

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL PÉPTIDO
NATRIURÉTICO CEREBRAL EN PACIENTES CON INFARTO AGUDO DEL
MIOCARDIO SIN SUPRADESNIVEL (IAMSEST) Y CONTROLES**

SERGIO AUGUSTO GOMEZ RODRIGUEZ



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
ESCUELA DE QUIMICA
BUCARAMANGA**

2011

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL PÉPTIDO
NATRIURÉTICO CEREBRAL EN PACIENTES CON INFARTO AGUDO DEL
MIOCARDIO SIN SUPRADESNIVEL (IAMSEST) Y CONTROLES**

SERGIO AUGUSTO GOMEZ RODRIGUEZ

Trabajo de grado presentado como requisito para obtener el título de Químico

DIRECTOR

RODRIGO TORRES SAEZ, Ph. D.

Escuela de Química

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

ESCUELA DE QUIMICA

BUCARAMANGA

2011

A DIOS, quien es la inspiración de todo

Al Dr. Rodrigo Torres cuya dirección en este trabajo fue fundamental

A mi familia que siempre me apoyo en el transcurso de mi carrera

A mis amigos por su incondicionalidad y cariño

A los compañeros del GIBIM por su ayuda en la ejecución de este proyecto

Y a Xyomí por todo su apoyo y cariño, (gracias por siempre creer en mí)

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	15
1. MARCO TEORICO	17
1.1. SÍNDROMES CORONARIOS AGUDOS (SCA) E INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO (IAM)	17
1.1.1. Síndromes coronarios agudos (SCA)	17
1.1.2. Infarto agudo de miocardio (IAM)	17
1.1.2.1. El electrocardiograma como prueba diagnóstica del IAM	19
1.1.2.2. Biomarcadores usados en IAM	20
1.2. PEPTIDO NATRIURÉTICO CEREBRAL (BPN)	22
1.2.1. Péptidos Natriurético	22
1.2.2. Bioquímica del BNP	23
1.2.2.1. Estructura del proBNP	24
1.2.2.2. Almacenamiento celular del BNP	25
1.2.2.3. Procesamiento del ProBNP	26
1.2.3. Antecedentes sobre el BNP	26
1.3. TECNICAS INSTRUMENTALES	28
1.3.1. Cromatografía	28
1.3.1.1. Permeación en Gel (Cromatografía de exclusión molecular)	29
1.3.1.2. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	30
1.3.2.1. Método de Ionización Electrospray (ESI)	33
1.3.2.2. Analizadores de masas de Trampa Iónica (IT)	34
1.3.3. Western Blot (Inmunotransferencia)	36
2. MATERIALES Y MÉTODOS	37
2.1. SELECCIÓN Y CLASIFICACIÓN DE MUESTRAS	37
2.1.1. Recolección de las muestras	37
2.1.2. Grupos de estudio	37
2.1.3. Medición de los Niveles de NT-proBNP	38

2.1.4. Almacenamiento y origen de las muestras.....	38
2.2. OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL PLASMA.....	38
2.2.1. Obtención de las muestras de plasma	38
2.3. SEPARACIÓN DE PROTEINAS EN EL PLASMA.....	39
2.3.1. Separación de proteínas por cromatografía de Exclusión Molecular	39
2.3.1.1. Preparación y empacado de Sephadex G-25 y G-50.....	40
2.3.1.2. Preparación fase móvil y equilibración de las columnas	40
2.3.1.3. Calibración de las columnas G-25 y G-50.....	40
2.3.1.4. Separación y recolección de fracciones	41
2.3.2. Separación de proteínas por HPLC en fase reversa (RP-HPLC)	41
2.3.2.2. Preparación de fase móvil.....	42
2.3.2.3. Separación y recolección de fracciones	42
2.4. IDENTIFICACION DEL BNP (formas de bajo peso molecular)	42
2.4.1. Identificación por Espectrometría de masas (MS).....	43
2.4.1.1. Preparación de muestras y análisis en MS	43
2.4.1.2. Análisis de espectros de masas	43
2.5. IDENTIFICACION DEL BNP (Formas de alto peso molecular).....	43
2.5.1. Western Blotting	43
2.5.1.1. Electroforesis de proteínas.....	44
2.5.1.2. Inmunorreferencia	44
2.5.1.3. Reacción antígeno-anticuerpo	44
2.5.1.4. Análisis de imágenes	45
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
3.1. EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE LOS PACIENTES SELECCIONADOS.....	46
3.2. CALIBRACIÓN DE LAS COLUMNAS DE SEPHADEX G-25 Y G-50.....	47
3.3. ESTUDIO DE MOTIVOS DE BAJO PESOS MOLECULAR DEL BNP	49
3.3.1. Análisis de las separaciones obtenidas usando Sephadex G-25	49
3.3.2. Análisis de la Separación por RP-HPLC	53
3.3.2.1. RP-HPLC para los patrones de BNP-32	53

3.2.2.2. RP-HPLC de las muestras de plasma.....	54
3.2.2.2. RP-HPLC de las muestras de plasma.....	56
3.3.3. Identificación por ESI-LIT	58
3.3.4. Perspectiva bioquímica de los resultados	62
3.4. ESTUDIO DE FORMAS DE ALTO PESO MOLECULAR DEL BNP.....	64
3.4.1. Análisis de la separación con Sephadex G-50	64
3.4.1. Identificación mediante Western Blotting.....	66
CONCLUSIONES	69
RECOMENDACIONES.....	71
BIBLIOGRAFIA	72
ANEXOS.....	79

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1: Clasificación de los SCA de acuerdo al registro electrocardiográfico.	18
Fig. 2: Representación de un ciclo cardiaco (actividad bioeléctrica del corazón) en un electrocardiograma.	21
Fig. 3: Estructura primaria de los Péptidos Natriuréticos principales en humanos. A) Péptido Natriurético Auricular, b) Péptido Natriurético cerebral y c) Péptido Natriurético tipo C.	23
Fig. 4: Resumen de la bioquímica de BNP.	24
Fig. 5: Proceso de separación en la cromatografía de exclusión molecular. ..	31
Fig. 6: Configuración de un sistema ESI y modelo espectro de masas obtenido para una proteína.	35
Fig. 7: Separación de mezcla de patrones de proteínas en la columna de exclusión molecular elaborada con Sephadex G-25	48
Fig. 8: Separación de mezcla de patrones de proteínas en la columna de exclusión molecular elaborada con Sephadex G-50.	49
Fig. 9: Cromatograma de exclusión molecular para el plasma de paciente con IAMSEST y disfunción posterior (paciente CEP041) usando columna de Sephadex G-25.	50
Fig. 10: Cromatogramas obtenidos en exclusión molecular. a) Cromatograma de la muestra MS063. b) Cromatograma de la muestra C02	52
Fig. 11: Cromatogramas de los patrones de BNP-32 en la parte superior el patrón A, y en la parte inferior el patrón B.	55
Fig. 12: Cromatograma de RP-HPLC para la fracción de exclusión molecular de la muestra MS063 (grupo 1).	57

Fig 13: Cromatograma de RP-HPLC para la fracción de exclusión molecular de la muestra CPE041 (grupo 2).	57
Fig. 14: Cromatograma de RPLC para la fracción de exclusión molecular de la muestra CPE041 (grupo 2).	58
Fig. 15: Cromatogramas RP-HPLC, en rojo señales de las fracciones colectadas. a) Cromatograma muestra MS063. B) Cromatograma muestra C02.	59
Fig. 16: Espectro de masa para la fracción 1 colectada en RPLC de la muestra MS063.	60
Fig. 17: Espectros de masa. A) Fracción 2 colectada en RPLC de la muestra MS063. B) Patrón de BNP-32 tratado con dimetilsulfoxido.	61
Fig. 18: Espectro de masa para la fracción 1 colectada en RPLC de la muestra C02.	62
Fig. 19: Cromatograma de exclusión molecular para la muestra MS063, usando Sephadex G-50.	65
Fig. 20: Western Blotting de las fracciones provenientes de la columna G-50, para los pacientes y controles analizadas. Carriles: 1. MS063, 2. MAN93, 3. AE032, 4. CEP041, 5. FDC078, 6. RCA015, 7. C02, 8. C07, 9. C73, 10. Marcador de Peso.	67

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Grupos de estudio.....	38
Tabla 2: Características de los pacientes seleccionados y valores de la medición de los niveles de NT-proBNP	46
Tabla 3: Tabla ANOVA para los grupos de estudio tomando como parámetro los niveles de NT-proBNP medidos para cada paciente.	47
Tabla 4: Resultados para la exclusión molecular con Sephadex G-25 de las muestras estudiadas.	53
Tabla 5: Resultados para la exclusión molecular con Sephadex G-50 de las muestras estudiadas.	65
Tabla 6: Pesos moleculares y densidad de la bandas registrada en el Western Blotting.	68

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A: Curva de calibración concentración de proteínas.....	79
ANEXO B: Soluciones Western Blotting.....	80
ANEXO C: Cromatogramas Sephadex G-25	83
ANEXO D: Cromatogramas RP-HPLC	86
ANEXO E: Cromatogramas Sephadex G-50	90

RESUMEN

TITULO*: EVALUACION DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL PÉPTIDO NATRIURÉTICO CEREBRAL EN PACIENTES CON INFARTO AGUDO DEL MIOCARDIO SIN SUPRADESNIVEL (IAMSEST) Y CONTROLES*

Sergio Augusto Gómez Rodríguez**

Palabras claves: BNP, IAMSEST, BIOMARCADOR, SCA, CROMATOGRAFIA, WESTERN BLOTTING, ESPECTROMETRIA DE MASAS.

Se determinó la expresión diferencial del Péptido Natriurético Cerebral (BNP) en plasma de pacientes con infarto Agudo del Miocardio sin Supradesnivel (IAMSEST) en relación a controles, observando que esta hormona muestra formas moleculares que podrían no contener actividad biológica en el caso de personas víctimas de la enfermedad. Estos análisis se realizaron utilizando exclusión molecular y HPLC-RP como fases de separación y purificación de la proteína y posteriormente se sometieron a Espectrometría de Masas y Western Blotting como pruebas identificatorias y los resultados obtenidos se analizaron a través de los programa Origin y Quantity-one respectivamente.

Los hallazgos indican la presencia de una forma estructural del BNP sin el puente disulfuro de esta hormona, lo cual sugiere que esta alteración conformacional estaría asociada a problemas de reconocimiento del BNP en los receptores celulares propios del péptido, además en este trabajo se encontraron motivos de alto peso molecular inmunorreactivos a anticuerpos contra el BNP, que se presume están asociados a la oligomerización del proBNP.

Estos resultados podrían explicar porque pese a la sobreexpresión del BNP mostrada e pacientes con IAMSEST, estos observan síntomas de Hipertrofia Cardíaca aun cuando el BNP se encuentra asociado a la inhibición de esta enfermedad. Por otra parte, los oligómeros del proBNP sugieren el desarrollo del Falla congestiva Cardíaca en las personas que exhibieron estos motivos moleculares.

*Proyecto de grado

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Rodrigo Torres Sáez

ABSTRACT

TITLE*: EVALUATION OF DIFFERENTIAL EXPRESSION OF BRAIN NATRIURETIC PEPTIDE IN PATIENTS WITH ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION WITHOUT ST-SEGMENT ELEVATION (NSTEMI) AND CONTROLS

Sergio Augusto Gómez Rodríguez**

Keywords: BNP, NSTEMI, biomarkers, ACS, Chromatography, Western blotting, Mass Spectrometry

We determined the differential expression of Brain Natriuretic Peptide (BNP) in plasma of patients with Acute Myocardial Infarction without ST (NSTEMI) in relation to controls, whereas this hormone shows molecular forms that could not contain biological activity in the case of victims of the disease. These tests were performed using molecular exclusion HPLC-RP as phases of separation and purification of the protein and then subjected to mass spectrometry and Western blotting as identification evidence and the results were analyzed using the program Origin and Quantity-one respectively.

The findings indicate the presence of a structural form of the BNP without the disulfide bridge of the hormone, suggesting that this conformational change would be associated with problems in the recognition of BNP peptide own cell receptors also were found in this study based on high molecular weight immunoreactive to antibodies against the BNP, presumed to be associated with the oligomerization of proBNP.

These results could explain why despite the overexpression of BNP displayed and NSTEMI patients, these symptoms of cardiac hypertrophy observed even when the BNP is associated with inhibition of this disease. Moreover, the oligomers of proBNP suggest the development of congestive heart failure in people who exhibited these reasons molecular.

*Project grade

** Faculty of Sciences. School of Chemistry. Director: Rodrigo Torres Sáez

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son un verdadero problema de salud a nivel mundial. Sólo en el año 2002 se registraron alrededor de 16 millones de disfunciones, de las cuales, el 43.15% correspondió a casos de síndrome coronarios agudos (SCA), y especialmente a infarto agudo de miocardio (IAM). La tasa de mortalidad sigue creciendo anualmente y las proyecciones indican que en el 2020 los SCA serán la primera causa de muertes en países industrializados y la tercera en países en vía de desarrollo. Esto hace indispensable el estudio de dichas patologías desde diferentes perspectivas [1].

De esta manera, desde el punto de vista bioquímico, se considera que las enfermedades generan la alteración de la expresión genética (genómica) y proteínica (proteómica) al interior de un ente biológico. Por lo tanto, es importante la identificación de las proteínas alteradas y la medición de sus niveles de expresión ya que estas podrían tener potencial como marcadores proteicos (biomarcadores) de diversas patologías humanas. Los biomarcadores son trascendentales en el diagnóstico y pronóstico de las enfermedades. A nivel clínico, su estudio es tan extenso, que existe una amplia bibliografía sobre su uso y detección, entre otros parámetros, y su utilización ha contribuido en gran manera al desarrollo de estrategias terapéuticas más efectivas [2].

Esto ha originado gran interés sobre los biomarcadores cardiacos, en primer lugar, por que ofrecen una vía no invasiva para reconocer el estado del paciente, y en segundo lugar, porque en algunos casos las herramientas cardiográficas no son suficientemente precisas como para indicar alguna situación de riesgo. Por lo tanto, teniendo en cuenta que este tipo de patologías ocupan los primeros lugares entre las razones de disfunción a nivel mundial, se puede entender el impacto que tiene el conocimiento de la actividad biológica, estructura y en general de la bioquímica de un biomarcador cardiaco. Por otra parte, casos como los

síndromes coronarios agudos (SCA) sin supradesnivel son un claro ejemplo de la gran utilidad de un biomarcador cardiaco al distinguir entre un Infarto agudo de miocardio sin elevación del segmento ST (IAMSEST) y una angina inestable (AI). Actualmente, las Troponinas son el biomarcador de diagnostico más usado para IAMSEST [3].

Sin embargo, el péptido natriurético cerebral (BNP) ha demostrado su condición de biomarcador, no solo en el diagnóstico de la enfermedad, sino también en la predicción de mortalidad posterior al infarto. Por esta razón, existe un gran interés en la identificación plena de la(s) isoforma(s) presentes en el plasma sanguíneo, en especial del fragmento que observa actividad biológica. Aunque se han reportado varios trabajos sobre BNP, la mayoría no muestran resultados confiables, debido a que los métodos usados para su determinación no han sido lo suficientemente específicos. Sólo se ha especulado respecto a lo que probablemente ocurre con el BNP en el plasma [4].

A pesar que el BNP puede ser utilizado como biomarcador, no se han obtenido buenas correlaciones entre la razón de BNP 1-76 a pro-BNP, debido a las limitaciones metodológicas y las dificultades en la identificación molecular y funcional de los péptidos por técnicas cromatográficas convencionales [5]. Esto demuestra la importancia de usar técnicas, tales como cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), electroforesis bidimensional y espectrometría de masas, que brinden la posibilidad de distinguir entre las diferentes isoformas del BNP en el plasma.

1. MARCO TEORICO

1.1. SÍNDROMES CORONARIOS AGUDOS (SCA) E INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO (IAM)

1.1.1. Síndromes coronarios agudos (SCA)

Los SCA configuran la expresión más frecuente y actualmente se prefiere su clasificación en síndromes isquémicos sin elevación del segmento ST: angina inestable (AI) e infarto de miocardio sin supradesnivel del segmento ST (IAMSEST) y con elevación del segmento ST (IAMST). Esta clasificación se basa en el hecho fisiopatológico de la ruptura o erosión de la placa con trombo con una obstrucción parcial o total del vaso coronario (Ver figura 1) [6].

Existen múltiples factores asociados a la ruptura de la placa, tales como el aumento de actividad inflamatoria mediada por linfocitos o macrófagos, o incluso la infección del vaso por *Chlamydia pneumoniae*. Cuando los componentes del sub-endotelio son expuestos a las plaquetas, ocurre el inicio de formación del trombo. Para ello, las plaquetas deben ser activadas y los receptores glicoprotéicos IIb/IIIa de la superficie plaquetaria deben activarse para mediar la agregación plaquetaria. Dicha agregación incrementa marcadamente la producción de trombina, la cual, a su vez, aumenta y estabiliza el trombo en desarrollo. El vasoespasmo coronario ocurre a menudo en lugares con placas inestables y parece que contribuye a la formación del trombo [7].

