínas recién sintetizadas en el lumen del retículo endoplasmático (RE). Estas proteínas también actúan como chaperonas y son, por lo tanto, parte de un sistema de control de calidad para el correcto plegamiento de proteínas en el mismo compartimiento subcelular (Turano C. y col., 2002).

El estrés genera la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE, episodio que gatilla la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). Esta respuesta reduce la cantidad de proteínas mal plegadas mediante la inducción de chaperonas, que promueven el correcto plegamiento de las proteínas; la reducción general de la síntesis de proteínas y la regulación de la degradación de proteínas mal plegadas vía el sistema ubiquitina-proteosoma. La acumulación persistente de proteínas mal plegadas causa disfunción y muerte celular involucrada en varias enfermedades humanas (Azfer A. y col., 2006).

En la literatura se ha reportado que frente a un episodio de hipoxia cerebral se genera un aumento en los niveles del ARNm y la proteína PDI y se sugiere que esta proteína podría jugar un rol en la resistencia al daño generado por la isquemia (Tanaka S. y col., 2000). De la misma forma, en ratones MCP (proteína del cofactor de membrana) - expresan MCP-1 específicamente en el corazón - que manifiestan una serie de características de una cardiomiopatía isquémica en humanos, se ha observado que existe un aumento en la expresión de las PDI (Azfer A. y col., 2006).

Resultados recientemente publicados por el grupo de Severino, muestran que dentro del primer día después del infarto en humanos se genera un aumento en la expresión del gen que codifica para la PDI en regiones viables del miocardio que son periféricas al infarto. Las consecuencias funcionales de esta sobre-expresión, demostradas tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos de isquemia-hipoxia cardiaca, fueron un significativo decrecimiento de la razón de apoptosis de los cardiomiocitos y, consecuentemente, una remodelación ventricular más favorable. A ojos de este grupo de investigadores estos resultados sugieren fuertemente que la PDI juega un rol clave en la protección del miocardio después de un infarto (Severino A. y col., 2007).

Los resultados de esta tesis indican que se genera un aumento en la abundancia de PDI 3 en la condición infartada, lo que viene a corroborar los resultados obtenidos por otros grupos de investigación.

DJ-1 (↓)

DJ-1, también llamada CAP-1 ó SP22, es una proteína ubicuamente expresada, que inicialmente fue identificada como un oncogen. Dentro de sus funciones se ha propuesto que esta participa en la defensa celular contra el estrés oxidativo, lo que se ve reflejado en el cambio en su pI desde 6,2 a 5,8, cuando se tratan células con H₂O₂. Más recientemente se ha sugerido que esta proteína podría funcionar como una chaperona sensible al estado de oxido-reducción (Zhang L. y col., 2005; Olzmann J. y col., 2003).

Un estudio proteómico realizado por el grupo de Fert-Bober (2008), realizado en corazones de ratas infartadas, mostró un aumento en la abundancia de la proteína DJ-1, a diferencia de lo detectado en este trabajo (Fert-Bober J. y col., 2008). Una posibilidad que podría explicar esta diferencia en los resultados es que nuestro grupo haya detectado la disminución de la isoforma con pI 6,2, pero debido a la proximidad de pI de ambas isoformas no fue posible discriminar si esto era así.

Guanina desaminasa (↑)

La depleción de nucleótidos purícos es característica de la isquemia al miocardio. Se ha observado que los nucleótidos de guanina decrecen en paralelo con nucleótidos de adenina, lo que trae graves consecuencias al metabolismo celular. El pool de nucleótidos es degradado a hipoxantina y xantina, y la restauración de los niveles de nucleótidos en

el corazón post-isquémico requiere de varios días (Raghuvanshi R. y col., 2007; Geisbuhler T. y col., 1991; Geisbuhler T. y col., 1987).

La guanina deaminasa (GDA) cataliza la deaminación hidrolítica de la guanina para producir xantina y amonio. La xantina a su vez es un producto que puede ser oxidado a urato por la enzima xantina oxidasa (XO) generándose como productos adicionales el radical anión superóxido (O_2^-) y/o peróxido de hidrógeno (H_2O_2), especies altamente tóxicas para el organismo (Broche F. y col., 1996; Tarantola M. y col., 1991).

Los resultados de esta tesis muestran un aumento en la abundancia de la GDA al quinto día post-IM. Esta enzima probablemente está contribuyendo a la depleción de nucleótidos guanina por medio de su transformación en xantina y amonio.

NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 alfa subcomplejo 10 (↓)

NADH:ubiquinona oxidoreductasa o Complejo I es el mayor de los cinco complejos de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria, con un peso molecular aproximado de 980 kDa. El complejo I es una enzima multimérica unida a la membrana que está compuesto por 46 subunidades. Una de las subunidades de este complejo es una proteína de 42 kDa llamada deshidrogenasa (ubiquinona) 1 alfa subcomplejo 10 (Ndufa 10) (Schilling B. y col., 2005). Ndufa 10 es un componente de la fracción hidrofóbica del complejo y tiene actividad NADH deshidrogenasa y oxidoreductasa. Esta proteína transfiere electrones desde NADH hacia la cadena de transporte de electrones.

Durante el proceso inflamatorio que se gatilla producto del IM, se generan ROS que pueden dañar varios componentes celulares tales como proteínas, lípidos y ADN. Por lo tanto, la mitocondria – lugar en que mayoritariamente se generan las ROS – también

puede resultar dañada. Este daño se ve reflejado en el daño en su ADN (ADNmt) así como en una declinación en los niveles de transcripción del ARN mitocondrial, síntesis proteica y función mitocondrial. El ADNmt es más susceptible al ataque oxidativo que el ADN nuclear, posiblemente por su proximidad a la cadena respiratoria en la membrana interna de la mitocondria, la falta de proteínas tipo histona que lo protejan y pobre actividad reparatoria contra el daño. Ya se ha reportado que la transcripción de algunos genes del ADNmt decrece en ratones entre un 30% a un 50% durante un IM en comparación a la condición sham, incluyendo subunidades del complejo I, complejo III, complejo IV y ARN ribosomal (Ide T. y col., 2007).

Recientemente ha sido publicada una revisión en donde se ha descrito como la mitocondria es blanco de daño durante procesos de isquemia cardiaca, incluyendo las cadenas transportadoras de electrones. Pasados 10 a 20 minutos de isquemia decrece la actividad del complejo I dado un decrecimiento en los componentes NADH deshidrogenasa, probablemente debido a la pérdida de los flavín-nucleótidos, coenzimas de las llamadas flavoproteínas. Los daños a los componentes NADH deshidrogenasa del complejo I pueden aumentar la fuga de electrones y la producción de ROS (Chen Q. y col., 2007).

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la abundancia de Ndufa10 se encuentra disminuida en la condición infartada lo que puede ser resultado del daño oxidativo que se puede generar en el ADNmt luego de un IM.

Peroxirredoxina-3 (↓)

La peroxirredoxina-3 (Prx-3) es una proteína mitocondrial antioxidante y miembro de la familia Prx que puede capturar H_2O_2 en cooperación con el tiol y peroxinitrito. En los mamíferos, se han identificado 6 diferentes miembros de la familia Prx (Prx-1 hasta 6). Entre las Prx, Prx-3 es única pues está localizada específicamente en la mitocondria (Matsushima S. y col., 2006).

La mitocondria juega un rol central en la apoptosis producto de la liberación de citocromo c y otras proteínas pro-apoptóticas. La liberación de citocromo c en el citosol resulta en la activación de caspasas que gatillan la formación del apoptosoma. La producción mitocondrial de ROS también se cree que está asociada con la activación de apoptosis. Algunos estudios indican que la generación de ROS por la mitocondria parece ser un evento temprano en la señalización apoptótica iniciada por $TNF-\alpha$, ceramidas o glutamato, mientras que otros sugieren que la producción de ROS ocurre relativamente tarde en las células que ya están comprometidas a morir. Actualmente, se sabe que la depleción de Prx-3 resulta en un incremento en los niveles de H_2O_2 lo que induce la apoptosis celular (Chang T. y col. 2004). Por otra parte, se sabe que su sobre-expresión en el miocardio de ratones modificados genéticamente con el gen que codifica para Prx 3, inhibe el remodelamiento y las fallas cardíacas después de un infarto al miocardio (Matsushima S. y col., 2006).

Los resultados de un estudio realizado por el grupo de Brixius en el 2007, sugieren una regulación diferencial de los mecanismos de defensa antioxidativa en el corazón humano. Más específicamente, ellos describen que las isoformas de Prx 1 y 2 no se ven afectadas por la producción de ROS, a diferencia de lo que ocurre con las Prx 3, 4, 5 y 6

que si se ven afectadas, pues disminuye su expresión (Brixius K. y col., 2007). En el año 2006, el grupo de Matsushima no detectó diferencias significativas en la expresión de Prx 3 en corazones de ratones infartados versus los ratones controles. Esto puede deberse a que la medición se realizó escindiendo los corazones 28 días después de realizado el infarto, tiempo en el que pueden haberse normalizado los niveles de expresión de Prx 3 pues ya podría haber terminado o disminuido la generación de ROS (Matsushima S. y col., 2006).

Los resultados de esta tesis indican que los niveles de esta proteína se encuentran disminuidos en los animales infartados, resultados que se correlacionan con los obtenidos por el grupo de Brixius en el 2007. La disminución en los niveles de esta proteína podría estar correlacionada con la muerte por apoptosis de las células cardíacas producto del IM.

Identificación de las proteínas que se encuentran diferencialmente en el plasma de ratas infartadas al quinto día post-IM, en las que se detectó la movilización de MSC

Del total de *spots* analizados, 40 cambiaron significativamente entre individuos al quinto día post-infarto e individuos no-infartados, pero solo 9 fueron enviadas a secuenciar. A continuación se describe en detalle la función de las proteínas secuenciadas:

Apolipoproteína A-IV (↑)

La apolipoproteína A-IV (Apo A-IV) es una glicoproteína de 46 kDa producida casi exclusivamente en el intestino delgado de los humanos. Pese a que aún no se logra establecer una función única para esta proteína se ha postulado que ella podría tener un rol importante en el metabolismo de lípidos. La Apo A-IV es producida por los enterocitos intestinales como parte de los quilomicrones, lipoproteínas que transportan triglicéridos y colesterol, presentes en la sangre, hacia los tejidos. En los humanos gran parte de la Apo A-IV que se encuentra en circulación está unida a HDL, lipoproteína de alta densidad que transporta colesterol (Tubb y col., 2007; Hanniman y col., 2006). En roedores, la Apo A-IV está presente en el plasma en partículas de HDL, con un 59% de la proteína siendo sintetizada en el intestino y el resto en el hígado. Se ha visto que esta proteína se encuentra regulada por factores metabólicos así como por estrés y que, además de los clásicos roles relacionados al metabolismo de lípidos, esta proteína posee propiedades anti-aterogénicas, la cual podría estar relacionada con su habilidad de actuar como antioxidante (Wong y col., 2007; Hanniman y col., 2006).

En este estudio detectamos un aumento en la acumulación de esta proteína, la que podría estar ejerciendo una función protectora luego de ocurrido el IM.

Hemopexina (↑↓)

La Hemopexina (HPX) es una β -Glicoproteína plasmática de 60 kDa, la cual consiste de un único polipéptido de 439 residuos aminoácídicos y un 20% de carbohidratos. La regulación de la síntesis de la HPX es compleja, ya que ocurre tanto a nivel

transcripcional como post-transcripcional. Por otro lado, la HPX ha sido definida como una proteína de respuesta de fase aguda tipo II ya que su síntesis hepática es incrementada, aunque de forma discreta, en respuesta a IL-6 pero no a interleuquina-1 (IL-1). De hecho, se han identificado elementos de respuesta a esa citoquina en los genes de HPX tanto de rata como de humanos (Delanghe J. y Langlois M., 2001; Bernard N. y col., 1980).

La proteína HPX es capaz de secuestrar con gran afinidad los grupos hemo libres desde el torrente sanguíneo y luego transportarlos hacia el hígado para su degradación. De hecho, ha sido descrito que esta es la proteína con mayor afinidad por grupos hemo en circulación entre todas las proteínas que unen el grupo hemo (Wu L. y Wang R., 2005).

Es conocido que tanto el daño físico como las infecciones son acompañadas de hemólisis lo que conlleva a la liberación de grupos hemo, los cuales son altamente tóxicos dada su capacidad de catalizar la formación de especies reactivas y como importante fuente de hierro para el crecimiento de bacterias (Duan X. y col., 2005). Otro de los blancos posibles de los grupos hemo es el LDL, cuyos lípidos pueden ser oxidados cuando los sistemas de captación de grupos hemo de la sangre, tales como la haptoglobulina, la albúmina y la HPX son sobrepasados. Se ha observado que cerca del 10% del LDL presente en el plasma corresponde a partículas de LDL medianamente oxidadas y que una proporción de ellas está vinculada al estrés oxidativo inducido durante procesos inflamatorios (Alayash A. y col., 2001). De hecho, los grupos hemo son considerados uno de los causantes de la falla cardíaca después de la isquemia y reperfusión, y la HPX ha sido descrita como la primera línea de defensa contra el daño

oxidativo mediado por los grupos hemo luego de la isquemia y la reperusión (Eskew J. y col., 1999).

En esta tesis se detectó un aumento de una de las isoformas de HPX y la disminución de otra. Esto podría explicarse por la existencia de mecanismos de regulación ya sea a nivel transcripcional y/o post-traduccional post-IM. Al igual que Apo A-IV, HPX podría estar ejerciendo un efecto moderador del daño oxidativo luego del infarto al corazón.

Proteína de Unión a Vitamina D (↓)

La Proteína de Unión a Vitamina D, también conocida como Gc-globulina, es una proteína plasmática multifuncional formada por un único polipéptido de un peso molecular relativo de 51-58 kDa y pertenece a la superfamilia de la albumina. Esta proteína tiene la capacidad de unirse a diversos ligandos como son los esteroides de vitamina D, ácidos grasos insaturados, G-actina y péptidos activadores del complemento C5a.

Una de las funciones de la Gc-globulina es atrapar G-actina liberada desde sitios de daño y/o durante la necrosis celular lo que previene la polimerización de filamentos de actina en la circulación. La actina es una proteína altamente conservada, que forma parte del citoesqueleto celular. Esta proteína está involucrada en la movilidad celular y en la mantención de la forma de la célula. Esta proteína intracelular es liberada a la circulación sistémica después de la ruptura de la membrana celular, como resultado de la necrosis. En el plasma la actina puede formar largos filamentos junto con el factor de coagulación Va, condición que puede gatillar coagulación intravascular.