1.1.2. Infarto agudo de miocardio (IAM)

El infarto agudo de miocardio representa la manifestación más significativa de la cardiopatía isquémica, que se presenta cuando se produce una necrosis del músculo cardíaco como consecuencia de una ausencia de oxígeno severa. La

isquemia se presenta por una oclusión coronaria aguda de origen trombótico que se produce tras la ruptura de una placa de ateroma vulnerable, fenómeno que depende de la relación sinérgica de diferentes factores:

- *Relacionados con la misma placa*, superficie y profundidad de la ruptura, tipo de colágeno contenido en la placa, presencia de material lipídico, niveles de tromboplastina tisular.
- *Relacionados con la coagulación*, hipercoagulabilidad sanguínea (niveles de fibrinógeno o factor VII elevados, aumento de la agregación plaquetaria).
- Relacionados con la pared del vaso y el flujo sanguíneo.

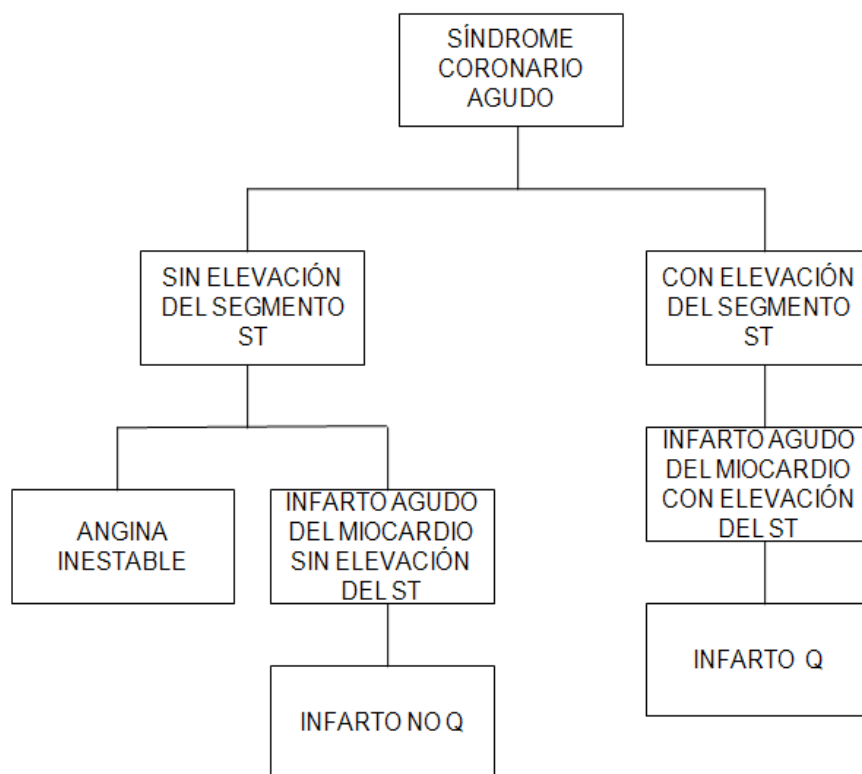


Fig. 1: Clasificación de los SCA de acuerdo al registro electrocardiográfico.

La extensión del territorio irrigado por la arteria ocluida, la lisis del trombo y el momento en que se produce, y la presencia de efectos colaterales son los principales determinantes del tipo de infarto (“Q” o “no Q”), de su extensión y localización [8].

Desde un punto de vista fisiopatológico el proceso se inicia cuando una placa blanda sufre de erosión o fisura con la consiguiente exposición del material subyacente constituido por lípidos, células inflamatorias tipo linfocitos, monocitos, macrófagos y musculares lisas, que son activadas a través de mediadores del tipo tromboxano A2, ADP, FAP, trombina, factor tisular, radicales libres; lo que lleva a activación del proceso de coagulación con adhesión y agregación de plaquetas y generación de un trombo oclusivo con fibrina y abundantes glóbulos rojos, que provoca isquemia hacia distal del vaso comprometido si no hay circulación colateral [9].

En el proceso de fisura o erosión estarían involucradas algunas citoquinas que inhibirían el proceso de formación de la capa fibrosa que cubre la placa aterosclerótica haciéndola más susceptible de ruptura por la acción de enzimas generada por los macrófagos tales como metaloproteinasa del tipo de colagenasa, gelatinasa, elastasa, etc. La isquemia así generada lleva al proceso de necrosis del tejido distal y a la obstrucción con los consiguientes cambios estructurales de la membrana celular y de su estructura fibrilar, que llevan a la pérdida de capacidad contráctil y que dependiendo de la extensión del compromiso puede llevar a la falla cardiaca irreversible [10].

1.1.2.1. El electrocardiograma como prueba diagnóstica del IAM

El electrocardiograma es la representación gráfica de la actividad eléctrica del corazón, que se obtiene con un electrocardiógrafo en forma de cinta continua, la figura 2 indica registro de un ciclo cardiaco por este instrumento. Es el

instrumento principal de la electrofisiología cardíaca y tiene una función relevante en el cribado y diagnóstico de las enfermedades cardiovasculares, alteraciones metabólicas y la predisposición a una muerte súbita cardíaca. También es útil para saber la duración del ciclo cardíaco. El electrocardiograma tiene la ventaja de ser un procedimiento médico con resultados disponibles inmediatamente, no es invasiva y es económica [7]. Durante el IAM aparecen tres signos electrocardiográficos específicos:

- ISQUEMIA: el primer signo consiste en la aparición de ondas T isquémicas. Estas son de mayor voltaje, con aspecto picudo, simétricas respecto a sí mismas y pueden ser deflexiones tanto positivas como negativas dependiendo de la localización de la isquemia.
- LESIÓN: la corriente de lesión miocárdica (que sucede a la isquemia) se traduce en la desviación del segmento ST hacia arriba o hacia abajo.
- NECROSIS: se habla de necrosis miocárdica cuando aparece una onda Q patológica. Son sus características una duración mayor de 0.04 segundos y profundidad de al menos el 25% del voltaje de la onda R siguiente [11].

1.1.2.2. Biomarcadores usados en IAM

Los biomarcadores son moléculas que están asociadas a una alteración en un sistema biológico, y por lo tanto su medida indica la presencia de dicha alteración y la magnitud de esta. En el caso de las patologías cardiovasculares se han estudiado innumerables moléculas con potencial de marcadores, y cuando se trata de infarto agudo de miocardio, las razones para la búsqueda y estudio de este tipo de indicadores son prioridad en la medicina cardiovascular [12]. Tradicionalmente los enzimas empleados como indicadores diagnósticos de IAM son la creatina fosfoquinasa total (CK), cuya función es regular la disponibilidad de energía en las células musculares; a lactato deshidrogenasa (LDH) que interviene en el

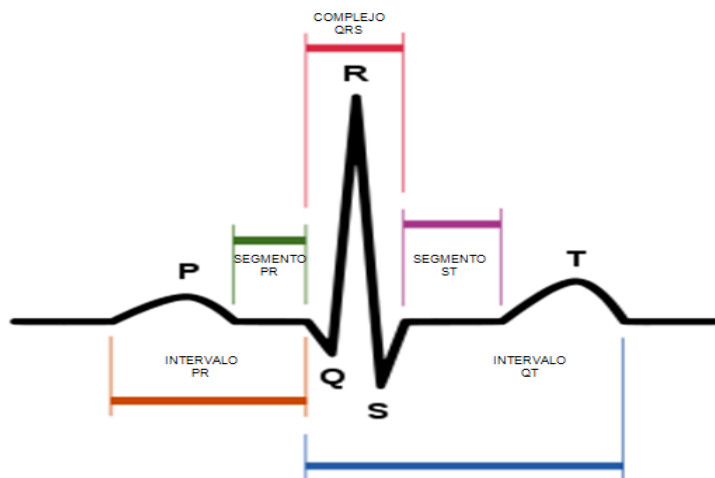


Fig. 2: Representación de un ciclo cardíaco (actividad bioeléctrica del corazón) en un electrocardiograma.

Estos enzimas aparecen en sangre tras IAM pero no son específicos del corazón puesto que también se encuentran en otros tejidos por lo que, para sustentar el diagnóstico de IAM se realizan determinaciones seriadas durante los primeros 3 ó 4 días y se requiere que muestren las curvas de ascenso y normalización típicas para cada uno de ellos. La determinación de isoenzimas localizadas principalmente en células cardíacas mejora la especificidad de las pruebas para el diagnóstico de IAM. Los principales son la CK-MB, la LDH1 y la LDH2 [13]. Tras un IAM hay una fase inicial lenta dentro de la cual las enzimas de sangre se encuentran dentro de sus valores normales. Pueden pasar hasta 6 horas antes de que pueda detectarse una elevación de la CK-MB. Tras esta fase los enzimas aumentan rápidamente, siendo los valores proporcionales a la extensión de la zona infartada. De forma más reciente se realizan determinaciones de algunas proteínas cardíacas, principalmente mioglobina, troponina (subunidades T e I) y cadenas ligeras y pesadas de miosina. Para valorar el daño miocárdico son más específicas que las enzimas. La mioglobina se eleva rápidamente y de forma breve en sangre de tal forma que algunos autores la consideran como el mejor marcador para diagnosticar un IAM entre las 3 y las 6 horas después de

instaurarse los síntomas. La troponina también se eleva en sangre tras un IAM y su determinación presenta algunas ventajas, tales como diferenciar el daño miocárdico reversible del irreversible, diagnosticar infartos producidos en el perioperatorio y realizar el seguimiento de la reperfusión tras terapia trombolítica [14].

1.2. PEPTIDO NATRIURÉTICO CEREBRAL (BPN)

1.2.1. Péptidos Natriurético

Son tres los péptidos natriurético más conocidos, el Péptido Natriurético Atrial (ANP), el Péptido Natriurético tipo B (BNP) y el Péptido Natriurético tipo C (CNP) (Ver figura 3). Todos ellos presentan un anillo de 17 aminoácidos producto de un puente disulfuro y su actividad está relacionada con la protección del sistema cardiovascular en momentos de incremento de volumen en el corazón. El ANP y el BNP son liberados inicialmente desde el corazón a la sangre, y allí son dirigidos a varios tejidos del cuerpo donde actúan induciendo la vasodilatación, natriuresis y diuresis. Por otra parte, el CNP es en primera instancia, un derivado de las células endoteliales, sin embargo, puede sintetizarse en el corazón y actuar contra los efectos de remodelación cardiaca posteriores al IAM [15].

En general, la actividad biológica de los PNs es mediada por el enlace de membrana receptor-péptido (NPRs), que se une a un monofosfatoguanosin cíclico (GMP) dependiente de la cascada de señalización, de esta manera el NPR-A se enlaza preferencialmente al ANP y al BNP, mientras el NPR-B lo hace al CNP. La eliminación de los NPs de la sangre es mediada por el NPR-C [16].

Estas características funcionales han ocasionado un alto interés en los NPs como marcadores cardiacos, y es muy bien conocido que los niveles de estos péptidos

se incrementan tras eventos cardiovasculares. Por esta razón, se han diseñado números kits para la medición de los niveles de los NPs, y en especial del BNP. Asimismo, se han realizado números estudios para entender el comportamiento fisiológico de un paciente en cuanto a estos péptidos se refiere [17].

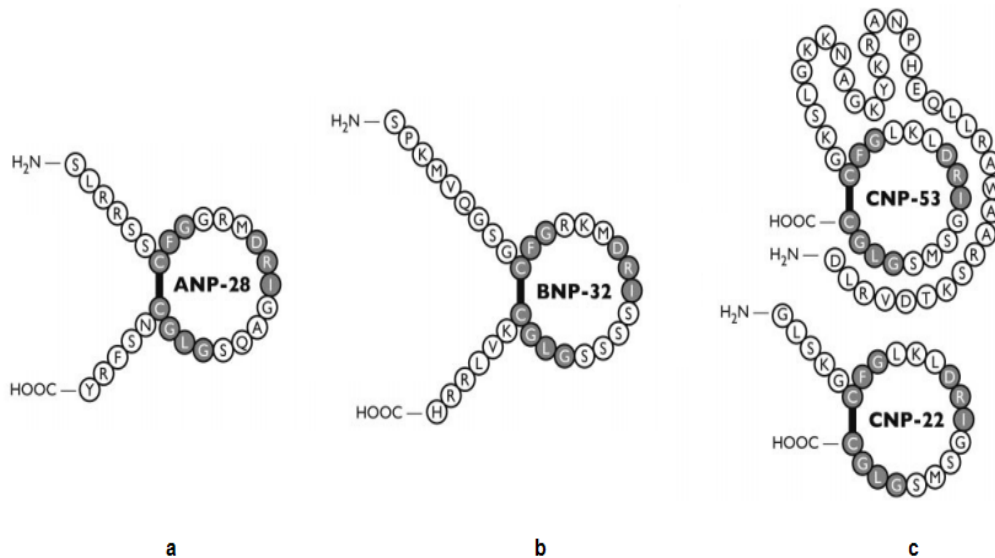


Fig. 3: Estructura primaria de los Péptidos Natriuréticos principales en humanos. A) Péptido Natriurético Auricular, b) Péptido Natriurético cerebral y c) Péptido Natriurético tipo C.

1.2.2. Bioquímica del BNP

El BPN es una hormona que se sintetiza inicialmente como una prohormona conocida como el proBNP, la cual es luego hidrolizada y secretada como BNP para cumplir con sus funciones biológicas. Así, la bioquímica del BNP incluye todo su proceso de síntesis, secreción y procesamiento al interior del ente biológico [16]. En la figura 4 se muestra un esquema de todo el proceso bioquímico del BNP.

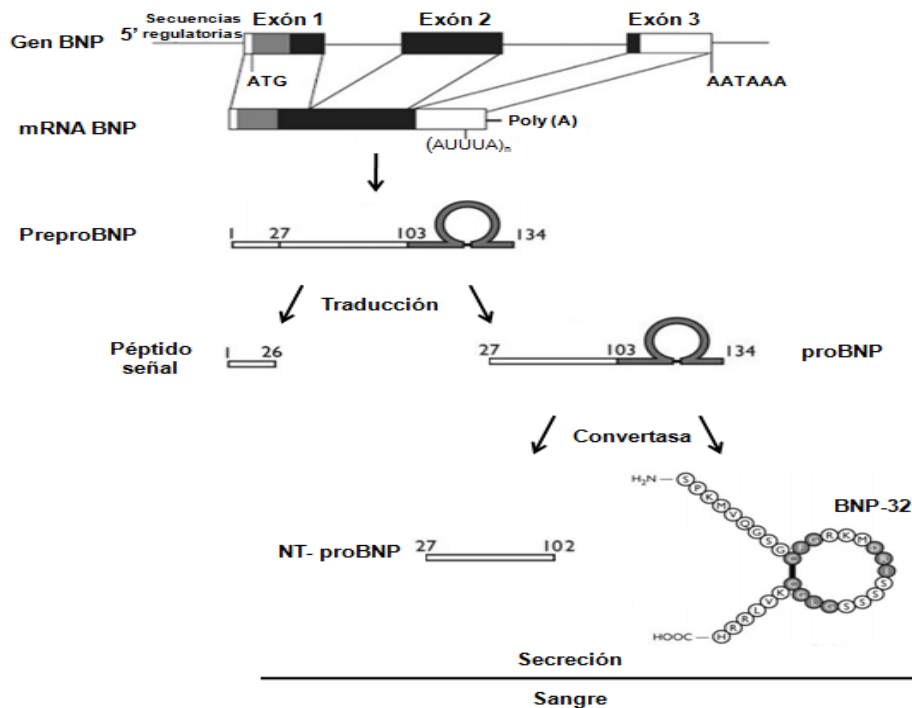


Fig. 4: Resumen de la bioquímica de BNP.

1.2.2.1. Estructura del proBNP

El proBNP es un polipéptido que en humanos tiene una longitud de 108 aminoácidos. En roedores como ratones y ratas, la estructura primaria es ligeramente más corta, pero tiene una región C-terminal similar, que contiene el fragmento con actividad biológica, es decir, la secuencia que se enlaza al receptor. En mamíferos se ha deducido la secuencia del PreproBNP desde el cADN para el BNP. Además de contener el proBNP, el PreproBPN muestra un fragmento N-terminal hidrofóbico de 26 aminoácidos, pero este es removido durante la síntesis en el retículo endoplasmático (modificaciones post-traduccionales). Por lo tanto, es muy importante entender que el PreproBNP no es una molécula real, sino que sólo es concepto teórico. En contraste, el proBNP es una molécula con un corto tiempo de vida, su existencia ha sido determinada por estudios a través de inmunoensayos. En humanos, el proBNP es dividido en dos regiones al ser

hidrolizado en las posiciones 73-76 (Arg-Ala-Pro-Arg). La primera región es un fragmento N-terminal 1-76, la segunda es el fragmento C-terminal BNP-32. A diferencia de otras prohormonas, el proBNP no muestra una tercera región C-terminal. En su lugar la estructura se asemeja a los otros PNs en los que se encuentra ubicado un anillo en la región C-terminal debido a un puente disulfuro entre los residuos de Cisteína en las posiciones 86 y 102. Esta conformación es fundamental para la unión a su receptor y su actividad biológica [18].

1.2.2.2. Almacenamiento celular del BNP

El gen de expresión se encuentra en los miocitos ventriculares y atriales. En un corazón saludable, la expresión del BNP ocurre principalmente en la aurícula. Sin embargo, la expresión génica del BNP en el ventrículo está regulada en las enfermedades que lo afectan. Esto ha hecho que con frecuencia se piense que el BNP es una hormona ventricular. Los miocitos auriculares y ventriculares difieren considerablemente con respecto a su aparato endocrino y es razonable pensar que existe diferencia en el almacenamiento y secreción del péptido. Los miocitos ventriculares tienen gránulos secretores para los péptidos almacenados, lo cual condujo a la principal hipótesis alrededor de la función endocrina del corazón. Es importante mencionar que los gránulos auriculares almacenan el ProBNP y sus productos de hidrólisis, como el BNP-32. En contraste, los miocitos ventriculares en un corazón saludable parecen no producir estos gránulos y no contienen péptidos derivados del proBNP. No obstante, existen informes sobre gránulos de secreción del proBNP y sus derivados en los miocitos ventriculares de corazones enfermos. Por lo tanto, los miocitos ventriculares no solo muestran diferencias con la regulación del gen del BNP, también lo hacen en el aparato de biosíntesis. Por parte, otras células del corazón contienen el gen de expresión del BNP: los fibroblastos cardiacos producen y liberan BNP-32, según indican estudios recientes. De forma similar, la vasculatura coronaria también es capaz de expresar el BNP, por lo menos en la aterosclerosis coronaria. La aclaración de la forma

precisa de cómo el proBNP es almacenado y secretado en las células requiere de más exploración [19].

1.2.2.3. Procesamiento del ProBNP

En primer lugar se sugirió el rompimiento del proBNP por la endoproteasa Furina, debido a que los genes para la expresión del BNP y la Furina se expresan en los miocitos de un corazón enfermo. Además, el motivo estructural Arg-X-X-Arg en las posiciones 73-76 en el péptido proBNP muestra ser un blanco para el rompimiento mediado por la Furina. De hecho, el procesamiento del ProBNP puede ser bloqueado *in vitro* por la inhibición de la Furina. Por otra parte, recientes estudios identificaron una proteasa en el cADN del corazón humano. Esta proteína se conoce como Corin, la cual es una proteasa-serina que puede hidrolizar tanto al proANP como al proBNP *in vitro*; presuntamente en lugares similares, no obstante la Corin contiene un dominio de transmembrana, localizado junto a la membrana celular. Por esta razón, se sugirió que es quien rompe al precursor antes de la secreción. Pero la actividad de la Corin no explica por completo la maduración del BNP, por lo que cree que otras proteasas pueden estar involucradas en este proceso, lo cual hace necesario identificar otras moléculas derivadas del proBNP para entender mejor el procesamiento de esta pro-hormona en el corazón. No obstante, se cree que en circulación sanguínea, BNP-32 es metabolizado por una endopeptidasa unida a membrana, y posee un tiempo de vida media de 13-20 minutos, aunque también se encuentra en muestras de orina [15]. Otros autores han sugerido que en la digestión del BNP se encuentran involucrados los factores de coagulación, particularmente el Kalli Krein, el cual parece estar asociado al proceso de degradación del BNP en la sangre, especialmente en pacientes con isquemia cardiaca [20].

1.2.3. Antecedentes sobre el BNP

El BNP fue descubierto primero en cerebros porcinos. Por esta razón, fue llamado péptido natriurético cerebral. Sin embargo, se hizo su aislamiento en humanos inicialmente desde el tejido de la aurícula. De esta forma, la secuenciación de este péptido dio como resultado la secuencia primaria: S-P-K-M-V-X-X-Q-G-S-G-X-F-G-R-K-M-D-R-I-S-S-X-X-G-L-X-XX-V-L-R [21].

Por otro lado, la caracterización de las formas moleculares ha sido hecha con uso de técnicas cromatográficas e inmunoensayos. Estos han mostrado la heterogeneidad del BNP en el plasma. Se han encontrado motivos estructurales de bajo y alto peso molecular, siendo todos inmunorreactivos. Se presume que las formas de alto peso molecular son producidas por la oligomerización del Pro-BNP. Sin embargo, aún no se ha establecido muy bien cómo podría ocurrir este proceso. Por otro lado, las formas de bajo peso molecular pueden tratarse de BNP 77-108 (BNP-32), aunque no se ha podido elucidar su estructura completamente. Estos autores también indican que las fracciones de alto peso molecular presentan mayor inmunorreactividad en relación a los de bajo peso molecular, lo que sucede como consecuencia del tiempo de vida media de cada estructura [22].

Sin embargo, se ha encontrado que en los pacientes con falla cardiaca, el BNP se presenta mayoritariamente en su forma de alto peso molecular, lo que podría asociarse a los síntomas contradictorios que muestran los pacientes. No obstante, se ha demostrado también que la disminución de la actividad biológica del BNP está relacionada con la activación de la fosfodiesterasa que hidroliza GMPc [23]. También se observó que el BNP-32 se encuentra involucrado en procesos de amiloidosis, es decir, en la formación de fibrillas que se han aislado del corazón de pacientes con cardiomiopatía, que se genera como consecuencia de la amiloidosis cardiaca [24].

La relación entre los problemas cardiacos y el BNP han hecho que se estudie como biomarcador tanto de diagnóstico como pronóstico de SCA. Se han

realizado múltiples análisis y todos concuerdan en que el BNP presenta muy buenos resultados en el diagnóstico de IAM, debido a que se presenta una estrecha relación entre los niveles del péptido y el grado de isquemia miocárdica [25-26]. Se ha visto también que, entre los marcadores cardiacos, el BNP es el que muestra mayor potencial como predictor de mortalidad, además puede ser usado como marcador independiente. Sin embargo, la escasa información sobre la elucidación estructural de este péptido ha limitado sus posibles aplicaciones en el campo clínico [27].

1.3. TECNICAS INSTRUMENTALES

1.3.1. Cromatografía

Se conoce como cromatografía a un conjunto de métodos diseñados para separar mezclas. Según la definición dada por Keulemans, la cromatografía es un método de separación en el que los componentes se distribuyen entre dos fases, una de las cuales constituye un lecho estacionario (fase estacionaria) de amplio desarrollo superficial y la otra es un fluido (fase móvil) que pasa a través o a lo largo del lecho estacionario [28].

Los métodos cromatográficos más usados consisten en la elución en columna, que básicamente funcionan debido a la interacción de la fase estacionaria con los analitos a separar. De acuerdo con la intensidad de dicha interacción, tardará más o menos tiempo en hacer eluir un analito particular.

En términos prácticos, se observa los componentes desglosados en forma de bandas, o zonas, que se localizan a lo largo de la columna, de modo que el aislamiento de cada especie separada se logra cuando se hace pasar suficiente

fase móvil como para lograr que cada banda salga de la columna y para que sea de esta manera detectada o colectada [29].

La respuesta del detector en función del tiempo de elución (o el volumen de fase móvil añadida), da como resultado un gráfico que se conoce como cromatograma, en donde la posición de los picos brinda información respecto a la identidad de los componentes y sus áreas sobre la concentración de cada analito. No obstante, el tiempo que transcurre desde la inyección de la muestra hasta que el pico de concentración del analito alcanza el detector se conoce como tiempo de retención y se representa como t_R . Por otra parte, se observa que los picos cromatográficos muestran forma de una curva o distribución gaussiana, fenómeno que se puede atribuir a la combinación aditiva de los movimientos aleatorios de las numerosas moléculas de soluto en la banda cromatográfica [30].

Existe una amplia clasificación de los métodos cromatográficos de elución en columna de acuerdo con la fase estacionaria utilizada. Sin embargo, en el estudio de muestras biológicas, particularmente de proteínas, se acude a la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), pero aún se usan algunos procedimientos preparativos, tales como la permeación en gel, debido a la facilidad y utilidad de la técnica. Por esta razón, se muestran a continuación los fundamentos prácticos y teóricos de estas herramientas analíticas [31].

1.3.1.1. Permeación en Gel (Cromatografía de exclusión molecular)

Esta poderosa herramienta analítica es usada en la separación de muestras especialmente cuando se trata de moléculas de alto peso molecular. Los rellenos para la cromatografía de exclusión molecular están constituidos por partículas poliméricas o de sílice que contiene una red de poros uniformes donde se distribuyen el soluto y el disolvente. La cromatografía de permeación en gel, idealmente, depende solo del tamaño y forma de las moléculas que se van a

separar y de los poros de la fase estacionaria. Los analitos se distribuyen entre el volumen a fuera de las partículas de la fase estacionaria y el volumen al interior de los poros de ésta. El tiempo de residencia medio en los poros depende del tamaño efectivo de las moléculas de los analitos. Las moléculas que son más grandes que el tamaño medio de los poros de la fase estacionaria son excluidas y de esta forma no se retienen, y de esta manera son las que eluyen primero. Las moléculas que tienen diámetros significativamente menores que los poros, pueden penetrar a través del laberinto de poros y así resultan atrapadas durante más tiempo, por lo que son las últimas en eluir. Entre estos dos extremos, están las moléculas de tamaño intermedio cuya penetración media en los poros depende de su diámetro. Dentro de este grupo, tiene lugar el fraccionamiento, que está directamente relacionado con el tamaño molecular y de cierto modo con la forma molecular. En cuanto a las fases estacionarias, se elaboran con variados tamaños de poro y existen tanto para el uso de fases móviles orgánicas como acuosas, esto permite una gran versatilidad en el uso de la técnica. En la figura 5 se muestra el proceso de separación por tamaño [32].

1.3.1.2. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficiencia es una técnica instrumental que consiste en una fase móvil líquida, la cual se mueve a través de una fase estacionaria, y la muestra (que contiene varios componentes) es desglosada de acuerdo a un parámetro de separación. Las ventajas que se tiene en comparación a otras técnicas cromatográficas son el tiempo de la corrida, la sensibilidad de los detectores y la versatilidad, ya que puede adaptarse a varios tipos de columnas. Sin embargo, el costo de la instrumentación necesaria se ha convertido en un inconveniente para acceder a ella.

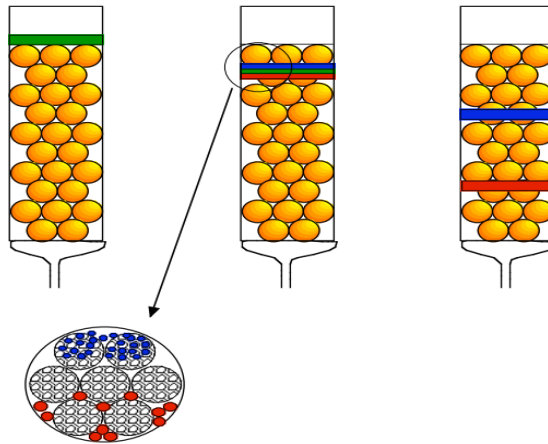


Fig. 5: Proceso de separación en la cromatografía de exclusión molecular.

Otro punto a favor de esta técnica analítica se encuentra en las posibilidades que muestra los equipos usados, ya que un sistema HPLC contiene dentro de su configuración una bomba, puede recurrirse a la utilización de gradientes de fase móvil variando la concentración de un solvente para obtener mayor capacidad de separación. En el caso del estudio de muestras biológicas el uso de columnas para HPLC en fase reversa (RP-HPLC) se ha ido extendiendo, en especial si se trata de mezclas complejas de proteínas u otras biomoléculas [33].

- **RP-HPLC Y GRADIENTE DE ELUCIÓN.** En este tipo de cromatografía, las proteínas son retenidas en la fase estacionaria en virtud de las interacciones hidrofóbicas que establecen con la sílica modificada. Aunque las interacciones hidrofóbicas son en general bastante débiles, éstas son muy numerosas, lo que genera la retención en la columna. Es por ello que se puede sustituir el agua de la fase móvil con un solvente orgánico, para permitir la elución de las moléculas mediante un gradiente de concentración del solvente orgánico. Este tipo de gradientes, se realizan usando solventes como acetonitrilo, metanol o propanol de acuerdo con las características de las muestras y las necesidades analíticas. De esta manera, se brinda la posibilidad de obtener mejores separaciones, picos más

definidos e incluso la elución de analitos que en una corrida isocrática no se observarían en el cromatograma. Un gradiente de fase móvil funciona incrementando de forma lineal la concentración del solvente orgánico. Como el tiempo de retención está relacionado con el parámetro k (que es un término utilizado para expresar la distribución del analito entre la fase móvil y estacionaria), en el caso de un corrida isocrática se tendría esta expresión, donde k_w representa la distribución del soluto en la fase acuosa,

$$\text{Log } k = \text{Log } k_w$$

Pero cuando se añade otro componente al eluyente entonces la anterior expresión se convierte en

$$\text{Log } k = \text{Log } k_w - \Phi S$$

Donde Φ representa la concentración del segundo componente de la fase móvil. No obstante, a medida que aumente Φ entonces tenemos que $\text{Log } k$ disminuye, y por lo tanto k . Cuando obtenemos una disminución importante de este parámetro es visible el efecto sobre el tiempo de retención de cada componente de la muestra [34].

1.3.2. Espectrometría de masas (MS)

La Espectrometría de Masas es una técnica analítica usada para identificar compuestos desconocidos, para cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura y propiedades químicas de moléculas. La detección de compuestos puede ser llevada a cabo con cantidades realmente pequeñas (algunos pmoles) de muestra y obtener información característica como el peso y algunas veces la estructura del analito.

La espectrometría de masas se fundamenta en la separación de partículas moleculares o atómicas por su diferente masa y carga. El proceso de la espectrometría de masas comprende básicamente cuatro etapas:

- Ionización de la muestra.
- Aceleración de los iones por un campo eléctrico.
- Dispersión de los iones según su masa/carga.
- Detección de los iones y producción de la correspondiente señal eléctrica.

La forma de ionización tradicional es el impacto de electrones, sin embargo, es un método de ionización muy fuerte y ocasiona que los fragmentos que se obtienen puedan generar reacciones químicas, por lo tanto no es aplicable a estructuras tan complejas como proteínas o ácidos nucleicos. Lo anterior impulsó la búsqueda de otras formas para ionizar este tipo de muestras y se logró diseñar métodos como ESI (ionización con electropulverización o electrospray), MALDI (ionización inducida por láser asistida por la matriz), entre otros, que permitieron observar espectros de masas macromoléculas y moléculas sensibles a descomposición.

En cuanto a los detectores usados, existe una gran variedad que brinda la posibilidad de ajustar el detector al método de ionización utilizada, y también a las características analíticas que se requieren, dentro de ellos encontramos sistemas TOF (tiempo de vuelo), LIT (trampa iónica lineal), Q (cuadrupolos), etc[35].

1.3.2.1. Método de Ionización Electrospray (ESI)

El electrospray es una forma de conversión de moléculas neutras a iones como consecuencia de la transferencia o remoción de una entidad cargada desde un agente ionizante, proceso que normalmente se realiza en fase gaseosa. En esencia el electrospray funciona de la siguiente manera, una solución del analito pasa a través de un capilar en donde existe un campo eléctrico de alta magnitud.

El efecto del campo eléctrico sobre la solución es generar una neblina cargada (debido a la transferencia de protones desde el agente ionizante), y cada gota de ella, es impulsada por un gradiente de potencial eléctrico hacia el analizador del espectrómetro. Durante esta transición el solvente se evapora u ocurre explosión coulombica (consecuencia de la repulsión de cargas), y a su vez se produce la subdivisión de las gotas. Finalmente, las gotas desolvatadas por completo llegan al detector y allí se registra la señal propia del analito. Por otra parte, ESI es una ionización realizada a presión atmosférica que se aplica a un amplio grupo de muestras y especialmente se utiliza para la caracterización de biomoléculas. El análisis por ESI, se puede hacer provocando una ionización positiva o negativa, seleccionando la polaridad de los iones que se desea analizar mediante el voltaje del capilar. Esto permite la obtención del ión molecular, y si se desea obtener una fragmentación, se puede inducir aumentando el voltaje en la punta del cono del capilar. Este proceso se utiliza con frecuencia en espectrometría de masas en tándem. La ESI de especies poliméricas proporciona espectros que contienen una serie de múltiples iones cargados del siguiente tipo: $[M+NH]^{n+}$ y $[M-NH]^{n-}$. En muchos casos se pueden determinar masas moleculares de macromoléculas con una precisión de $\pm 0,005\%$. En la figura 6 se muestra un esquema de ESI con un espectro de masa obtenido. Además, para los análisis de los espectros de masas, debe tenerse en cuenta un arreglo matemático basado en la ionización de las proteínas, el cual se conoce como algoritmos de deconvolución y es bastante sencillo: $m/z = (MW + NH^+)/n$ [36].

1.3.2.2. Analizadores de masas de Trampa Iónica (IT)

Es un analizador de masas ampliamente utilizado. Consta de un electrodo que constituye un anillo central y dos electrodos colectores. La separación de los iones se produce almacenando los iones en el espacio central y manipulando su movimiento en el tiempo, en lugar de hacerlo en el espacio. El campo se crea aplicando un sistema de radiofrecuencias al anillo central. Los iones del analito

procedentes de la fuente de ionización penetran a través de una rejilla en el electrodo colector y según su relación m/z y el campo aplicado, circulan en una órbita estable o se desestabilizan pasando al detector. Los instrumentos de IT se caracterizan por tener una elevada sensibilidad y obtener una rápida adquisición de datos. Sin embargo, los analizadores IT tienen una resolución limitada y una relativamente baja capacidad de atrapar iones, ello ha conducido al desarrollo del **analizador de trampa de iones lineal (LIT)** con elevada capacidad de atrapamiento de iones lo que ha mejorado el rango dinámico y la sensibilidad de esa técnica. El LIT ha desplazado al cuadrupolo clásico. Actualmente los instrumentos LIT disponen de elementos que les permiten mejorar la resolución [35].