La vida media de la Gc-globulina es de aproximadamente 1 día, en cambio la vida media del complejo G-actina-Gc-globulina es de aproximadamente 30 min., lo que genera una disminución en la concentración de la Gc-globulina.

Otra respuesta en la que está involucrada esta proteína es la liberación, por la activación de células T y B, de enzimas que procesan las cadenas laterales de O-carbohidratos que posee ella misma, transformándose en otra molécula, conocida como Gc-MAF. Esta molécula estimula a la actividad de los macrófagos en el tejido dañado. La respuesta inmune es controlada por Gc-MAF, induciendo apoptosis en los macrófagos activados.

La tercera respuesta de la Gc-globulina en el tejido dañado es la unión de neutrófilos circulantes que estimulan la localización quimiotáctica a determinados sitios del tejido (Meier U. y col., 2006; Kew R. y col., 1993).

Los resultados de esta tesis reflejan un aumento en la abundancia del prepéptido y precursor de la proteína Gc-globulina, lo que se correlaciona con lo anteriormente expuesto ya que el IM está asociado a un proceso inflamatorio y se genera la muerte de cardiomiocitos por necrosis, con la consiguiente liberación de actina y posible formación de filamentos en el suero.

Transtiretina (↑)

La transtiretina (TTR) es una proteína tetramérica con subunidades de 127 residuos aminoacídicos asociadas de forma no-covalente y que se encuentra frecuentemente en el plasma y en el líquido cerebro espinal, siendo sintetizada preferentemente en el hígado. Funcionalmente, la TTR transporta hormonas tiroideas cuando se encuentra por sí sola, mientras que al formar complejos con otras proteínas esta participa en el transporte de

varios compuestos biológicamente activos (Kiernan U. y col., 2006; Lim A. y col., 2003). De manera similar a lo evaluado en este estudio, se ha observado que en humanos esta proteína aumenta sus niveles en individuos que han sufrido un IM, siendo catalogada como un candidato a biomarcador para este fenómeno. Por otro lado, se ha postulado que la TTR podría sufrir modificaciones inducidas por el estrés oxidativo, las cuales podrían alterar de forma específica su actividad biológica (Kiernan y col., 2006). Los resultados de esta tesis muestran un aumento en la abundancia de TTR post-IM, lo que refuerza la hipótesis planteada por el grupo de Ciernan, sobre que esta proteína podría ser un buen biomarcador para este fenómeno.

Precusores de la cadena beta y gama del fibrinógeno (↑↓)

El fibrinógeno es un precursor de la fibrina, el principal constituyente del trombo. Al mismo tiempo esta proteína se une a las glicoproteínas IIb/IIIa de las plaquetas, funcionando como un puente molecular que permite la agregación de las plaquetas. Esta glicoproteína de 340 kDa sintetizada predominantemente en los hepatocitos circula por el plasma como un dímero, estando compuesta por tres pares de cadenas de polipéptidos denominadas $2A\alpha$, $2B\beta$ y 2γ - $(A\alpha, B\beta, \gamma)_2$ - las que están unidas mediante enlaces disulfuro. La síntesis de la cadena $B\beta$ es la etapa limitante en los niveles circulantes de fibrinógeno maduro (Mannila M. y col., 2007; Herington D. y Klein K., 2001).

Desde hace varios años en un gran número de estudios se han reportado un aumento en los niveles de fibrinógeno luego de ocurrido el IM, aumento que persiste por varios días después de ocurrido el evento y que se hace más evidente en aquellos pacientes que no

fueron reperfundidos (Oren H. y col., 2007; Wasilewski J. y col., 2006; Cristal N. y col., 1983).

Los resultados de esta tesis mostraron un aumento en la abundancia de la cadena gamma del fibrinógeno pero contradictoriamente con lo anteriormente expuesto, mostraron una disminución los niveles de abundancia de la cadena beta. Una posible explicación para esta observación es que exista un aumento en los niveles de acumulaciones de otros precursores de la cadena beta, no estudiados por nosotros.

Visión general

Como ya ha sido mencionado, el IM está asociado con una reacción inflamatoria tanto local como sistémica - esta última compuesta por una respuesta humoral y mediada por células - que es pre-requisito para la remodelación del miocardio. Las ROS generadas en este proceso tienen el potencial de dañar directamente las células que componen el corazón y pueden estar involucradas en gatillar la cascada inflamatoria a través de la inducción de citoquinas (Ren G. y col., 2003). Las citoquinas son polipéptidos producidos por el miocardio isquémico, hígado, macrófagos activados y linfocitos, así como también, el tejido adiposo. Importantes citoquinas como el factor $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 e IL-6 son las promotoras iniciales del proceso de "sanación" humoral post-IM. Citoquinas como la IL-1 β y la IL-6 estimulan la producción de marcadores inflamatorios originados en el hígado, como son la proteína C-reactiva (CRP) y el fibrinógeno (Bonvini R. y col., 2005).

Como es posible apreciar, las proteínas de corazón identificadas en la presente tesis están relacionadas, en un número importante, con la respuesta al estrés oxidativo que se

genera en el órgano luego de un infarto. Por otra parte, un número importante de las proteínas de plasma que fueron identificadas, están relacionadas con la respuesta inflamatoria del organismo al estrés generado producto de un IM. Más aún, todas las proteínas de plasma que fueron identificadas, Apolipoproteína A-IV, Hemopexina, fibrinógeno, transtiretina y la proteína de Unión a Vitamina D, pertenecen a un grupo de proteínas llamadas proteínas de fase aguda. Las proteínas de fase aguda son una clase de proteínas cuya concentración plasmática decrece o se incrementa en respuesta a un estímulo inflamatorio importante, el cual gatilla una reacción sistémica destinada a restablecer la homeostasis del organismo (Garcia-Moll X. y Kaski J., 2000).

Uno de los procesos que se ha postulado ocurrir seguido del IM es la movilización de células troncales de la medula ósea, las que podrían cumplir un rol regenerador gracias a su capacidad de diferenciarse en diferentes tipos celulares. En nuestro laboratorio hemos detectado la presencia de MSC en el torrente sanguíneo de ratas al quinto día post-IM (Luz P., 2007). Los mecanismos involucrados en el proceso de migración, movilización y *homing* de las células troncales en el corazón aún son desconocidos, sin embargo, se ha postulado que algunos mediadores inflamatorios y quimioquinas podrían cumplir un rol importante en estos procesos (Ren G. y col., 2003).

Si bien con esta primera aproximación no es posible afirmar que alguna de estas proteínas identificadas esté relacionada directamente con el fenómeno de movilización de MSC, debido a que los geles bi-dimensionales no permiten determinar funcionalidad de las proteínas detectadas, es importante recalcar que ya se ha postulado que los factores que gobiernan el proceso inflamatorio generado por un IM también podrían

dictar el comportamiento de las células troncales, ya sea hematopoyéticas o mesenquimáticas, en el proceso de regeneración cardiaca (Vandervelde S. y col., 2005).

Por otra parte, existen evidencias de que la administración vía intravenosa de la proteína G-CSF post-IM induce la movilización de células troncales tanto hematopoyéticas como mesenquimáticas (Leone A. y col., 2005; Fukuda K. y Fujita J., 2005; Kawada H. y col., 2004). Interesantemente, se ha observado que la movilización de células troncales hematopoyéticas tiene un desfase de 3 a 4 días después de comenzado el tratamiento con G-CSF. Este desfase sugiere que una cascada de eventos biológicos secuenciales es necesaria para que ocurra la movilización (Carstanjen D. y col., 2001).

En el año 2001, el grupo de Carstanjen determinó un aumento en los niveles de IL-6 a los días 4 y 5 de tratamiento de individuos sanos con la G-CSF y un aumento en la concentración plasmática de proteínas como CRP y la proteína de unión a lipopolisacáridos, lo que les indicó la existencia de una respuesta de fase aguda. Aún más, la concentración de CRP correlacionó significativamente con el porcentaje de movilización de células troncales hematopoyéticas (Carstanjen D. y col., 2001).

En base a estos antecedentes postulamos que alguna(s) de las proteínas de fase aguda que aumentan su abundancia podría(n) estar involucrada(s) en el proceso de movilización de MSC. Para corroborarlo, será importante en un futuro determinar cuando se produce la movilización de MSC en pacientes que han sufrido un IM, pues la temporalidad podría ser diferente a las de las ratas, y cual es el comportamiento de las proteínas de fase aguda, pues su comportamiento puede variar entre animales (Gruys E. y col., 2005). Aquellas proteínas de fase aguda que aumenten su abundancia en pacientes post-IM, al igual que en el caso de las ratas infartadas, serán estudiadas

mediante estudios que permitan determinar su funcionalidad en el proceso de movilización de MSC.

Cabe destacar que en base a lo aquí propuesto, es posible plantear que el o los factores proteicos involucrados en la movilización de MSC podrían no ser sintetizados por el corazón infartado, sino que por otro órgano que participe de la respuesta sistémica que se genera producto del infarto. Este es el caso de las proteínas de fase aguda, proteínas que son sintetizadas en el hígado en respuesta al estímulo inflamatorio.

Por otra parte, es importante destacar que con esta tesis fue posible obtener un resultado anexo a nuestros propósitos, el que tiene que ver con la potencial obtención de nuevos marcadores moleculares que puede reflejar el grado de la respuesta inflamatoria subyacente luego de un IM y proporcionar una medida útil de lesión del miocardio. Esto es importante pues no solo permite comprender algunos de los mecanismos que regulan la reacción del organismo frente al daño producido por IM sino que también es posible utilizar estas proteínas como marcadores que permitan determinar el estado en que se encuentra un paciente antes de ser dado de alta, lo que puede ocurrir a partir del quinto día después de ocurrido el infarto, cuando se les da de alta a los pacientes de manera precoz (Gutiérrez J. y col., 1998).

CONCLUSIONES

1. Al quinto día post-IM existe un grupo minoritario de proteínas en el corazón (4%) y plasma (11%) de rata que cambian su abundancia.
2. Las proteínas identificadas en el ventrículo izquierdo de ratas al quinto día post-IM estarían involucradas en los procesos de necrosis o apoptosis celular que ocurren como resultado de la isquemia.
3. Las proteínas identificadas en el plasma de ratas al quinto día post-IM estarían siendo producidas por el hígado y pertenecerían al grupo denominado proteínas de fase aguda.

PROYECCIONES

Proponemos como candidatos a factor de movilización a las proteínas de fase aguda que aumentan su abundancia en el plasma de ratas infartadas en las que es posible detectar la presencia de MSC en el torrente sanguíneo.

La funcionalidad de las proteínas propuestas a candidato de factor de movilización - cadena gamma del fibrinógeno, transtiretina, Apolipoproteína A-IV y la hemopexina - será evaluada en una primera etapa mediante ensayos de movilización en transwells, técnica que ya ha sido implementada por nosotros en paralelo al desarrollo de esta tesis. En caso de que alguna de las proteínas efectivamente genere la movilización de estas células in vitro, su funcionalidad será estudiada in vivo.

De identificar él o los factores de movilización de MSC durante IM, estos podrían utilizarse en una estrategia terapéutica para el IM, que consistiría en administrarlos inmediatamente después de producido el IMC, promoviendo así una cardiomioplastia in vivo que contribuiría en la regeneración anatómica y funcional del corazón infartado.

Por otra parte, las proteínas identificadas en esta tesis podrían utilizarse potencialmente como marcadores moleculares tardíos, que permitan determinar el estado en el que se encuentran los pacientes que han sufrido IM antes de ser dados de alta.

BIBLIOGRAFÍA

- Alayash A., Patel R., Cashion R. 2001. **Redox Reactions of Hemoglobin and Myoglobin: Biological and Toxicological Implications.** *Antioxid Redox Signal.* Vol. 3(2): 313-327.
- Allers C. Sierralta W., Neubauer S., Rivera F., Minguell J. y Conget P. 2004. **Dynamic of Distribution of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells After Transplantation into Adult Unconditioned Mice.** *Transplantation* Vol. 78: 503-508.
- Alvarez B., Johnson D., Sowah D., Soliman D., Light P., Xia Y., Karmazyn M., y Casey J. 2007. **Carbonic anhydrase inhibition prevents and reverts cardiomyocyte hypertrophy.** *J Physiol* Vol. 579(1): 127-145.
- Anversa P., Loud A., Levicky V. y Guideri G. 1985. **Left ventricular failure induced by myocardial infarction. I. Myocyte hypertrophy.** *Am J Physiol.* Vol. 248(6 Pt 2):H876-H882.
- Askari A. Unzek S., Popovic Z., Goldman C., Forudi F., Kiedrowski M., Rovner A., Ellis S., Thomas J., DiCorleto P., Topol E., Penn M. 2003. **Effect of stromal – cell - derived factor 1 on stem – cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy.** *The Lancet* Vol. 362: 697-703.
- Azfer A., Niu J., Rogers L., Adamski F. y Kolattukudy P. 2006. **Activation of endoplasmic reticulum stress response during the development of ischemic heart disease.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Vol. 291(3):H1411-1420.
- Behfar A. y Terzic A. 2007. **Cardioprotective repair through stem cell-based cardiopoiesis.** *J Appl Physiol.* *J Appl Physiol* Vol. 103: 1438-1440.
- Berardi AC., Wang A., Levine JD., Lopez P. y Scadden DT. 1995. **Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells.** *Science* Vol. 267(5194): 104-108.
- Bernard N., Lombart C. y Waks M. 1980. **Modification of rat hemopexin properties upon heme binding.** *Eur J Biochem.* Vol. 103(2):271-276.
- Berry M., Engler A., Woo Y., Pirolli T., Bish L., Jayasankar V., Morine K., Gardner T., Discher D., y Sweeney H. 2006. **Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Vol. 290(6): H2196-2203.

Bertomeu-González V., Bodí V., Sanchis J., López-Lereu M., Núñez J., García D. y Gómez C. 2005. **Hipertrofia compensadora post-infarto. Análisis de las zonas infartada y no infartada mediante resonancia magnética.** *Latido* Vol. 10(9): 374-378.