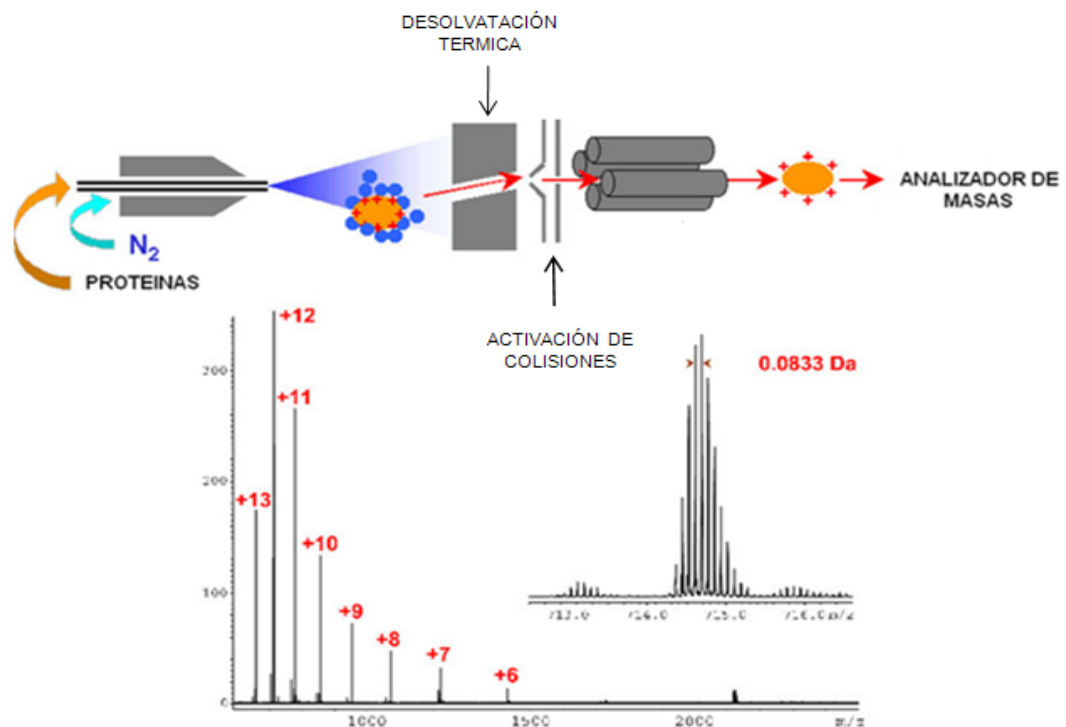


Fig. 6: Configuración de un sistema ESI y modelo espectro de masas obtenido para una proteína.

1.3.3. Western Blot (Inmunotransferencia)

El estudio de proteínas específicas en mezclas complejas ha sido facilitado por el método de Western Blotting. Este método tiene a favor su simplicidad, especificidad y sensibilidad. El Western Blotting es uno de los métodos que usa la especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo, para indicar la presencia de una proteína particular en la muestra. Esta técnica se caracteriza por la transferencia e inmovilización de mezclas complejas de proteínas que han sido separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida que contienen Sodio Dodecil Sulfato (SDS), a lo que se le conoce como SDS-PAGE. Las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa, nylon o PVDF. La membrana es probada con un anticuerpo que reconoce la proteína de interés. Comprende fundamentalmente 4 etapas: electroforesis unidimensional, transferencia, bloqueo y detección **[37]**.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. SELECCIÓN Y CLASIFICACIÓN DE MUESTRAS

2.1.1. Recolección de las muestras

Las muestras de pacientes con infarto agudo de miocardio y pacientes sanos tomados como controles fueron seleccionados de acuerdo con los criterios de inclusión establecidos en el macro-proyecto de COLCIENCIAS denominado “Identificación de marcadores derivados del péptido natriurético pro-B como predictores de mortalidad en pacientes con síndrome coronario agudo”, que anida esta investigación. Para los pacientes con Infarto agudo al miocardio sin aumento en el segmento ST del electrocardiograma (IAMSEST), los criterios de inclusión fueron: presencia de dolor precordial, electrocardiograma (EKG) sin elevación del segmento ST y marcadores bioquímicos elevados (Troponina > 0,1ng/ml). Los integrantes del grupo control, corresponden a aquellos pacientes sanos, previo examen físico para descartar cualquier patología cardiovascular y un EKG para verificar su estado (EKG normal). Las muestras de sangre fueron tomadas por un bacteriólogo, en tubos con Heparina (anticoagulante).

2.1.2. Grupos de estudio

Se realizó una selección de 6 pacientes tomando como parámetro principal la medida de NT-proBNP (fragmento N-terminal del proBNP). Se tomaron los pacientes con niveles más altos (las mediciones concentración de NT-proBNP se hicieron en el laboratorio clínico de la UIS usando un kit especializado). Además, se clasificaron en dos grupos de acuerdo al desenlace de cada uno, tras un seguimiento de 1 año. De igual modo se seleccionaron 3 controles, de género similar al grupo muestral (IAMSEST), (tabla 1).

Tabla 1: Grupos de estudio

GRUPOS DE ESTUDIO	DESCRIPCIÓN	N
Grupo 1	Pacientes con IAMSEST y sin complicaciones posteriores	3
Grupo 2	Pacientes IAMSEST y Defunción	3
Grupo 3	Controles	3

2.1.3. Medición de los Niveles de NT-proBNP

Dentro del marco de recolección de la muestras se realizó la medida de la concentración del NT-proBNP. Dicho procedimiento se realizó en el laboratorio clínico de la Universidad Industrial de Santander.

2.1.4. Almacenamiento y origen de las muestras

Las muestras de plasma de los pacientes con NSTEMI y los controles, fueron obtenidos del banco de muestras del laboratorio clínico de la Universidad Industrial de Santander, donde se almacenaron los plasmas de los pacientes con las características mencionadas anteriormente, y que fueron incluidos en el estudio de casos y controles que anida el presente proyecto de investigación.

2.2. OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL PLASMA

2.2.1. Obtención de las muestras de plasma

Las muestras de sangre de cada paciente fueron tomadas en tubos al vacío que contienen Heparina, procedimiento que realizó un bacteriólogo de acuerdo a las normas vigentes en el país. Luego, se centrifugaron a 4500g durante 5min, con temperatura de 20°C, usando una centrifuga IEC CL31R, con el objetivo de separar los componentes proteínico (plasma) y celular. Finalmente, se transfirió el plasma a tubos Eppendorf de 1.5 mL.

2.2.2. Cuantificación

La cuantificación de las proteínas de las muestras de plasma se realizó usando el método de Bradford [38]. En el ambiente ácido del reactivo, la proteína se une al colorante, Coomassie-G250. Esto resulta en un cambio espectral del tinte de rojizo/marrón (máximo de absorbancia a 465 nm) a la forma azul del tinte (máximo de absorbancia a 610 nm). La diferencia entre las dos formas de la tintura es mayor a 595 nm, por lo que es la óptima longitud de onda para medir el color del complejo proteína-colorante.

Para determinar la concentración de las muestras se preparó una curva de calibración utilizando albúmina de suero bovino como patrón (albumin fraction V from bovine serum, MERCK) y agua (tipo I) como blanco y medio de dilución. Se realizaron lecturas de absorbancia triplicadas en el equipo Elisa microplate reader, Biorad, para los patrones y las muestras (anexo a).

2.3. SEPARACIÓN DE PROTEINAS EN EL PLASMA

2.3.1. Separación de proteínas por cromatografía de Exclusión Molecular

La primera etapa de separación del BNP consistió en cromatografía de exclusión molecular, usando Sephadex G-25 y G-50 como fase estacionaria. El sistema de

cromografía usado fue Biologic LP de Biorad, con detector ultravioleta (280nm) y medidor de conductividad, acoplado a un colector de fracciones modelo 2128.

2.3.1.1. Preparación y empacado de Sephadex G-25 y G-50

Se preparó 1 L de una solución 0.15 M de NaCl y 0.01 M de Tris en H₂O destilada, ajustando el pH a 7.00 con HCl 1 N. Posteriormente se vertieron 20 g de Sephadex G-25 en 500 mL de la solución preparada y se agitó suavemente con una varilla vidrio durante 1 hora, después se dejó reposar toda la noche. Luego se eliminó el sobrenadante y se procedió a empacar la columna, vertiendo lentamente el gel en la columna a través de las paredes, evitando la formación de burbujas de aire al interior del gel. Para el caso del Sephadex G-50 se siguió la misma metodología.

2.3.1.2. Preparación fase móvil y equilibración de las columnas

Las fase móvil usada está compuesta por una búfer 130 mM de NaCl y 20 mM de Na₂HPO₄ en H₂O destilada y pH 7.00 ajustado con HCl 1 N. Para la etapa de equilibrio se acopló la columna al sistema Biologic LP (Biorad), y se le suministró un flujo de 0.5 mL/min durante aproximadamente 4 horas, tiempo que tarda la conductividad de la fase móvil en equilibrarse la columna.

2.3.1.3. Calibración de las columnas G-25 y G-50

Se prepararon 5mL de una solución de concentración 1 mg/mL de las siguientes proteínas: 1) Albúmina de suero de Bovino (BSA), 2) Citocromo C, 3) BNP (sintético). Estas fueron inyectadas en el sistema de exclusión molecular. Luego se registraron los volúmenes de elución con los cuales se calibró la columna, y se estableció en que volumen aproximadamente eluyen los péptidos de 1 a 5 KDa, rango óptimo de separación para Sephadex G-25. El mismo procedimiento se hizo

para el calibrado de la columna con Sephadex G-50, teniendo en cuenta que el rango de separación de esta columna es de 4 a 40 KDa.

2.3.1.4. Separación y recolección de fracciones

Se tomó un volumen de plasma para tener 50 mg de proteína de cada muestra seleccionada. Luego se diluyeron a 5mL con búfer 130 mM de NaCl y 20 mM de Na_2HPO_4 (Fase móvil). Esta dilución se inyectó en el sistema de exclusión molecular, con las siguientes condiciones: flujo 0.5 mL/min, columna con dimensiones 12 mm(d.i.) x 430 mm, usando la fase móvil mencionada antes y fase estacionaria Sephadex G-25. A continuación, se recogieron la fracción de proteínas en el rango óptimo de separación para la fase estacionaria usada. Las fracciones fueron posteriormente almacenadas en tubos Falcon de 15 mL a -20°C . Cada corrida tardó aproximadamente 300 min. En la separación con Sephadex G-50 las condiciones usadas fueron: flujo 0.5 mL/min, columnas 10 mm(d.i.) x 230 mm y como fase móvil la bufer 130 Mm de NaCl y 20 mM de Na_2HPO_4 . De igual modo, se recolectaron las fracciones en el rango de separación de la fase estacionaria usada y almacenaron en tubos falcon de 15 mL a -20°C . El tiempo de la corrida fue alrededor de 150min para cada muestra.

2.3.2. Separación de proteínas por HPLC en fase reversa (RP-HPLC)

La etapa posterior a la exclusión molecular consistió en RP-HPLC usando un equipo HPLC Agilent 1100, con brazo robótico e inyector automático. El detector usado consiste en arreglo de diodos (medición a 210 nm). Sin embargo, solo se trataron las fracciones originadas en la columna de Sephadex G-25.

2.3.2.1. Preparación de los patrones y muestras para RP-HPLC

Las soluciones de los patrones de BNP (BNP oxidado, con puente disulfuro y BNP reducido sin puente disulfuro) fueron sintetizadas utilizando la técnica síntesis en

fase sólida F-Moc [39], y donados por la Dra. Fanny Guzmán de la Universidad Católica de Valparaíso en Chile. Las soluciones patrones de péptidos se prepararon disolviendo 5mg de cada patrón en 1 mL de búfer 130mM de NaCl y 20 mM de Na₂HPO₄. Las fracciones provenientes de exclusión molecular (específicamente fueron concentradas usando arrastre de solvente con nitrógeno hasta un volumen final de 1mL. Por último se transfirieron 500 µL de cada muestra y patrón a viales para HPLC de 1.5 mL.

2.3.2.2. Preparación de fase móvil

Se prepararon dos fases móviles debido a que se realizó elución con gradiente, en este caso la fase móvil A, estuvo compuesta por H₂O y 0.001% de TFA (ácido trifluoroacético) y la fase móvil B, que se preparó con ACN (acetonitrilo) 60%, H₂O 40% y 0.001% de TFA. Estas soluciones se filtraron al vacío para eliminar cualquier residuo sólido. Todos los solventes usados fueron de grado HPLC.

2.3.2.3. Separación y recolección de fracciones

Las muestras fueron inyectadas en el sistema HPLC con columna C₃ y pre-columna. La columna se dejó equilibrar por un tiempo de 2 h, usando una mezcla 1:1 de las fases móviles A y B. Luego se inyectaron 40 µL de cada patrón y cada muestra. Los parámetros para la corrida cromatográfica fueron: gradiente de elución continuo iniciando con un 100% de solución A e incrementado el porcentaje de solución B hasta el 100% común tiempo de corrida 100min, temperatura ambiente y detectados a 210 nm. Luego se recogieron en tubos eppendorf de 1.5 mL las fracciones de muestras correspondientes a los picos que registraron tiempos de retención similares a los picos de los patrones.

2.4. IDENTIFICACION DEL BNP (formas de bajo peso molecular)

2.4.1. Identificación por Espectrometría de masas (MS)

La identificación del BNP en las fracciones provenientes de la RP-HPLC se realizó por espectrometría de masas en un equipo Bruker Daltonics con sistema de ionización electrospray y analizador de masas de trampa iónica lineal de baja resolución (ESI-LIT).

2.4.1.1. Preparación de muestras y análisis en MS

Las muestras se prepararon adicionando a cada fracción Acido Fórmico hasta el 1%. Esta mezcla se realizó en viales de vidrio de 2.0 mL. Después se inyectaron 200 µL de muestra en el equipo de Ms de forma manual, y el análisis se hizo bajo los siguientes parámetros: gas auxiliar nitrógeno, voltaje de capilar +4 KV y temperatura 280 °C. Los espectros se tomaron en modo positivo.

2.4.1.2. Análisis de espectros de masas

Los espectros obtenidos fueron analizados a través del programa ORIGIN. Con este programa los espectros son guardados como un conjunto de puntos (x,y). De esta forma, el programa a través de un conjunto de algoritmos reconstruye los espectros, permitiendo análisis posteriores. Finalmente, se calculó el peso molecular de los péptidos presentes en las muestras tomando como principio el algoritmo de deconvolución, lo cual se realizó con el programa ORIGIN.

2.5. IDENTIFICACION DEL BNP (Formas de alto peso molecular)

2.5.1. Western Blotting

2.5.1.1. Electroforesis de proteínas

Las fracciones colectadas de la columna de Sephadex G-50 se mezclaron con buffer de carga, y se tomaron en total 5 mg de proteína de cada muestra. Luego se sembraron en un gel de poliacrilamida al 12% con dimensiones 11x7 cm (SDS-PAGE) 20 µL de cada una de las mezclas y 5 µL del marcador de peso molecular preteñido. Luego el gel fue puesto en una cámara sumergiéndola en un buffer de corrida. La unidad se conectó a la fuente de poder y la corrida electroforética se realizó con los siguientes parámetros: voltaje constante de 120 V, corriente de 0.05 A y 1 h de corrida (Ver anexo b).

2.5.1.2. Inmunotransferencia

Este procedimiento se realizó cortando una pieza de membrana de polivinilsulfona (PVF) marca Biorad de las mismas dimensiones del gel, y que se humedeció con metanol durante unos segundos, para después introducirlo en agua. Pasados 5min se puso en buffer de transferencia durante 20 min. Luego se empacó el cassette del blotting de tal modo que el gel quedó en contacto con la membrana. A continuación el cassette se introdujo en la unidad de electrotransferencia sumergido en buffer de transferencia. El procedimiento se realizó bajo las siguientes condiciones: 100 V, agitación, refrigeración y 1h de transferencia. Finalmente la membrana se dejó en solución de bloqueo toda la noche, con el fin de evitar la interferencia de otras proteínas (anexo b).

2.5.1.3. Reacción antígeno-anticuerpo

Luego de culminar el tiempo de bloque, se lavó la membrana en solución de lavados. Luego se puso en incubación la membrana con el anticuerpo contra el BNP. Luego de la incubación, se volvió a lavar el gel, y se incubó la membrana ahora con el anti-anticuerpo (IgG-fosfatasa alcalina). Finalmente, se reveló la membrana usando los sustratos adecuados, NTB y BCIP. La membrana se

fotografió con una cámara digital y la imagen se analizó mediante el software Quantity One (anexo b).

2.5.1.4. Análisis de imágenes

Los análisis de imágenes fueron hechos a través de Quantity One (Biorad). Este programa detecta las diferentes bandas comparando la intensidad densiométrica de cada punto en la imagen. Luego se indicó el carril de marcadores de peso molecular. De esta manera, el programa brinda de acuerdo con la ubicación de la banda en el gel un valor aproximado de la masa molecular de la proteína. Además, se calculó la intensidad relativa de las bandas detectadas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE LOS PACIENTES SELECCIONADOS

Tabla 2: Características de los pacientes seleccionados y valores de la medición de los niveles de NT-proBNP

Código Seroteca	Grupo	Edad	Concentración proteínas (mg/mL)	Niveles NT-proBNP (pg/mL)
MS063	1	60	98.12	35000
MAN93	1	75	96.89	28700
AE032	1	57	96.45	>35000
CEP041	2	79	102.65	35000
FDC078	2	75	98.34	21340
RCA015	2	59	101.4	27302
C02	3	60	90.45	188
C07	3	76	92.34	238
C73	3	70	94.78	176

La medición de los niveles de NT-proBNP presentados en la tabla 2 muestra que existe un incremento significativo de la expresión del BNP en personas con IAMSEST. La prueba ANOVA realizada, donde $F < F_{cal}$, indica a un grupo con diferencias estadísticamente representativas respecto a la media. Tal evento es producto de toda la sintomatología presentada en un infarto (IAMSEST), donde el corazón como consecuencia de la isquemia celular sobre-expresa la hormona para regular procesos de reparación del miocardio. Este comportamiento es la razón por la cual el BNP es considerado como un biomarcador cardiaco [14, 25, 40].

Tabla 3: Tabla ANOVA para los grupos de estudio tomando como parámetro los niveles de NT-proBNP medidos para cada paciente.

FUENTE	SUMAS DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F
Entre grupos	2896760489	2	1448380244	$F_{cal}=72.26$
Dentro de los grupos	93800082.67	6	20043707.56	
Total	1886140264	8	235767533	
$F_{tab}=4.737$ ($\alpha=0.05$, 2, 6, 1 cola)				

3.2. CALIBRACIÓN DE LAS COLUMNAS DE SEPHADEX G-25 Y G-50

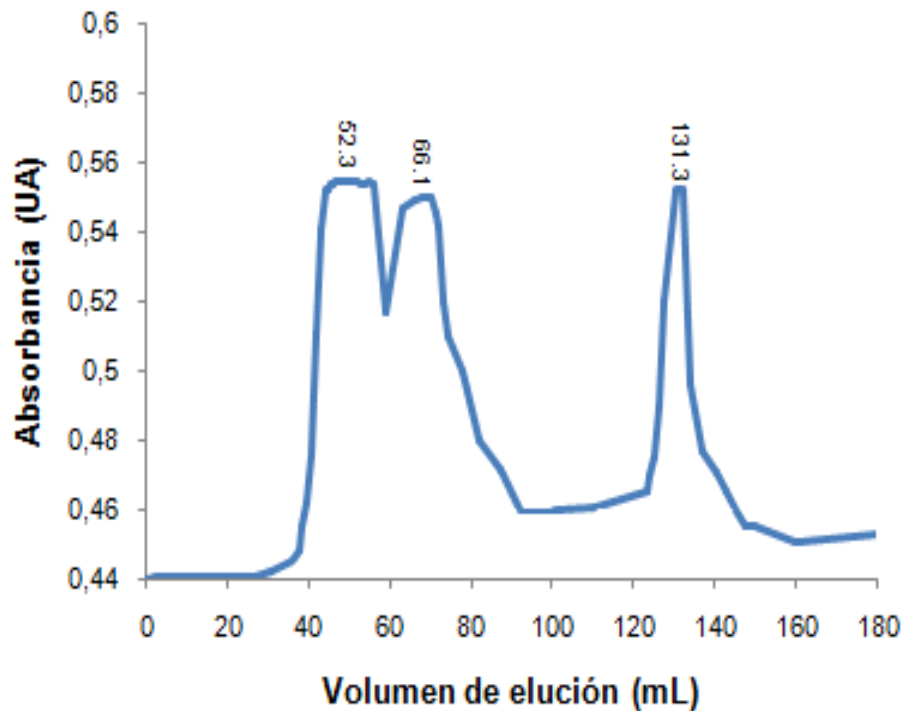


Fig. 7: Separación de mezcla de patrones de proteínas en la columna de exclusión molecular elaborada con Sephadex G-25.

EN la Figura 7 se muestra el cromatograma de la calibración de la columna elaborada con Sephadex usando una mezcla de Albúmina de suero bovino (BSA), Citocromo C y BNP-32 sintético.

Debido a que el rango óptimo de separación de la fase estacionaria usada se encuentra establecido desde 1 KDa a 5 KDa [43], entonces es lógico observar el solapamiento de las señales generadas por las proteínas con masa molecular mayor al límite superior de este rango. Por lo tanto, sólo fue posible resolver eficientemente el BNP-32 sintético con un volumen de elución de 131 mL [32].

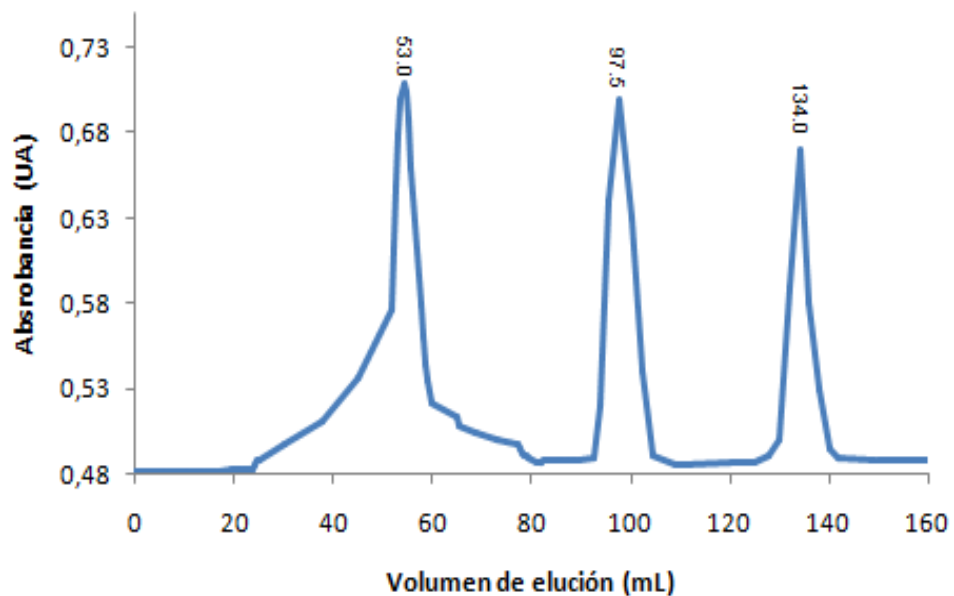


Fig. 8: Separación de mezcla de patrones de proteínas en la columna de exclusión molecular elaborada con Sephadex G-50.

Por otra parte, en la calibración de la columna elaborada con Sephadex G-50 se observaron tres picos bien definidos, como se observa en la figura 8. Estos picos corresponden a cada una de las proteínas usadas como patrones de calibración. El perfil de elución indica que la BSA se ubica fuera del rango de separación del Sephadex G-50, por lo que eluye en primer lugar, mientras que el Citocromo C y el BNP-32, que pueden ingresar a los poros de la fase estacionaria, muestran volúmenes de elución en función a su tamaño molecular [44].

3.3. ESTUDIO DE MOTIVOS DE BAJO PESOS MOLECULAR DEL BNP

3.3.1. Análisis de las separaciones obtenidas usando Sephadex G-25

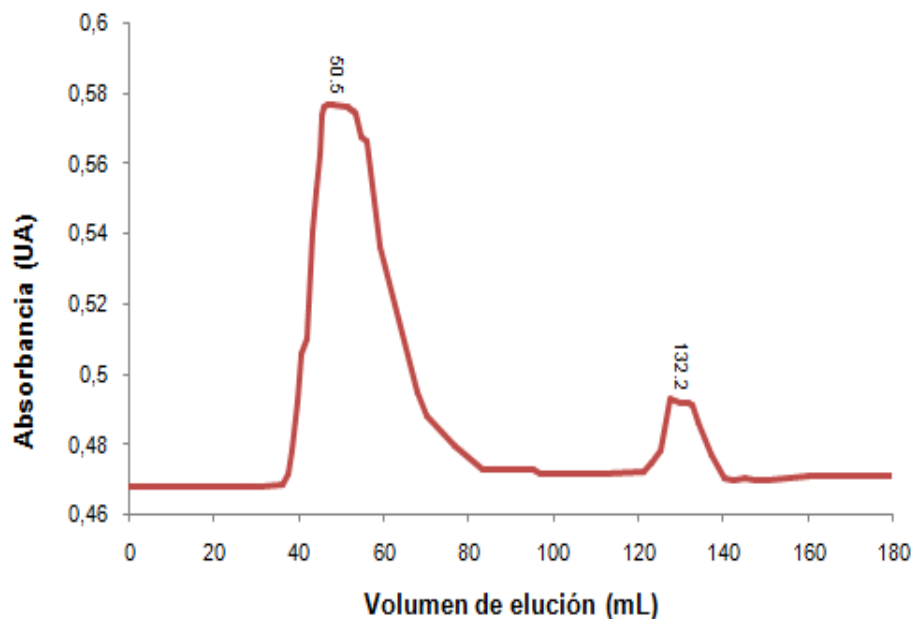


Fig. 9: Cromatograma de exclusión molecular para el plasma de paciente con IAMSEST y disfunción posterior (paciente CEP041) usando columna de Sephadex G-25.

Debido a que el plasma contiene una gran cantidad de proteínas, es complicado separar completamente las proteínas presentes en esta muestra mediante esta técnica de purificación cromatográfica. Sin embargo, es posible separar dos poblaciones de proteínas mediante la cromatografía de exclusión molecular con Sephadex G-25 (Ver figura 9). La primera población de proteínas eluyó a un volumen de exclusión similar a la BSA, y el siguiente se ubica en la región de elución que exhibió el BNP-32 sintético. [43].

No obstante, la complejidad de la muestra no permitió obtener una buena resolución de las proteínas en el rango de separación para esta fase móvil [45]. Esto ocurre porque a medida que estas pequeñas proteínas se desplazan por la columna la proximidad entre los pesos moleculares y el número de proteínas presentes promueven su aglomeración eluyendo a volúmenes bastante parecidos. Además, debe tenerse en cuenta, que por el tamaño y complejidad de la

estructura de las proteínas, estas muestran interacciones de varios tipos, lo que también es un factor que dificulta la separación [32, 46].

Otro punto importante es la forma y tamaño de los picos. La forma puede entenderse de acuerdo a los fundamentos de la cromatografía [30]. Sin embargo, el tamaño de los picos, específicamente su área, es una medida proporcional a la cantidad de analítico eluído en ese pico cromatográfico [28]. Por esta razón, las diferencias en tamaño entre los picos registrados son fácilmente entendibles si se considera el hecho de que la albúmina corresponde al componente proteínico más abundante en el plasma, que otras proteínas de masa molecular elevada también presentan una alta concentración plasmática, y que sólo 22 proteínas conforman alrededor del 99% de del componente proteínico total del plasma [47, 48].

En los 2 cromatogramas de la figura 10 se refleja el perfil de separación que exhiben las muestras de plasma tras la cromatografía de permeación en gel (anexo C). Todos los cromatogramas tienen la misma apariencia, y los volúmenes de elución de los picos registrados son bastante cercanos.

En la tabla 5 se exponen los valores promedio de los volúmenes de elución expresados con su respectiva desviación estándar, lo que representa menos del 2% de los promedios calculados. Lo anterior muestra una buena reproducibilidad del método usado [47].

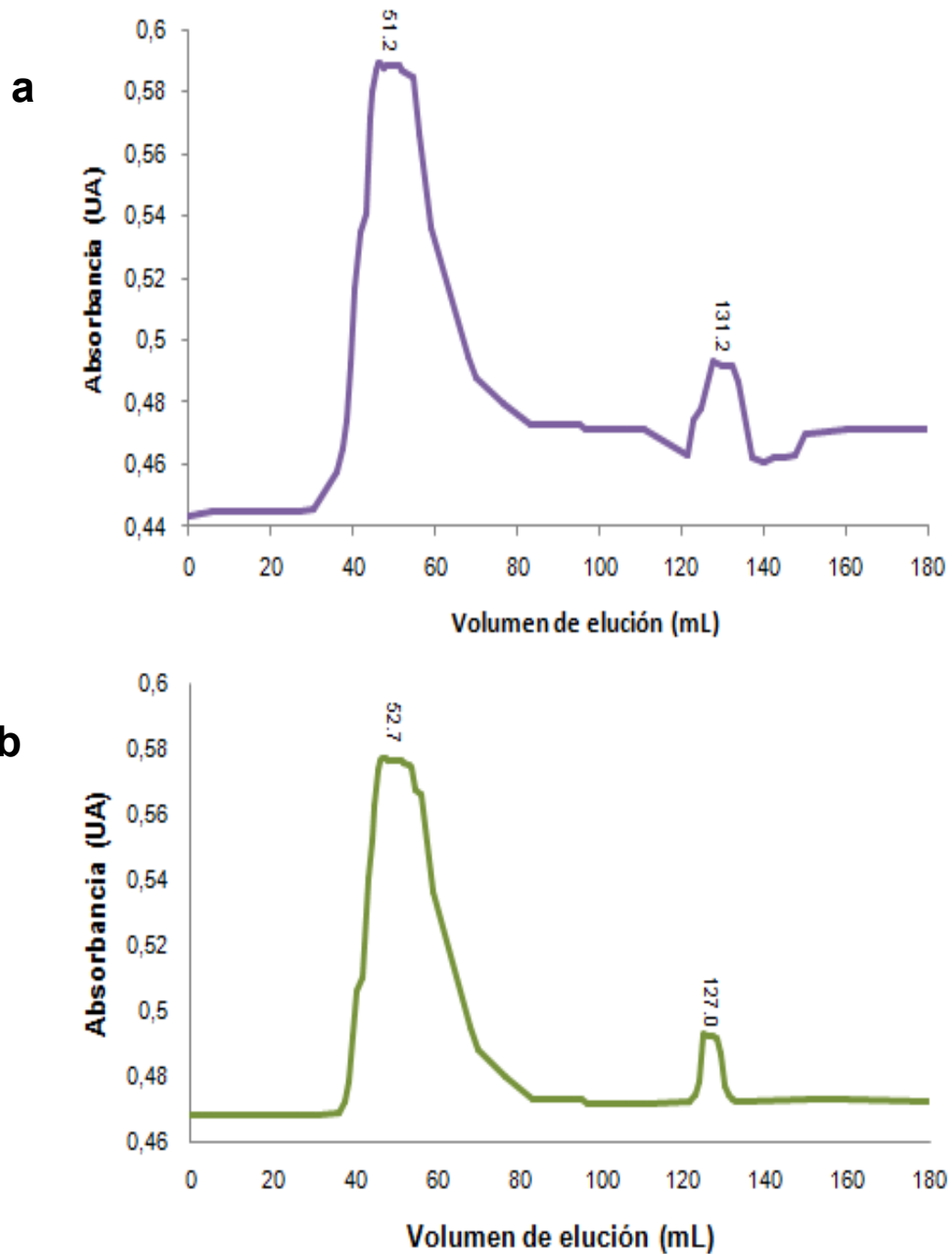


Fig. 10: Cromatogramas obtenidos en exclusión molecular. a) Cromatograma de la muestra MS063. b) Cromatograma de la muestra C02

Tabla 4: Resultados para la exclusión molecular con Sephadex G-25 de las muestras estudiadas.

MUESTRA	VOLUMEN ELUCIÓN PICO A (mL)	VOLUMEN ELUCIÓN PICO B (mL)
MS063	51.2	132.4
MAN93	52.3	133.2
AE032	50.9	132.3
CEP041	50.5	132.2
FDC078	51.8	131.0
RCAO15	52.3	129.0
C02	52.7	127.0
C07	51.4	132.0
C73	52.8	131.4
Promedio \pm d.e.*	51.8 \pm 0.8	131.1 \pm 1.9

*d.e. = desviación estándar

3.3.2. Análisis de la Separación por RP-HPLC

3.3.2.1. RP-HPLC para los patrones de BNP-32

En la Figura 11 se muestran los resultados obtenidos en la fase de RP-HPLC para los patrones utilizados, es decir, BNP-32 tratado con dimetilsulfoxido (con puente disulfuro, patrón A) y BNP-32 sin dicho tratamiento (sin puente de cisteína, patrón B). En el cromatograma para el patrón de BNP-32 tratado con agente oxidante se observan dos picos cromatográficos, con tiempos de retención de 72.2min y 76.9min, respectivamente. Esto indica que el péptido no se encuentra totalmente en su forma cerrada, lo que a la vez muestra la presencia de una estructura diferente que genera alguna de las dos señales. Sin embargo, el cromatograma patrón B registró un solo pico que se ubica en 72.2 min. Esto nos sugiere que el primer pico de elución en el patrón A se debe a que con el tratamiento de

oxidación no todo el BNP adquiere la estructura de anillo a través de la formación del puente de Cisteína [29].

Por otra parte, se observó que el BNP-32 sin anillo (no cilado) presenta menor tiempo de elución, teniendo en cuenta en este caso que los analitos se retienen en la columna de fase reversa (Zorbax C₃) de acuerdo con las interacciones hidrofóbicas establecidas con la ella [50]. Es evidente que la estructura con puente disulfuro es capaz de establecer más interacciones de este tipo, lo que es coherente con el hecho de que la formación del anillo permite incrementar la hidrofobicidad de la estructura. Una explicación para este fenómeno es la reducción de la cantidad de residuos hidrofílicos expuestos, (por ejemplo el grupo SH de las cisteínas ha desaparecido) [51].

3.2.2.2. RP-HPLC de las muestras de plasma

Las fracciones recolectadas durante la exclusión molecular (usando Sephadex G-25) se inyectaron en el sistema de RP-HPLC. Los perfiles de separación en esta etapa presentaron diferencias comparando un grupo con otro. La principal observación es que las muestras de pacientes del grupo 1 y 2, que son respectivamente pacientes con IAMSEST sin complicaciones posteriores y fallecidos, registraron un pico bien definido en un tiempo semejante al pico en el cromatograma del patrón B. De igual forma, se detectó una señal alrededor del tiempo de retención para el patrón del BNP-32 con anillo, tal como se indica en la figuras 12 y 13. No obstante, el grupo 3 (grupo control) no presentó en los cromatogramas picos definidos para la señal del patrón B. En contraste, se exhibió señal para el patrón A (pico del BNP-32 oxidado), tal como se muestra en la figura 14 (anexo d) [50].