Bigalli D., Bico A. y Gossio E. 2005. **Cardiomioplastia celular para reparar tejido cardíaco: ¿un nuevo concepto terapéutico?** *Rev. Urug: Cardiol.* Vol. 20: 158-170.

Bonab M., Alimoghaddam K., Talebian F., Ghaffari SH., Ghavamzadeh A. y Nikbin B. 2006. **Aging of mesenchymal stem cell in vitro.** *BMC Cell Biol.* Vol. 10: 7-14.

Bonvini R., Hendiri T. y Camenzind E. 2005. **Inflammatory response post-myocardial infarction and reperfusion: a new therapeutic target?.** *European Heart Journal Supplements* Vol. 7 (Supplemento I), I27-I36.

Bradford M. 1976. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - Dye Binding.** *Anal. Biochem.* Vol. 72: 248-254.

Brixius K., Schwinger R., Hoyer F., Napp A., Renner R., Bölck B., Kümin A., Fischer U., Mehlhorn U., Werner S. y Bloch W. 2007. **Isoform-specific downregulation of peroxiredoxin in human failing myocardium.** *Life Sciences* Vol. 81: 823-831.

Broche F., García J., Peña M. y Delgado A. 1996. **El estrés oxidativo en la conservación de órganos.** *Rev Cubana Invest Bioméd* Vol. 15(1): 0-0.

Cairo G., Rappocciolo E., Tacchini L. y Schiaffonati L. 1991. **Expression of the genes for the ferritin H and L subunits in rat liver and heart. Evidence for tissue-specific regulations at pre- and post-translational levels.** *Biochem J.* Vol. 275(3):813-816.

Campostrini N., Areces L., Rappsilber J., Pietrogrande M., Dondi F., Pastorino F., Ponzoni M., Righetti P. 2005. **Spot overlapping in two-dimensional maps: a serious problem ignored for much too long.** *Proteomics.* Vol. 5(9):2385-2395.

Cañas B., Piñeiro C., Calvo E., López-Ferrer D., Gallardo JM. 2007. **Trends in sample preparation for classical and second generation proteomics.** *Journal of Chromatography A* Vol. 1153: 235-258.

Caplan I y Dennis J. 2006. **Mesenchymal stem cells as trophic mediators.** *J Cell Biochem.* Vol. 98(5): 1076-1084.

Carstanjen D., Regenfus M., Müller C. y Salama A. 2001. **Interleukin-6 is a major effector molecule of short-term G-CSF treatment inducing bone metabolism and an acute-phase response.** *Experimental Hematology* Vol. 29: 812-821.

Cesani P. 2005. **Infarto Agudo al Miocardio**. Apunte N° 51 del Programa de Clases de Enfermería-Universidad Católica de Chile.

Chang T., Cho C., Park S., Yu S., Kang S. y Rhee S. 2004. **Peroxiredoxin III, a mitochondrion-specific peroxidase, regulates apoptotic signaling by mitochondria**. J Biol Chem. Vol. 279(40): 41975-41984.

Chen J., Lecuona E., Briva A., Welch L. y Sznajder I. 2008. **Carbonic Anhydrase II and Alveolar Fluid Reabsorption During Hypercapnia**. Am J Respir Cell Mol Biol. Vol. 38: 32-37.

Chen Q., Camara A., Stowe D., Hoppel C. y Lesnefsky E. 2007. **Modulation of electron transport protects cardiac mitochondria and decreases myocardial injury during ischemia and reperfusion**. Am J Physiol Cell Physiol Vol. 292: C137-C147.

Chuaqui B. 2005. **Anatomía Patológica del Aparato Cardiovascular**. Publicaciones Escuela de Medicina - Universidad Católica de Chile.

Cloe L. y Lee K. 2003. **Quantitative and qualitative measure of intralaboratory two dimensional protein gel reproducibility and the effects of sample preparation, sample load, and image analysis**. Electrophoresis Vol. 24: 3500- 3507.

Cristal N., Slonim A., Bar-Ilan I. y Hart A. 1983. **Plasma fibrinogen levels and the clinical course of acute myocardial infarction**. Angiology. Vol. 34(11): 693-698.

De Celle T., Vanrobaeys F., Lijnen P., Blankesteyn W., Heeneman S., Van Beeumen J., Devreese B., Smits J. y Janssen B. 2005. **Alterations in mouse cardiac proteome after in vivo myocardial infarction: permanent ischaemia versus ischaemia-reperfusion**. Exp Physiol. Vol. 90(4): 593-606.

Deb A., Wang S., Skelding K., Miller D., Simper D. y Caplice N. 2003. **Bone – marrow – derived cardiomyocytes are present in adult human heart: a study of gender – mismatched bone marrow transplantation patients**. Circulation Vol. 107: 1247-1249.

Delanghe J. y Langlois M. 2001. **Hemopexin: a review of biological aspects and the role in laboratory medicine**. Clin Chim Acta. Vol. 312(1-2): 13-23.

Delgado R., Massin E. y Cooper J. 1998. **Acute heart failure**. Tex Heart Inst J. Vol. 25(4): 255-259.

Dos Remedios C., Liew C., Allen P., Winslow R., Van Eyk J. y Dunn M. 2003. **Genomics, proteomics and bioinformatics of human heart failure**. J Muscle Res Cell Motil. Vol. 24: 251-260.

Duan X., Yarmush D., Berthiaume F., Jayaraman A. y Yarmush M. 2005. **Immunodepletion of albumin for two-dimensional gel detection of new mouse acute-phase protein and other plasma proteins.** *Proteomics*. Vol. 5(15): 3991-4000.

Eskew J., Vanacore R., Sung L., Morales P. y Smith A. 1999. **Cellular Protection Mechanisms against Extracellular Heme.** *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 274(2): 638-648.

Fert-Bober J., Basran R., Sawicka J. y Sawicki G. 2008. **Effect of duration of ischemia on myocardial proteome in ischemia/reperfusion injury.** *Proteomics* Vol. 8(12): 2543-2555.

Fisher S. y Marber M. 2002: **An in vivo model of ischaemia-reperfusion injury and ischaemic preconditioning in the mouse heart.** *J Pharmacol Toxicol Methods*. Vol. 48(3): 161-169.

Forte G., Minieri M., Cossa P., Antenucci D., Sala M., Gnocchi V., Fiaccavento R., Carotenuto F., De Vito P., Baldini PM., Prat M. y Di Nardo P. 2006. **Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: proliferation, migration, and differentiation.** *Stem Cells* Vol. 24(1): 23-33.

Frangogiannis N. 2004. **Chemokines in the ischemic myocardium: from inflammation to fibrosis.** *Inflamm. Res.* Vol. 53: 585-595.

Frangogiannis N., Smith C. y Entman M. 2002. **The inflammatory response in myocardial infarction.** *Cardiovascular Research* Vol. 53: 31-47.

Fujita J., Mori M., Kawada H., Ieda Y., Tsuma M., Matsuzaki Y., Kawaguchi H., Yagi T., Yuasa S., Endo J., Hotta T., Ogawa S., Okano H., Yozu R., Ando K. y Fukuda K. 2007. **Administration of granulocyte colony-stimulating factor after myocardial infarction enhances the recruitment of hematopoietic stem cell-derived myofibroblasts and contributes to cardiac repair.** *Stem Cells* Vol. 25(11): 2750-2759.