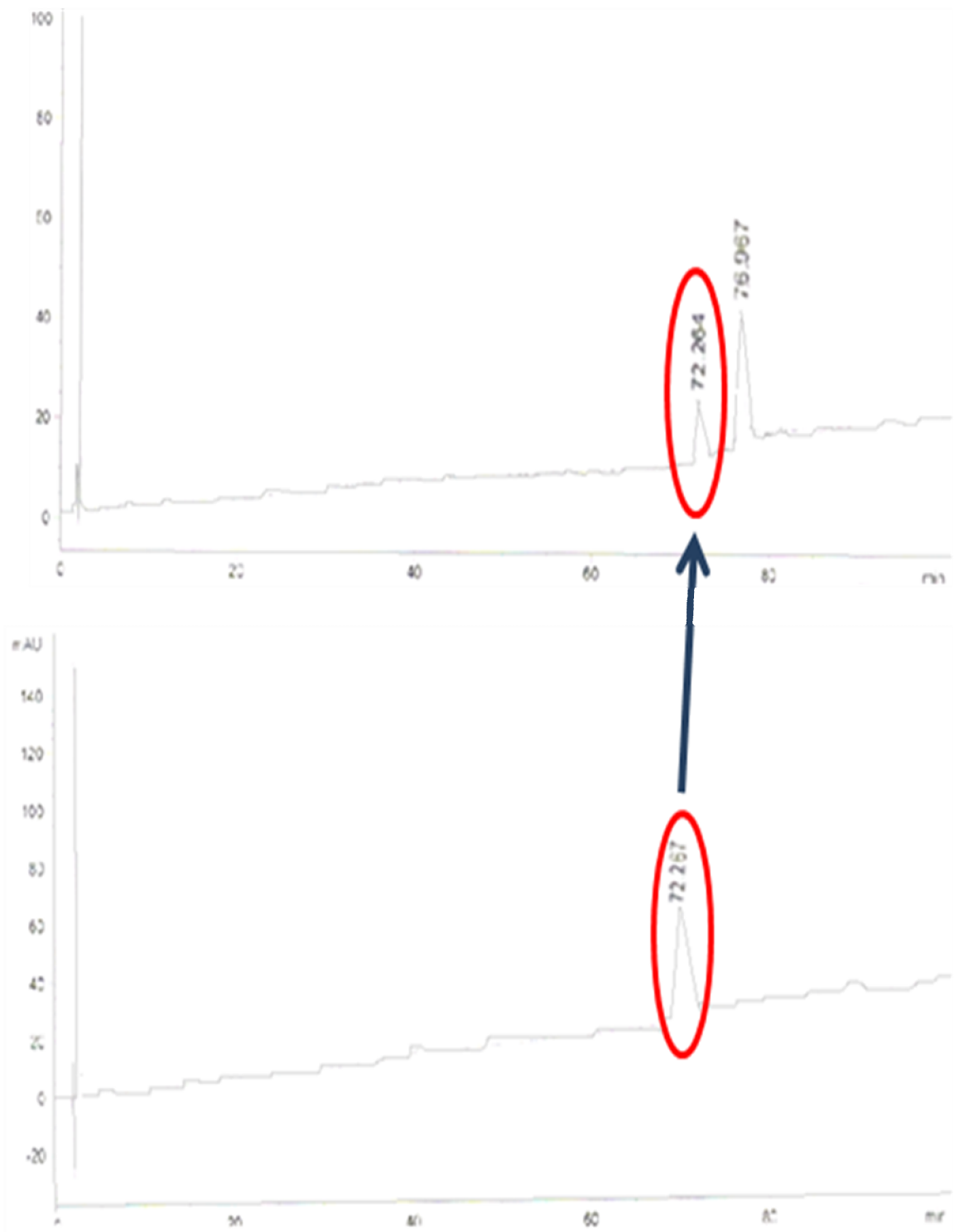


Fig. 11: Cromatogramas de los patrones de BNP-32 en la parte superior el patrón A, y en la parte inferior el patrón B.

3.2.2.2. RP-HPLC de las muestras de plasma

Las fracciones recolectadas durante la exclusión molecular (usando Sephadex G-25) se inyectaron en el sistema de RP-HPLC. Los perfiles de separación en esta etapa presentaron diferencias comparando un grupo con otro. La principal observación es que las muestras de pacientes del grupo 1 y 2, que son respectivamente pacientes con IAMSEST sin complicaciones posteriores y fallecidos, registraron un pico bien definido en un tiempo semejante al pico en el cromatograma del patrón B. De igual forma, se detectó una señal alrededor del tiempo de retención para el patrón del BNP-32 con anillo, tal como se indica en la figuras 12 y 13. No obstante, el grupo 3 (grupo control) no presentó en los cromatogramas picos definidos para la señal del patrón B. En contraste, se exhibió señal para el patrón A (pico del BNP-32 oxidado), tal como se muestra en la figura 14 (anexo d) [50].

Se observaron también otras señales en cada muestra, algunas comunes para todas, y en otros casos señales propias de cada muestra. Esto es producto de la heterogeneidad proteínica del plasma, ya que en un momento particular las proteínas expresadas para un organismo difieren sustancialmente de las de otro, estableciendo un proteoma propio de cada individuo, y especialmente en el plasma, que constituye la mayor fuente de información genética y proteínica en humanos [13].

Lo anterior permite suponer que los picos detectados corresponden a los distintos PNs circulantes en la sangre, especialmente en los pacientes con IAMSEST, donde se incrementa la expresión del ANP producto de los cambios fisiológicos originados por la patología [18]. Otra razón para este incremento, es el hecho de que los miocitos auriculares, que son las células más afectadas por la isquemia consecuente al evento coronario, generen una sobreexpresión el ANP para activar procesos de recuperación del corazón, de forma muy similar a lo que ocurre con el BNP [52].

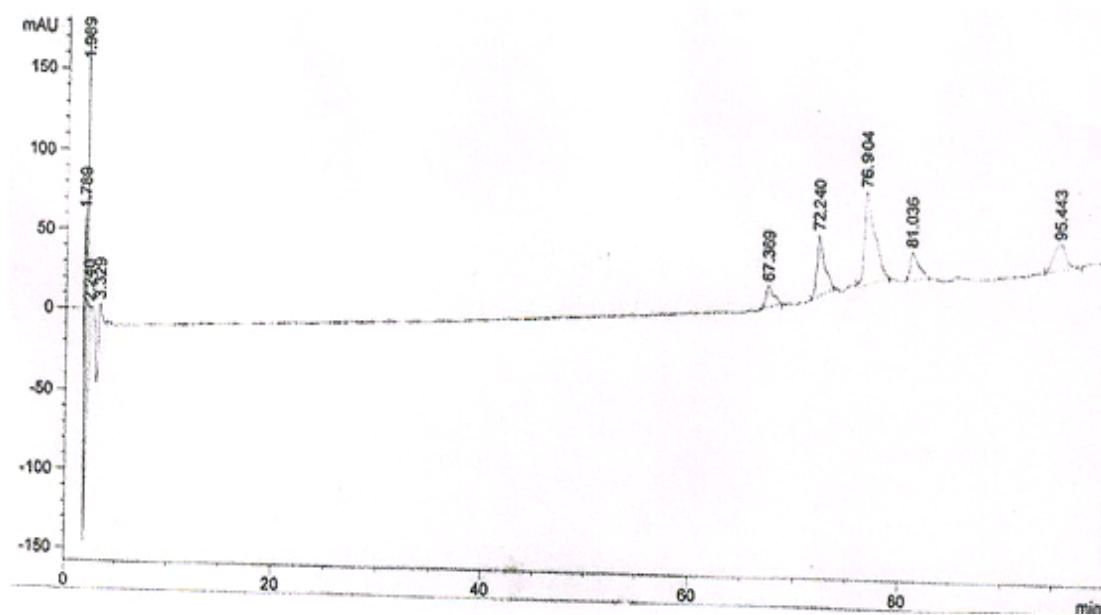


Fig. 12: Cromatograma de RP-HPLC para la fracción de exclusión molecular de la muestra MS063 (grupo 1).

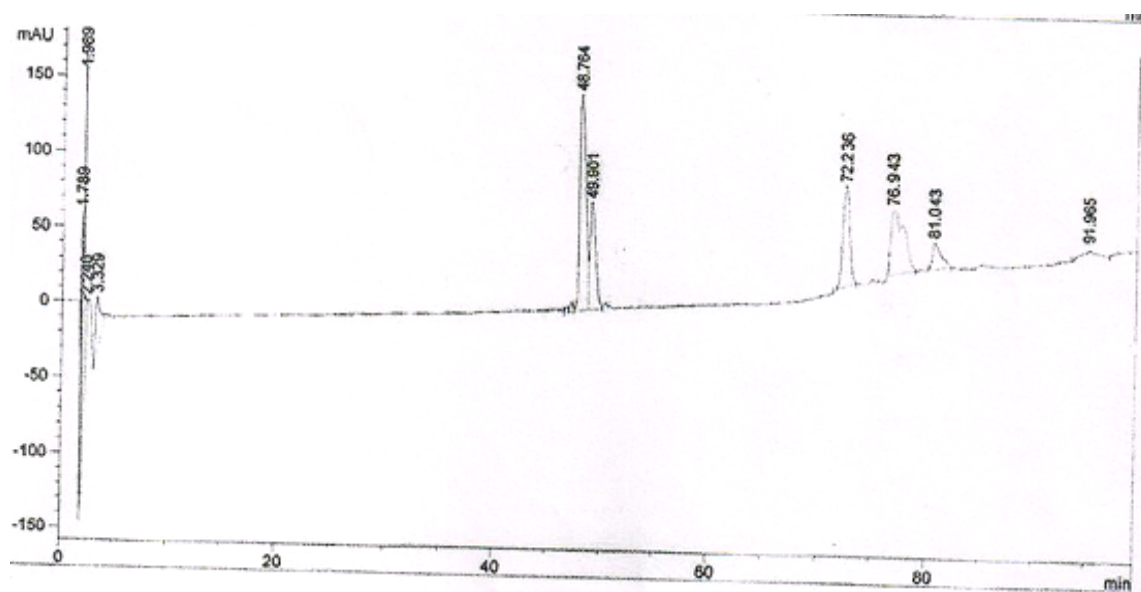


Fig 13: Cromatograma de RP-HPLC para la fracción de exclusión molecular de la muestra CPE041 (grupo 2).

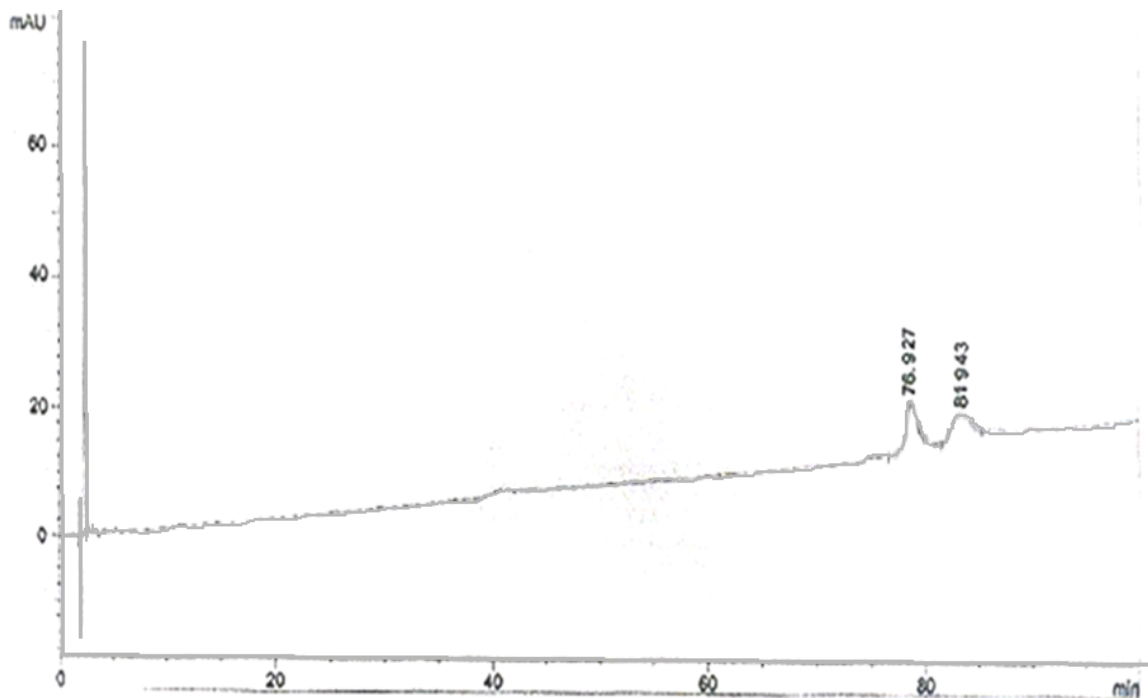


Fig. 14: Cromatograma de RPLC para la fracción de exclusión molecular de la muestra CPE041 (grupo 2).

De la misma manera algún pico de los encontrados en las muestras podría corresponder al CNP, que es el uno de los PNs más conocidos. Esto ocurriría como consecuencia de que los niveles de expresión del CNP se incrementan con patologías de tipo cardíaco. Sin embargo, al no ser una hormona cardíaca, no existe una relación clara entre su concentración plasmática y los SCA [17].

3.3.3. Identificación por ESI-LIT

Durante la etapa de RP-HPLC se colectaron las fracciones correspondientes a los picos con tiempos de retención similares a los que presentaron por los patrones A y B, cuyo destino fue la identificación a través de MS. En el caso de los pacientes se recogieron dos fracciones, y para los controles solo una fracción, tal como se indica en la figura 15.

En la muestra MS063, la primera fracción mostró el espectro de masas de la figura 16, donde se exhibe varios picos representativos para el análisis por el algoritmo de deconvolución [35]. La señal mas definida se encuentra en m/z 1733.21, que sería un $[M+2H]^{+2}$ (como lo indica la deconvolución), lo cual nos da una masa molecular de 3464.42Da, que es una muy cercana a 3464.7Da, que es la masa reportada en la literatura para el BNP [53].

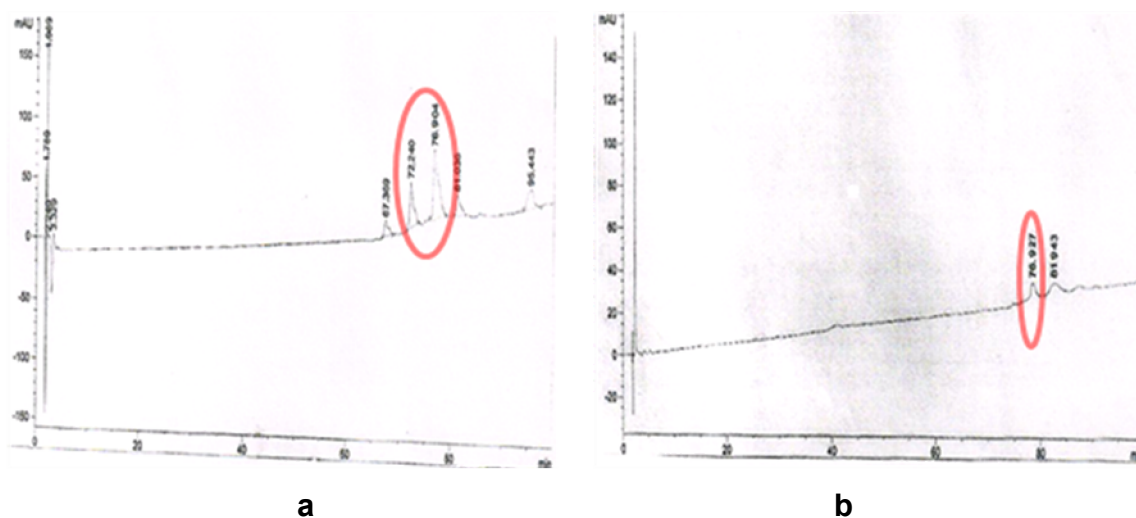


Fig. 15: Cromatogramas RP-HPLC, en rojo señales de las fracciones colectadas. a) Cromatograma muestra MS063. B) Cromatograma muestra C02.

Además de la señal mencionada, se detectó también un pico en 3465.43 que de acuerdo a la deconvolución corresponde al $[M+H]^{+1}$. Esta masa indica que efectivamente la muestra analizada contiene el BNP-32 en su forma abierta (sin puente disulfuro). En general, los pacientes de los grupos 1 y 2 mostraron que esta estructura hace parte de la heterogeneidad del BNP circulante en el plasma de personas con IAMSEST, variedad que ha sido ampliamente estudiada y por la que muchos mecanismos en donde el BNP se encuentra implicado aún no son claramente entendidos [54].

Las señales como 3285.63, que no hacen parte de la distribución de la proteína se originan como consecuencia de que la masa molecular de la proteína esta por debajo de 5KDa, y su concentración en la muestra es muy baja, esto da lugar a la aparición de señales contaminantes presentes en la muestra (por ej. del polimero del tubo de almacenamiento de la muestra) [52]. No obstante, en los analisis para contrarrestar este fenomeno se restó un blanco de que solo contenia el solvente, lo cual mejoró la información brindada por el espectro de masas.