Fukuda K. 2003. **Use of adult marrow mesenchymal stem cells for regeneration of cardiomyocytes.** *Bone Marrow Transplantation* Vol. 32: 525-527.

Fukuda K. y Fujita J. 2005. **Mesenchymal, but not hematopoietic, stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction in mice.** *Kidney International* Vol. 68: 1940-1943.

García-Moll X. y Kaski J. 2000. **Cardiopatía isquémica: Marcadores de inflamación y riesgo cardiovascular.** *Rev Cubana Med* Vol. 39(2): 120-140.

Geisbuhler T., Johnson D. y Rovetto M. 1987. **Cardiac myocyte guanosine transport and metabolism.** *Am J Physiol Cell Physiol*. Vol. 253: C645-C651.

Geisbuhler T. y Rovetto M. 1991. **Guanosine metabolism in adult rat cardiac myocytes: ribose-enhanced GTP synthesis from extracellular guanosine.** Pflugers Arch. Vol. 419(2): 160-165.

Georgiou H., Rice G. y Baker M. 2001. **Proteomic analysis of human plasma: failure of centrifugal ultrafiltration to remove albumin and other high weight proteins.** Proteomics Vol. 1: 1503-1506.

Giavalisco P., Nordhoff E., Kreitler T., Klöppel K., Lehrach H., Kloese J. y Gobom J. 2005. **Proteome analysis of Arabidopsis thaliana by two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry.** Proteomics. Vol. 5(7): 1902-1913.

Gorg A., Weiss W. y Dunn M. 2004. **Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics.** Proteomics Vol. 4(12): 3665-3685.

Grange E., Semont K., Meknache N., Giraudeax V. y Chappuis P. 2006. **Las disferritinemias, algoritmo de orientación diagnóstica.** Acta Bioquím Clín Latinoam. Vol. 40(2): 265-268.

Gruys E., Toussaint M., Niewold T. y Koopmans S. 2005. **Acute phase reaction and acute phase proteins.** J Zhejiang Univ SCI Vol. 6B(11): 1045-1056.

Guadalajara J. 1996. **Cardiología.** Intersistemas, S.A. Infarto al miocardio, pp 49.

Gutiérrez J., Lobato A., de la Torre J., Prieto J. y San José J. 1998. **Alta precoz en el infarto agudo de miocardio no complicado.** Rev Esp Cardiol Vol. 51(4): 292-296.

Hanniman E., Lambert G., Inoue Y., Gonzalez F. y Sinal C. 2006. **Apolipoprotein A-IV is regulated by nutritional and metabolic stress: involvement of glucocorticoids, HNF-4 alpha, and PGC-1 alpha.** J Lipid Res. Vol. 47(11): 2503-2514.

Hansen B. 1982. **Ischemic heart disease. Pato-anatomic findings revealed by comprehensive autopsy technique.** Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]. Vol. 90(1): 37-49.

Hattan N., Kawaguchi H., Ando K., Kuwabara E., Fujita J., Murata M., Suematsu M., Mori H. y Fukuda K. 2003. **Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice.** Cardiovasc Res Vol. 65: 334-344.

Herrington D. y Klein K. 2001. **Genome and Hormones: Gender Differences in Physiology. Invited Review: Pharmacogenetics of estrogen replacement therapy.** J Appl Physiol. Vol. 91: 2776-2784.

Hornykewycz S., Gabriel H. y Huber K. 1994. **Biochemical markers of myocardial necrosis in acute myocardial infarction and thrombolysis.** Ann Hematol. Vol. 69 (II): S59-S63.

Hu K., Gaudron P., Bahner U., Palkovits M. y Ertl G. 1996. **Changes of atrial natriuretic peptide in brain areas of rats with chronic myocardial infarction.** Am J Physiol. Vol. 270 (1 Pt 2): H312- H316.

Hunsucker S. y Duncan M. 2006. **Is protein overlap in two-dimensional gels a serious practical problem?** Proteomics Vol. 6(5): 1374-1375.

Ide T., Tsutsui H., Hayashidani S., Kang D., Suematsu N., Nakamura K., Utsumi H., Hamasaki N. y Takeshita A. 2001. **Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction.** Circ Res. Vol. 88(5):529-535.

Jackson K., Majka S., Wang H., Pocius J., Hartley C., Majesky M., Entman M., Michael L., Hirschi K. y Goodell M. 2001. **Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells.** J Clin Invest Vol. 107: 1395-1402.

Jäger D., Jungblut P. y Müller-Werdan U. 2002. **Separation and identification of human heart proteins.** J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. Vol. 77: 131-153.

Jin X., Xia L., Wang L., Shi J., Zheng Y., Chen W., Zhang L., Liu Z., Chen G. y Fang N. 2006. **Differential protein expression in hypertrophic heart with and without hypertension in spontaneously hypertensive rats.** Proteomics Vol. 6(6): 1948-1956.

Kawada H., Fujita J., Kinjo K., Matsuzaki Y., Tsuma M., Miyatake H., Muguruma Y., Tsuboi K., Itabashi Y., Ikeda Y., Ogawa S., Okano H., Hotta T., Ando K., y Fukuda K. 2004. **Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction.** Hematopoiesis Vol. 104(12): 3581-3587.

Kehat I, Khimovich L, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G, Huber I, Satin J, Itskovitz-Eldor J. y Gepstein L. 2004. **Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells.** Nat Biotechnol. Vol. 22(10): 1282-1289.

Kew R., Sibug M. Liuzzo J. y Webster R. 1993. **Localization and quantitation of the Vitamin D Binding Protein (Gc-Globulin) in human neutrophils.** Blood Vol. 82(1): 274-283.

Khoudoli G., Porter I., Blow J., Swedlow J. 2004. **Optimisation of the two-dimensional gel electrophoresis protocol using the Taguchi approach.** *Proteome Sci.* Vol. 2(1):6.

Kiernan U., Nedelkov D. y Nelson R. 2006. **Multiplexed mass spectrometric immunoassay in biomarker research: a novel approach to the determination of a myocardial infarct.** *J Proteome Res.* Vol. 5(11):2928-2934.

Kim N., Lee Y., Kim H., Joo H., Youm J., Park W., Warda M., Cuong D. y Han J. 2006. **Potential biomarkers for ischemic heart damage identified in mitochondrial proteins by comparative proteomics.** *Proteomics* Vol. 6(4): 1237-1249.

Krah A., Wessel R. y Pleissner K. 2004. **Assessment of protein spot components applying correspondence analysis for peptide mass fingerprint data.** *Proteomics.* Vol. 4(10): 2982-2986.

Kreil D., Karp N. y Lilley K. 2004. **DNA microarray normalization methods can remove bias from differential protein expression analysis of 2D difference gel electrophoresis results.** *Bioinformatics.* Vol. 20(13): 2026-2034.

Kunapuli S., Rosanio S. y Schwarz E. 2006. **How do cardiomyocytes die? apoptosis and autophagic cell death in cardiac myocytes.** *J Card Fail.* Vol. 12(5): 381-391.

Lan X., Wang J. y Zhang Y. 2005. **Role of beta-adrenergic signal transduction pathway on myocardial ischemic preconditioning of rats.** *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* Vol. 25(6): 709-711.

Li X., Pleissner K., Scheler C., Regitz-Zagrosek V., Salnikow J. y Jungblut P. 1999. **A two – dimensional electrophoresis database of rat heart proteins.** *Electrophoresis* Vol. 20: 891-897.

Lim A., Prokaeva T., McComb M., Connors L., Skinner M. y Costello C. 2003. **Identification of S-sulfonation and S-thiolation of a novel transthyretin Phe33Cys variant from a patient diagnosed with familial transthyretin amyloidosis.** *Protein Sci.* Vol. 12(8): 1775-1785.

Loscalzo J. 2003. **Proteomics in cardiovascular biology and medicine.** *Circulation* Vol. 108: 380-383.

Lu L., Zhang J., Ramires F. y Sun Y. 2004. **Molecular and cellular events at the site of myocardial infarction: from the perspective of rebuilding myocardial tissue.** *Biochem Biophys Res Commun* Vol. 320: 907-913.

Luz P. 2007. **Movilización de células troncales mesenquimáticas durante el infarto agudo al miocardio.** Tesis para obtener el título de Ingeniero en Biotecnología Molecular-Universidad de Chile.

Macri J. y Rapundalo S. 2001. **Application of proteomics to the study of cardiovascular biology.** Trends Cardiovas Med. Vol. 11(2): 66-75.

Mannila M., Lovely R., Kazmierczak S., Eriksson P., Samnegård A., Farrell D., Hamsten A., Silveira A. 2007. **Elevated plasma fibrinogen gamma concentration is associated with myocardial infarction: effects of variation in fibrinogen genes and environmental factors.** J Thromb Haemost. Vol. 5(4): 766-773.

Mateos-Cáceres PJ., García-Méndez A., López Farré A., Macaya C., Núñez A., Gómez J., Alonso-Orgaz S., Carrasco C., Burgos ME., de Andrés R., Granizo JJ., Farré J. y Rico LA. 2004. **Proteomics analysis of plasma from patients during an acute coronary syndrome.** J Am Coll Cardiol Vol. 44 (8): 1578-1583.

Matsushima S., Ide T., Yamato M., Matsusaka H., Hattori F., Ikeuchi M., Kubota T., Sunagawa K., Hasegawa Y., Kurihara T., Oikawa S., Kinugawa S. y Tsutsui H. 2006. **Overexpression of mitochondrial peroxiredoxin-3 prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice.** Circulation Vol. 113(14): 1779-1786.

McGregor E. y Dunn M. 2006. **Proteomics of the heart: Unraveling disease.** Circ Res. Vol. 98(3): 309-321.

Meier U., Gressner O., Lammert F. y Gressner A. 2006. **Gc-Globulin: Roles in response to injury.** Clinical Chemistry Vol. 52(7): 1247-1253.

Miller I., Crawford J. y Gianazza E. 2006. **Protein stains for proteomic applications: which, when, why?.** Proteomics. Vol. 6(20): 5385-5408.

Min J., Sullivan M., Yang Y., Zhang J., Converso K., Morgan J. y Xiao Y. 2002. **Significant improvement of heart function by cotransplantation of human mesenchymal stem cells and fetal cardiomyocytes in postinfarcted pigs.** Soc Thoracic Surg Vol. 74: 1568-1575.

Minguell J., Erices A. y Conget P. 2001. **Mesenchymal stem cells.** Exp Biol Med Vol. 226(6): 507-520.

Minguell J. y Erices A. 2006. **Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease.** Exp Biol Med Vol. 231(1): 39-49.

Miyata S., Minobe W., Bristow M. y Leinwand L. 2000. **Myosin Heavy Chain Isoform Expression in the Failing and Nonfailing Human Heart.** *Circ. Res.* Vol. 86; 386-390.

Molloy M., Brzezinski E., Hang J., McDowell M. y VanBogelen R. 2003. **Overcoming technical variation and biological variation in quantitative proteomics.** *Proteomics* Vol. 3(10): 1909-1912.

Moore R. 1948. A textbook of pathology: **Pathologic anatomy in its relation to the causes, pathogenesis, and clinical manifestations of disease.**

Murry C., Soonpaa M., Reinecke H., Nakajima H., Nakajima H., Rubart M., Pasumarthi K., Virag J., Bartelmez S., Poppa V., Bradford G., Dowell J., Williams D. y Field L. 2004. **Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts.** *Nature* Vol. 428: 664-668.

Nakao K., Minobe W., Roden R., Bristow M. y Leinwand L. 1997. **Myosin Heavy Chain Gene Expression in Human Heart Failure.** *J. Clin. Invest.* Vol. 100(9): 2362-2370.

Neth P., Ciccarella M., Egea V., Hoelters J., Jochum M. y Ries C. 2006. **Wnt Signaling Regulates the Invasion Capacity of Human Mesenchymal Stem Cells.** *Stem Cell* Vol. 24(8): 1892-1903.

Olzmann J., Brown K., Wilkinson K., Rees H., Huai Q., Ke H., Levey A., Li L. y Chin L. 2004. **Familial Parkinson's disease-associated L166P mutation disrupts DJ-1 protein folding and function.** *J Biol Chem.* Vol. 279(9): 8506-8515.

Oren H., Erbay A., Balci M. y Cehreli S. 2007. **Role of novel mediators of inflammation in left ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction: do they affect the outcome of patients?.** *Angiology.* Vol. 58(1): 45-54.

Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine D., Leri A. y Anversa P. 2001. **Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium.** *Nature* Vol. 410: 701-705.

Pacheco D. 2004. **Bioquímica Medica.** Editorial Limusa.

Palumbo R. y Bianchi M. 2004. **High mobility group box 1 protein, a cue for stem cell recruitment.** *Biochem Pharmacol* Vol. 68: 1165-1170.

Penn M., Zhang M., Deglurkar I. y Topol E. 2004. **Role of stem cell homing in myocardial regeneration.** *Int J Cardiol* Vol. 95 suppl.1: 523-525.

Piddo AM., Sánchez MI., Sapag-Hagar M., Corbalán R., Foncea R., Ebensperger R., Godoy I., Meléndez J., Jalil JE. y Lavandero S. 1996. **Cyclic AMP-dependent protein kinase and mechanical heart function in ventricular hypertrophy induced by pressure overload or secondary to myocardial infarction.** *J Mol Cell Cardiol.* Vol. 28(5): 1073 – 1083.

Pieper R., Gatlin C., Makusky A., Russo P., Schatz C., Miller S., Su Q., McGrath A., Estock M., Parmar P., Zhao M., Huang S., Zhou J., Wang F., Esquer-Blasco R., Anderson N., Taylor J. y Steiner S. 2003. **The human serum proteome: Display of nearly 3700 chromatographically separated protein spots on two – dimensional electrophoresis gels and identification of 325 distinct proteins.** *Proteomics* Vol. 3: 1345-1364.

Prabhu S. 2005. **Post-infarction ventricular remodeling: an array of molecular events.** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* Vol. 38: 547–550.

Quaini F., Urbanek K., Beltrami A., Finato N., Beltrami C., Nadal-Ginard B., Kajstura J., Leri A. y Anversa P. 2002. **Chimerism of the transplanted heart.** *NEJM* Vol. 346: 5-15.

Raff M. 2003. **Adult stem cell plasticity: fact or artifact?** *Annu Rev Cell Dev Biol.* Vol. 19: 1-22.