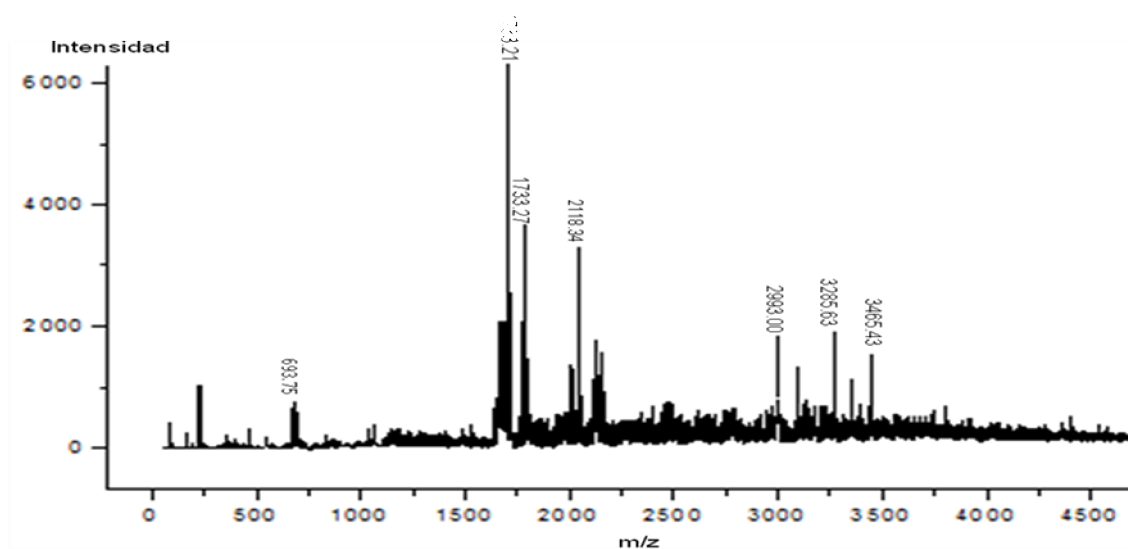


Fig. 16: Espectro de masa para la fracción 1 colectada en RPLC de la muestra MS063.

No obstante durante el análisis de los espectros de masas de la segunda fracción proveniente de RP-HPLC para la muestra MS063, se esperaba obtener una masa alrededor de 2 unidades menor que en la primera fracción, pero el espectro de la figura 17 muestran un peso de 3225.56 (calculado desde m/z 1613.78, 1071.27 y 805.06 que son $[M+2H]^{+2}$, $[M+3H]^{+3}$ y $[M+3H]^{+3}$ respectivamente), que no corresponde a la masa del BNP-32 con puente disulfuro, que es alrededor de 3462.61Da. Este hecho indicaría la presencia del anillo del puente disulfuro en la proteína. En otros casos se ha mostrado la dificultad para ionizar péptidos de este tipo ya que con la estructura de anillo se encuentran menos expuestos los sitios

de ionización (a través de ESI), y por esta razón no se obtuvieron las masas moleculares teóricas para las muestras analizadas [55]. En el patrón de BNP-32 con anillo, la única señal observada es un m/z de 1611.23. La deconvolución indica que es un $[M+H]^+$. En consecuencia, la masa del péptido sería 1610.23, lo que no tendría sentido. Sin embargo, si se considera que este pico corresponde realmente a un $[M+2H]^+$, la masa para la proteína sería 3220.46, que es muy próxima a la masa calculada en la muestra. Esto prueba el comportamiento anormal de los péptidos con puentes de Cisteína, e indica que la identidad estructural del analito en la muestra sea la misma del patrón, es decir, que la fracción analizada contenga el BNP-32 con puente disulfuro.

De manera global, las fracciones colectadas en las muestras de pacientes de los grupos 1 y 2 mostraron la misma dificultad para establecer el peso, registrando pesos menores que los esperados. Este hecho se repitió en el análisis de las muestras del grupo 3 (grupo control), tal como se observa en el espectro de masa de la figura 8, que registra un m/z de 1674.15 que de acuerdo a la deconvolución representa un $[M+2H]^+$. Esto permite calcular la masa de la proteína obteniendo 3346.3Da, las dos señales siguientes, 116.43 y 836.96, corresponden respectivamente a $[M+2H]^+$ y $[M+2H]^+$ [36].

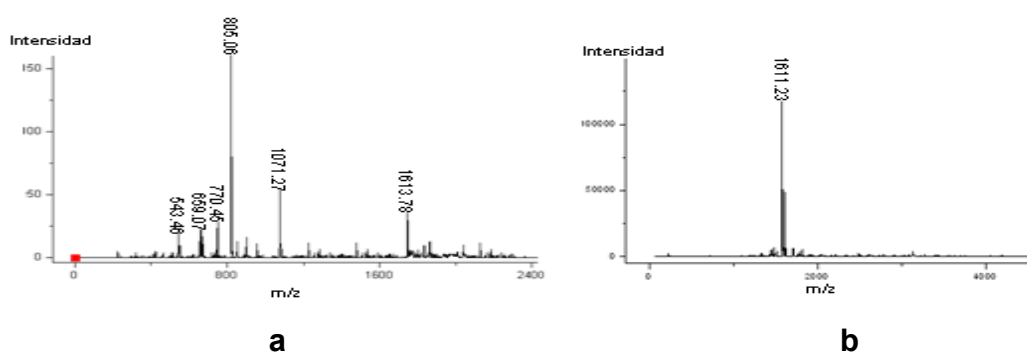


Fig. 17: Espectros de masa. A) Fracción 2 colectada en RPLC de la muestra MS063. B) Patrón de BNP-32 tratado con dimetilsulfoxido.

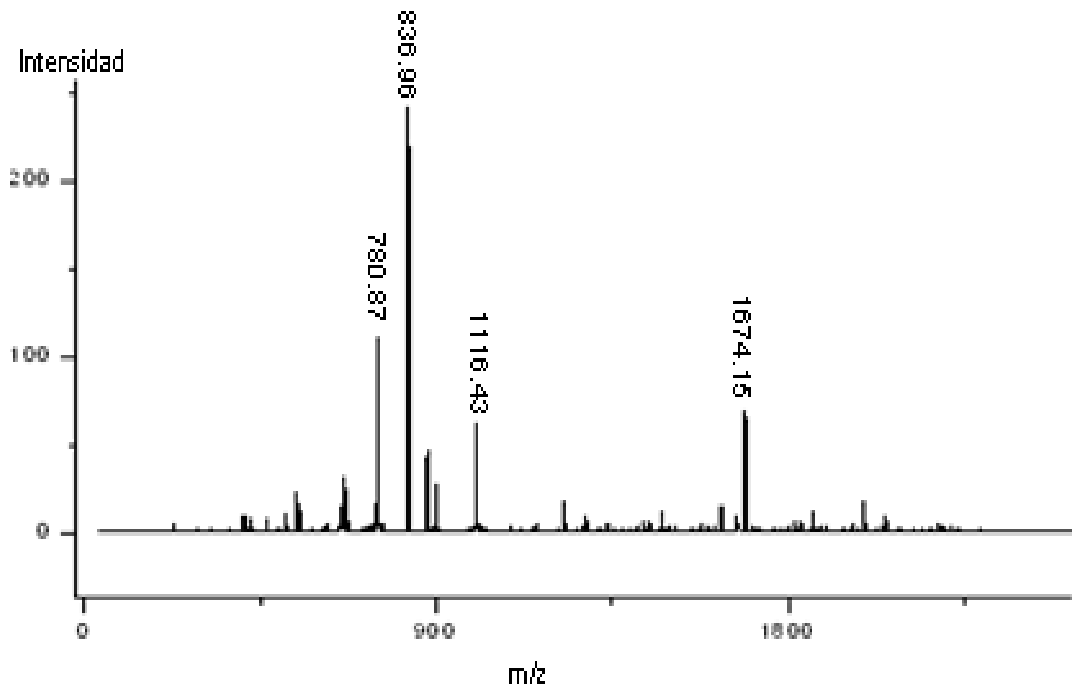


Fig. 18: Espectro de masa para la fracción 1 colectada en RPLC de la muestra C02.

3.3.4. Perspectiva bioquímica de los resultados

Los estudios previos han advertido la heterogeneidad del BNP circulante, pero estos hacen referencia a como se han encontrado motivos de la proteína en pesos moleculares diferentes [20, 22, 23, 54]. Sin embargo, dicha variedad no explica como los incrementos de la hormona están relacionados con la gravedad de la patología coronaria. En este sentido, si existe un caso de infarto agudo a miocardio, donde existe una sobreexpresión de la proteína, no se ha asociado el incremento del BNP con las consecuencias que genera la patología [18].

Dado que el BNP-32 debe unirse a su receptor para cumplir su función biológica, y dicha interacción está íntimamente vinculada con la presencia del anillo de 17 aminoácidos en su estructura [17, 18, 55], la desaparición de este anillo impide su enlace al NPR1. Por lo tanto, una estructura sin puente disulfuro, como la encontrada en el plasma de las personas con IAMSEST, pacientes de los grupos 1

y 2, explicarían el incremento en los niveles expresión de la hormona en plasma, lo cual no implica que puedan llevarse a cabo los procesos en los que participa, (vasodilatación, diuresis, natriuresis, entre otros) [15].

Asimismo, teniendo en cuenta que el BNP-32 se encuentra relacionado con procesos de protección vascular [58], los resultados sugieren que la producción de isoformas biológicamente inactivas (BNP-32 sin anillo de Cisteína), ocasiona que estos procesos sean inhibidos y por ende las personas que expresan la hormona en su forma abierta son más susceptibles a la formación de la placa aterosclerótica y los problemas coronarios [6, 8].

En términos de la síntesis de la hormona, es claro que esta se hace en la células cardíacas [17, 18], pero no es posible saber en qué punto de este proceso ocurre el error en la construcción de la estructura (no formación del puente de Cisteína). Aunque lo más probable es que sea antes de la secreción a la sangre [54].

Por otra parte, en cuanto a la degradación del BNP, los niveles que encuentran en el plasma de pacientes de los grupos 1 y 2 muestran que una consecuencia de la ausencia del puente de disulfuro en una de las formas circulantes del BNP identificadas es que no ocurre la unión al NPRC, por lo que los niveles de la hormona permanecen elevados [18, 56].

En cuanto a la estructura de forma cerrada que también se identificó en este estudio, es lógico encontrar el péptido en esta forma en el plasma, dado que es la estructura que posee actividad biológica, y de esta forma, en ausencia de alguna patología, el péptido debe expresarse correctamente [16, 17, 18].

Lo más importante a nivel bioquímico de los resultados encontrados es observar la diferencia de expresión del BNP en pacientes con IAMSEST (grupos 1 y 2) y

personas sanas (grupo 3), lo que fortalece las evidencias que han promovido el uso de esta hormona peptídica como un marcador de daño cardíaco [40-42].

3.4. ESTUDIO DE FORMAS DE ALTO PESO MOLECULAR DEL BNP

3.4.1. Análisis de la separación con Sephadex G-50

La separación de las muestras de plasma a través de la columna de Sephadex G-50 mostró un perfil similar a las separaciones realizadas con Sephadex G-25. Sin embargo, se logró la remoción de proteínas por encima de 40 KDa. Esto permitió analizar las muestras sin presencia de albúmina u inmunoglobulinas, que interfieren en los análisis por su alta concentración en el plasma [58].

En la figura 19 se muestra un cromatograma de la muestra MS063. En ella se observan dos picos definidos. El primero contiene proteínas de masas moleculares ≥ 40 KDa, con un tiempo de elución es muy próximo al del BSA. Sin embargo, el siguiente pico muestra un volumen de elución próximo al Citocromo C, que indica que este pico contiene proteínas por debajo de 40KDa, razón por la cual fue la fracción de interés [46].

La tabla 6 indica los volúmenes de elución para los picos registrados para cada muestra. Se puede observar que no existen muchas diferencias entre los tiempos de los volúmenes medios de elución. Las proteínas eluyeron de manera similar a los resultados observados en la columna Sephadex G-25, de modo que los ensayos en esta columna también mostraron reproducibilidad (anexo e) [49].

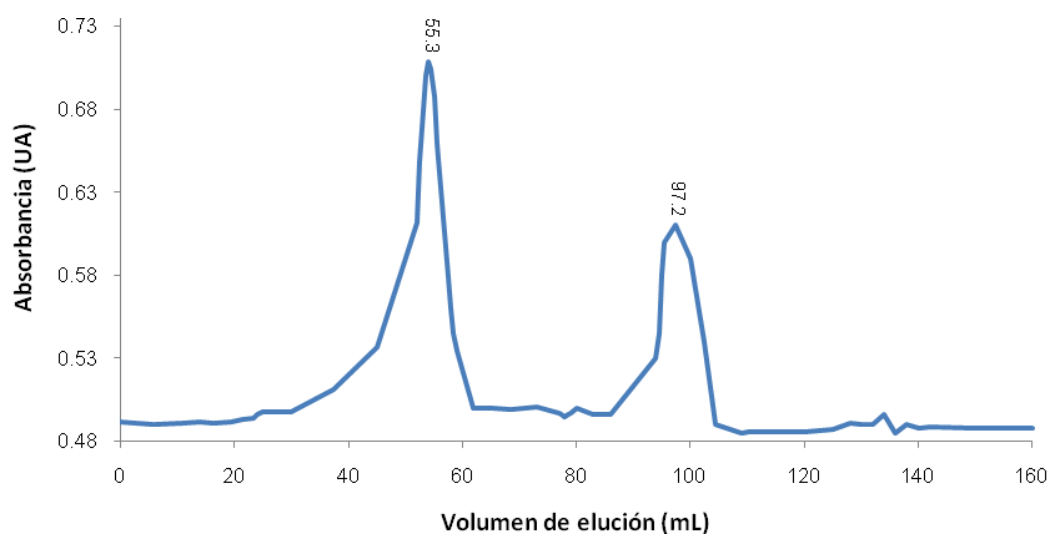


Fig. 19: Cromatograma de exclusión molecular para la muestra MS063, usando Sephadex G-50.

Tabla 5: Resultados para la exclusión molecular con Sephadex G-50 de las muestras estudiadas.

MUESTRA	VOLUMEN ELUCIÓN PICO A (mL)	VOLUMEN ELUCIÓN PICO B (mL)
MS063	55.3	97.2
MAN93	55.1	98.0
AE032	54.9	97.5
CEP041	56.0	97.6
FDC078	55.0	98.0
RCAO15	55.8	97.5
C02	55.0	96.9
C07	56.2	97.2
C73	54.8	97.6
Promedio \pm d.e.*	55.6 \pm 0.9	97.4 \pm 1.1

*d.e. = desviación estándar.

3.4.1. Identificación mediante Western Blotting

En esta etapa la fracción recogida en la columna de Sephadex G-50 se sometió a inmunotransferencia. Se observó que la transferencia fue exitosa ya que las bandas del marcador de peso usado pasaron a la membrana de transferencia. Al ver la figura 20 se observa que solo en 3 carriles aparecieron bandas. Estos tres carriles corresponden a pacientes del grupo 2.

El grupo 2 fue seleccionado tomando como parámetro el desenlace de los pacientes, es decir, de aquellos pacientes que tras el seguimiento fallecieron. De esta manera, las bandas reveladas en la prueba de Western Blotting muestran la identificación de formas circulantes del BNP de alto peso molecular, esto concuerda con los hallazgos hechos en estudios previos [22, 23].

Los resultados sugieren que el BNP sufre procesos de oligomerización, no obstante, se ha reportado que la observación de bandas alrededor de 36KDa corresponden a trímeros del proBNP, y son algunos de los motivos de alto peso molecular reportados del BNP [56]. La oligomerización del proBNP se ha descubierto en pacientes con falla cardíaca [59], lo que en el contexto de los resultados obtenidos en este estudio, podría ser indicativo de que las personas con IAM son más susceptibles a este tipo de patologías. Los resultados sugieren incluso que la presencia de la forma trimérica del proBNP estaría asociada al desenlace de los pacientes, ya que no se observaron bandas en los carriles de las muestras de pacientes sin complicaciones tras el seguimiento realizado [44].

No obstante, la causa por la cual se observó el proBNP oligomerizado en el Western Blotting en primera instancia es debido a la naturaleza policlonal del anticuerpo, por lo que debido a su inespecificidad puede unirse al proBNP. Sin embargo, otra razón para tener estos resultados sería que las formas de alto peso molecular del BNP presentan mayor inmunorreactividad que el BNP-32 [23]. En

cuanto a la ausencia de bandas correspondientes al BNP-32, ocurre porque mediante la electroforesis no es posible resolver e inmobilizar péptidos con pesos moleculares menores a 10 KDa [16].