Rafii S., Heissig B. y Hattori K. 2002. **Efficient mobilization and recruitment of marrow-derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vectors expressing angiogenic factors.** *Gene Therapy* Vol. 9: 631-641.

Raghuvanshi R., Kaul A., Bhakuni P., Mishra A. y Misra M. 2007. **Xanthine oxidase as a marker of myocardial infarction.** *Indian Journal of Clinical Biochemistry* Vol. 22(2): 90-92.

Ren G., Dewald O. y Frangogiannis N. 2003. **Inflammatory mechanisms in myocardial infarction.** *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* Vol. 2: 242-256.

Sakai J., Ishikawa H., Kojima S., Satoh H., Yamamoto S. y Kanaoka M. 2003. **Proteomics analysis of rat heart in ischemia and ischemia – reperfusion using fluorescence two – dimensional difference gel electrophoresis.** *Proteomics* Vol. 3: 1318-1324.

Schilling B., Aggeler R., Schulenberg B., Murray J., Row R., Capaldi R. y Gibson B. 2005. **Mass spectrometric identification of a novel phosphorylation site in subunit NDUFA10 of bovine mitochondrial complex I.** *FEBS Lett.* Vol. 25;579(11): 2485-2490.

Schwartz H., Langin T., Platsch H., Richert J., Bomm S., Schmidt M., Hillen H., Blaschke G., Meyer J., Darius H. y Buerke M. 2002. **Two-dimensional analysis of myocardial protein expression following myocardial ischemia and reperfusion in rabbits.** *Proteomics* Vol. 2(8): 988-995.

Severino A., Campioni M., Straino S., Salloum F., Schmidt N., Herbrand U., Frede S., Toietta G., Di Rocco G., Bussani R., Silvestri R., Piro M., Liuzzo G., Biasucci L., Mellone P., Feroce F., Capogrossi M., Baldi F., Fandrey J., Ehrmann M., Crea F., Abbate A. y Baldi A. 2007. **Identification of Protein Disulfide Isomerase as a Cardiomyocyte Survival Factor in Ischemic Cardiomyopathy.** *JACC* Vol. 50(11): 1029-1037.

Shake J., Gruber P., Baumgartner W., Senechal G., Meyers J., Redmond J., Pittenger M. y Martin B. 2002. **Mesenchymal stem cell grafting in a swine myocardial infarct model: Molecular and physiologic consequences.** *Ann Thoracic Surg* Vol. 73: 1919-1926.

Shaw M. y Riederer B. 2003. **Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis.** *Proteomics*. Vol. 3: 1408-1417.

Shim W., Jiang S., Wong P., Tan J., Chua Y., Tan Y., Sin Y., Lim C., Chua T., Teh M., Liu T. y Sim E. 2004. **Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells.** *Biochem Biophys Res Comm* Vol. 324: 481-488.

Stanley B., Neverova I., Brown H. y Van Eyk J. 2003. **Optimizing protein solubility for two - dimensional gel electrophoresis analysis of human myocardium.** *Proteomics* Vol.3: 815-820.

Suurs L., Jongedijk E. y Tan M. 1989. **Polyacrylamide gradient-gel electrophoresis : a routine method for high resolution isozyme electrophoresis of *Solanum* and *Lycopersicon* species.** *Euphytica* Vol. 40: 181 -186.

Swatton JE., Prabakaran S., Karp NA., Lilley KS. Y Bahn S. 2004. **Protein profiling of human postmortem brain using 2-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2-D DIGE).** *Mol Psychiatry*. Vol. 9(2): 128-143.

Tanaka S., Uehara T. y Nomura Y. 2000. **Up-regulation of protein-disulfide isomerase in response to hypoxia/brain ischemia and its protective effect against apoptotic cell death.** *J Biol Chem*. Vol. 275(14): 10388-10393.

Tarantola M., Motterlini R., Beretta M., Samaja M. 1991. **Dual role of hypoxanthine in the reoxygenation of hypoxic isolated rat hearts.** *J Mol Cell Cardiol*. Vol. 23(1):77-82.

Tonge R., Shaw J., Middleton B., Rowlinson R., Rayner S., Young J., Pognan F., Hawkins E., Currie I. y Davison M. 2001. **Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology.** Proteomics Vol. 1(3):377-396.

Tubb M., Silva R., Pearson K., Tso P., Liu M., Davidson W. 2007. **Modulation of apolipoprotein A-IV lipid binding by an interaction between the N- and C-termini.** J Biol Chem. Vol. 282(39): 28385-28394.

Turano C., Coppari S., Altieri F. y Ferraro A. 2002. **Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions.** J Cell Physiol. Vol. 193(2): 154-163.

Uribe C., Cárdenas J., Cabrales J., Bohórquez R., Roa N., Beltrán J. y Urina M. 2005 **Acute myocardial infarction as first manifestation of primary antiphospholipid syndrome in a twenty-four years old patient.** Rev. Colomb. Cardiol. Vol. 12(3): 135-139.

Vandervelde S., van Luyn M., Rozenbaum M., Petersen A., Tio R. y Harmsen M. 2007. **Stem cell-related cardiac gene expression early after murine myocardial infarction.** Cardiovasc Res. 73(4):783-793.

Vandervelde S., Van Luyn M., Tio R. y Harmsen M. 2005. **Signaling factors in stem cell-mediated repair of infarcted myocardium.** J Mol Cell Cardiol. Vol. 39: 363-376.

Vaughan-Jones R., Spitzer K. y Swietach P. 2006. **Spatial aspects of intracellular pH regulation in heart muscle.** Prog Biophys Mol Biol. Vol. 90(1-3):207-224.

Vuillemin M. y Pexieder T. 1997. **Carbonic anhydrase II expression pattern in mouse embryonic and fetal heart.** Anat. Embryol. Vol. 195: 267-277.

Wasilewski J., Osadnik T., Polonski L. y Zembala M. 2006 **High initial fibrinogen level is a risk factor for no-reperfusion phenomenon among patients with ST segment elevation myocardial infarction treated with percutaneous coronary intervention.** Vascular Pharmacology Vol. 45(3): e101-e102.

Wong W., Gerry A., Putt W., Roberts J., Weinberg R., Humphries S., Leake D. y Talmud P. 2007. **Common variants of apolipoprotein A-IV differ in their ability to inhibit low density lipoprotein oxidation.** Atherosclerosis. Vol. 192(2): 266-274.

Wu L. y Wang R. 2005. **Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications.** Pharmacol Rev. Vol. 57(4):585-630.

You S., Archacki S., Angheloiu G., Moravec C., Rao S., Kinter M., Topol E. y Wang Q. 2003. **Proteomic approach to coronary atherosclerosis shows ferritin light chain as a significant marker: evidence consistent with iron hypothesis in atherosclerosis.** *Physiol Genomics*. Vol. 13(1): 25-30.

Zhang L., Shimoji M., Thomas B., Moore D., Yu S., Marupudi N., Torp R., Torgner I., Ottersen O., Dawson T., Dawson V. 2005. **Mitochondrial localization of the Parkinson's disease related protein DJ-1: implications for pathogenesis.** *Hum Mol Genet*. Vol. 14(14): 2063-2073.

Zerkowski H., Grussenmeyer T., Matt P., Grapow M., Engelhardt S. y Lefkovits I. 2004. **Proteomics strategies in cardiovascular research.** *J Proteome Res* Vol. 3: 200-208.