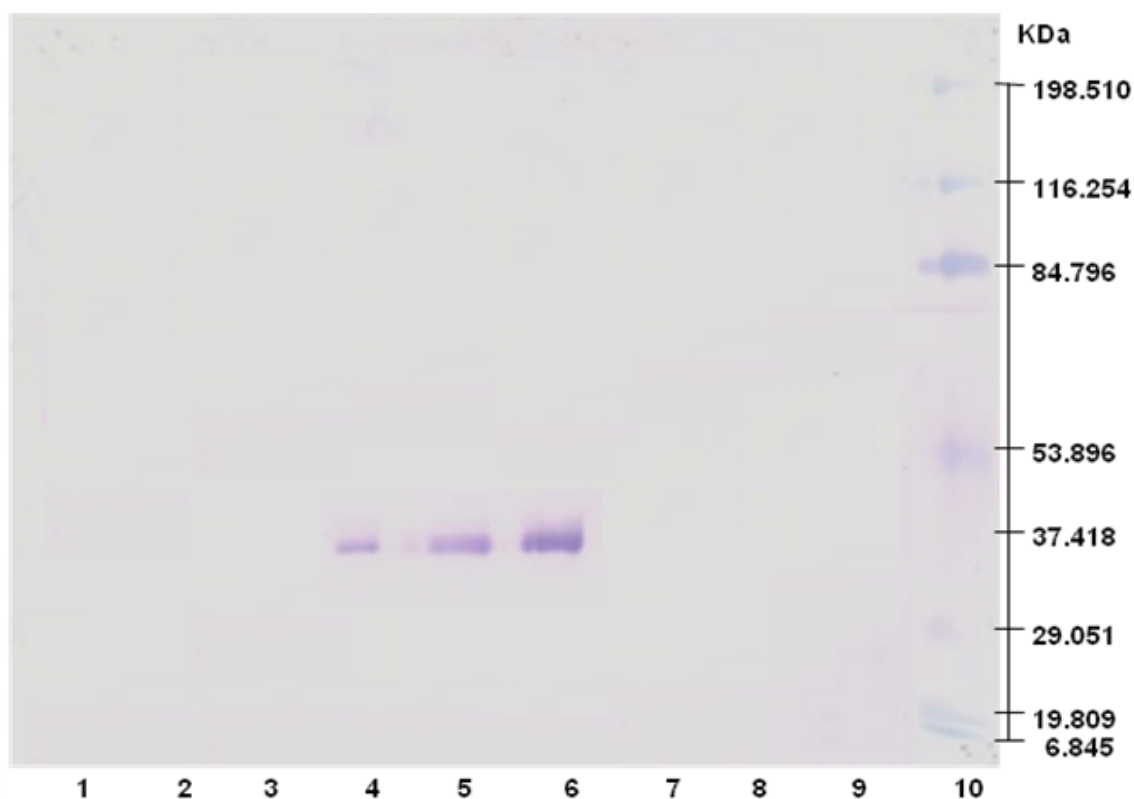


Fig. 20: Western Blotting de las fracciones provenientes de la columna G-50, para los pacientes y controles analizadas. Carriles: 1. MS063, 2. MAN93, 3. AE032, 4. CEP041, 5. FDC078, 6. RCA015, 7. C02, 8. C07, 9. C73, 10. Marcador de Peso.

Por otra parte, los análisis realizados a través del programa Quantity One, indican que los pesos de las bandas detectadas se encuentran entre 36.543KDa y 36.856kDa, tal como se aprecia en la tabla 7. Estos resultados concuerdan con la idea de que éstas son bandas de oligómeros del proBNP en su forma trimérica, y la densidad relativa de las bandas indican que en la muestra RCA015 los niveles de expresión son mayores en comparación con las demás muestras, pero estos

resultados no muestran una tendencia similar a las medidas de NT-proBNP [41, 60].

Tabla 6: Pesos moleculares y densidad de la bandas registrada en el Western Blotting.

Paciente	Peso molecular de la banda (KDa)	Densidad relativa de la banda
CEP041	36.856	0.467
FDC078	36.543	0.654
RCA015	36.845	1

Finalmente, aún no se ha aclarado como el proBNP puede ser secretado a la sangre, pero las evidencias indican, que podría ser un problema asociado a la covaltasa encargada del rompimiento de la prohormona al interior de las células. En todo caso, se requiere de muchos estudios posteriores para elucidar los mecanismos relacionados con estos procesos [17, 18, 19, 52].

CONCLUSIONES

El NT-proBNP podría un buen marcador para el diagnóstico del IAMSEST debido a que el incremento de su nivel refleja la existencia de daño cardiaco o isquemia celular al interior de corazón.

Fue posible la separación de mezclas complejas de proteínas mediante el uso de cromatografía de exclusión molecular en varias etapas. Se comprobó que no es suficiente usar un solo parámetro de separación para aislar una proteína de interés, tal como se muestra los cromatogramas de exclusión molecular..

La espectrometría de masas mostró ser una herramienta analítica muy poderosa, por su sensibilidad para la determinación de las masas de los péptidos natriuréticos aislados. Sin embargo, debido a las limitaciones mencionadas del método de ionización usado, no es posible obtener buenos resultados cuando se trata de péptidos complejos con estructura circular por la presencia de puentes cisteína.

El BNP-32 podría expresarse diferencialmente en personas sanas respecto a pacientes con IAMSEST, e incluso el sistema endocrino de los pacientes puede sintetizar formas moleculares de esta proteína que no muestran actividad biológica. En este estudio específicamente se logró aislar una isoforma de la proteína sin el característico anillo de los PNs, que de acuerdo con las investigaciones previas en este campo, es la razón por la cual los pacientes muestran una expresión de la hormona mayor a la de la población sana, sin que esto sea provechoso para su sistema cardiovascular.

Finalmente, el hecho de encontrar oligómeros del proBNP en los pacientes del grupo 3, podría significar que estos se encuentran asociados a las complicaciones posteriores de los pacientes con IAMSEST, debido a que estos han sido

observados en muestras de pacientes con falla cardiaca. Sin embargo, no se han establecido los mecanismos por medio de los cuales los trímeros de proBNP están relacionados con la presencia de falla cardiaca.

RECOMENDACIONES

Debido a la importancia de los marcadores cardiacos, se requiere un estudio con una mayor cantidad de pacientes, lo que permita establecer un tratamiento estadístico más riguroso y por tanto hacer los resultados más representativos de la población general.

Realizar ensayos con anticuerpos monoclonales para identificar formas particulares del BNP, y después secuenciarlas haciendo uso de las técnicas de espectrometría de masas, especialmente de MALDI-TOF.

Caracterizar las formas oligoméricas de tipo fibrillas que forma el BNP mediante espectroscopía de fluorescencia y espectrometría de masas para establecer la existencia de amiloidosis cardiaca, para luego establecer cuál es el proceso mediante el cual la proteína se ensambla y produce complicaciones cardiacas.

BIBLIOGRAFIA

1. Beaglehole R, Irwin A, Thomson P. **Informe sobre la salud en el mundo 2003**. Organización Mundial de la salud 2003; 170-175.
2. Ramasamy I. **Biochemical markers in acute coronary syndrome**. Clinica Chimica Acta. 2011;412(15-16):1279-96.
3. Abrahams J, Apweiler R, Balling R, Bertero MG, Bujnicki JM, Chayen NE, et al. **"4D biology for health and disease" workshop report**. New Biotechnology. 2011;28(4):291-3.
4. Macabasco-O'Connell A, Danwalder S, Sinha K. **Cardiac risk scores in high-risk hispanics and the predictive value of BNP**. J Clin Nurs 2005, 809.
5. Sentandreu MA, Sentandreu E. **Peptide biomarkers as a way to determine meat authenticity**. Meat Sci. 2011;4-28.
6. Abreu D. **Caracterización del síndrome coronario agudo**, 2010. [Web en línea] Disponible desde internet en: www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/2034/1/Caracterizacion-del-Sindrome-Coronario-Agudo.html. Con acceso el 20 de noviembre del 2009.
7. Pierre J. **ESS Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes**. [Web en línea]. Disponible desde internet en eurheartj.oxfordjournals.org. Con acceso el 10 de octubre del 2009.
8. Palacios F. **Actualización en definición y manejo del infarto agudo del miocardio**. Revistaperuana de cardiología 2008. Vol. 34 N° 1, 345-356.
9. Antman EM, Beasley JW, Califf RM, et al. **ACC/AHA Guidelines for the Management of patients with unstable angina and Non-ST-Segment elevation myocardial infarction**. A report of the American College of Cardiology, American Heart Association task force on practice guidelines (Committee on the management of patients with unstable angina). J. Am. Coll. Cardiol. 2000. 36: 970-1062.

10. White H, Chew D, **Acute myocardial infarction**. Lancet: 2008; 3(22): 570-84.
11. Palma J, Jiménez A, Gonzáles J, Marín H, Simarro M. **Guías de práctica clínica de la Sociedad Española de Cardiología en la monitorización ambulatoria del electrocardiograma y presión arterial**. Revista española de cardiología. 2000; 53: 91-10.
12. Rubio R. 2003. **Revisión sobre la utilidad de los marcadores séricos cardiacos**. Zaragoza. [Web en línea]. Disponible en internet en <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003663.htm>. [Con acceso el 26 de marzo de 2009].
13. Jacod J, Adkins J, Qian W, Liu T, Shen Y, Camp D, Smith R. **Utilizing Human Blood Plasma For Proteomic Biomarker Discovery**. [Web en línea]. Disponible en: <http://158.109.215.191/base/documents%5CmasterGP%5CBIOMARCADORES%20%20DETERNADOS%20POR%20PROTEOMICA.%20V.%20a.%20SALAZAR.pd>. Con acceso el 12 de febrero del 2010.
14. Park JP, Park **biomarkers for diagnosis in acute myocardial infarction**. Biomarkers MK, Yun JW. Proteomic. 2011;16(1):1-11.
15. Medvedev AE. **Natriuretic peptides**. Biomeditsinskaya Khimiya. 2007;53(5):476-87.
16. Semenov AG, Seferian KR. **Biochemistry of the human B-type natriuretic peptide precursor and molecular aspects of its processing**. Clinica Chimica Acta. 2011;412(11-12):850-60.
17. Nishikimi T, Kuwahara K, Nakao K. **Current biochemistry, molecular biology, and clinical relevance of natriuretic peptides**. J Cardiol. 2011;57(2):131-40.
18. Goetsep P. **Biochemistry of ProB-Type Natriuretic Peptide-derive peptides: The endocrine Heart Revised**. Clinical Chemistry. 2004;50(9):1503-1510.

19. Mair J. **Biochemistry of type natriuretic peptides: where are we now?**. ClinChem Lab Med. 2008;46(11):1507-1514.
20. Shimizu H, Aono K, Masuta K, Asada H, Misaki A, Teraoka H. **Degradation of human brain natriuretic peptide (BNP) by contact activation of blood coagulation system.** ClinicaChimica Acta. 2001;305(1-2):181-6
21. Kambayashi Y, Nakao K, Mukoyama M, Saito Y, Ogawa Y, Shiono S, Inouye K, et al. **Isolation and sequence determination of human brain natriuretic bnp.** Journal Biochemistry. 1989; 259:2.
22. Shimizu H, Masuta K, Aono K, Asada H, Sasakura K, Tamaki M, et al. **Molecular forms of human brain natriuretic peptide in plasma.** ClinicaChimicaActa. 2002;316(1-2):129-35.
23. Liang F, O'Rear J, Schellenberger U, Tai L, Lasecki M, Schreiner GF, et al. **Evidence for functional heterogeneity of circulating B-type natriuretic peptide.** J Am CollCardiol. 2007;49(10):1071-8.
24. Lin JR, Wang H, Collins AB, Stone JR. **Tongue necrosis and systemic vascular amyloidosis.** Hum Pathol. 2011;42(5):734-7.
25. Blondé-Cynober F, Morineau G, Estrugo B, Fillie E, Aussel C, Vincent J-. **Diagnostic and prognostic value of brain natriuretic peptide (BNP) concentrations in very elderly heart disease patients: Specific geriatric cut-off and impacts of age, gender, renal dysfunction, and nutritional status.** Arch GerontolGeriatr. 2011;52(1):106-10.
26. Pfister R, Strack N, Wielckens K, Malchau G, Erdmann E, Schneider CA. **The relationship and prognostic impact of low-T3 syndrome and NT-pro-BNP in cardiovascular patients.** Int J Cardiol. 2010;144(2):187-90.
27. Olsson LG, Swedberg K, Cleland JGF, Spark PA, Komajda M, Metra M, et al. **Prognostic importance of plasma NT-pro BNP in chronic heart failure in patients treated with a β -blocker: Results from the carvedilol or metoprolol74uropean trial (COMET) trial.** EuropeanJournal of HeartFailure. 2007;9(8):795-801.

28. Cooper T. **Instrumentos y técnicas de Bioquímica**. Barcelona: editorial Reverté. 1984, 243 p.
29. Levreri I, Musante L, Petretto A, Cuccabitta D, Candiano G, Melioli G. **Application of 2 D-HPLC system for plasma protein separation**. *Jugoslovenska Medicinska Biohemija*. 2006;25(3):211-20.
30. Skoog P, Holler F, Nieman T. **Análisis Instrumental**. Madrid: McGraw-Hill, 2000, 730 p.
31. Bollag D, Rozycki M, Stuart J. **Protein Methodos**. New York: Wiley. 1996, 397 p.
32. Freydell EJ, Van Der Wielen LAM, Eppink MHM, Ottens M. **Size-exclusion chromatographic protein refolding: Fundamentals, modeling and operation**. *Journal of Chromatography A*. 2010;1217(49):7723-37.
33. Haleen J. **The role of separation science in proteomics research**. *Electrophoresis*. 2001;22:3629-3638.
34. Uwe D. **Theory of peak capacity in gradient elution**. *Journal of Chromatography A*. 2005;24:153-161.
35. Gross J. **Mass Espectrometry**. Berliin: Springer. 2004, 441 p.
36. Housby J. **Mass spectrometry for Proteomic and Genomic**. London: Academic Publishers. 2001, 93 p.
37. Gallagher S, Winston SE, Fuller SA, Hurrell JGR. **Immunoblotting and immunodetection**. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2008(SUPPL. 83):10.8.1,10.8.28
38. Noble JE, Bailey MJA. **Chapter 8 quantitation of protein** [Internet]; 2009 [con acceso 2011 Jun 30]. Disponible en: www.scopus.com.

39. Breipohl G, Knolle J, Stüber W. **Synthesis and application of acid labile anchor groups for the synthesis of peptide amides by fmoc-solid-phase peptide synthesis.** Int J Pept Protein Res. 1989;34(4):262-7.
40. Vogel MW, Chen HH. Novel natriuretic peptides: **New compounds and new approaches.** Current Heart Failure Reports. 2011;8(1):22-7.
41. Kim S-, Rhee S-, Shim C-, Kim J-, Park S, Ko Y-, et al. **Prognostic value of N-terminal probrain natriuretic peptide level on admission in patients with acute myocardial infarction and preserved left ventricular ejection fraction.** Coronary Artery Dis. 2011;22(3):153-7.
42. Yetkin Ö, Aksoy Y, Turhan H, İn E, Karahan M, Kiliç T, et al. **Value of plasma BNP levels as a prognostic marker in lung and heart disorders.** TuberkulozveToraks. 2007;55(3):225-30.
43. GE Healthcare. **Instructions 56-1190-96 AC Sephadex G-25.**
44. Whitaker J. **Determination of Molecular Weights of Proteins by Gel Filtration of Sephadex.** Anal. Chem., 1963;35 (12):1950–1953.
45. Tu C, Rudnick PA, Martinez MY, Cheek KL, Stein SE, Slebos RJC, et al. **Depletion of abundant plasma proteins and limitations of plasma proteomics.** Journal of Proteome Research. 2010;9(10):4982-91.
46. Werner M, Clore G, Gronenborn A, Kondoh A, Fisher R. **Refolding protein by gel filtration chromatography.** Journal Federation of European Biochemical Society. 1994;345:125-130.
47. Hortin G, Swirldow D, Anderson N. **High abundance polypeptide of human plasma proteomic comprising the top 4 log of polipetide abundance.** Clinical Chestry. 2008;4(10):1608-1616.
48. Turalai R, Chan K, Prieto D. **Charectization of low molecular weight human serum proteome.** Molecular and Cellular Protemic.2003;2:1096-1103.

49. Skoog P, Holler F, Nieman T. **Fundamentos de quimicaanalitica**. Madrid: McGraw-Hill, 2005, 145 p.
50. Gooding K. Peptides: **HPLC Analysis**. Indianapolis: Taylor and Francis Group. 2008, 1736 p.
51. Mant C. **Analytical HPLC peptides**.. Indianapolis: Taylor and Francis Group. 2006, 41 p.
52. Wallen T, Landahl S, Hedner T, Hedner J. **Atrial peptides, ANP (1-98) and ANP (99-126) in health and disease in an elderly population**. European Heart Journal. 1993;14(11):1508-1513.
53. Vatansever B, Lahrichi S, Thiocone A, Sallucen N, Mathiev M, Grouzmann E. **Comparison between a linear ion trap a triple quadruple MS in the sensitive detection of large peptides a femtomoles amount on column**. J. Sep. Sci. 2010;33:2478-2488.
54. Potter L, Abbey-Hosch S, Dickey D. **Natriuretic Peptides, Their Receptors, and CyclicGuanosine Monophosphate-DependentSignaling Functions**. Endocrine Reviews. 2005;27(1):47–72.
55. Liuni P, Wilson DJ. **Understanding and optimizing electrospray ionization techniques for proteomic analysis**.Expert Review of Proteomics. 2011;8(2):197-209.
56. Ala-Kopsala M, Moilanen A-, Rysä J, Ruskoaho H, Vuolteenaho O. **Characterization of molecular forms of N-terminal B-type natriuretic peptide in vitro**.Clin Chem. 2010;56(12):1822-9
57. Lin JR, Wang H, Collins AB, Stone JR. **Tongue necrosis and systemic vascular amyloidosis**. Hum Pathol. 2011;42(5):734-7.
58. GE Healthcare. **Instructions 56-1190-96 AC Sepahdex G-50**.

59. Yandle TG, Richards AM, Gilbert A, Fisher S, Holmes S, Espiner EA. **Assay of brain natriuretic peptide (BNP) in human plasma: evidence for high molecular weight BNP as a major plasma component in heart failure.** J Clin Endocrinol Metab. 1993;76(4):832-8.

60. Neyou A, O'Neil B, Berman AD, Boura JA, McCullough PA. **Determinants of markedly increased B-type natriuretic peptide in patients with ST-segment elevation myocardial infarction.** Am J Emerg Med. 2011;29(2):141-7.

ANEXO A: CURVA DE CALIBRACIÓN CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

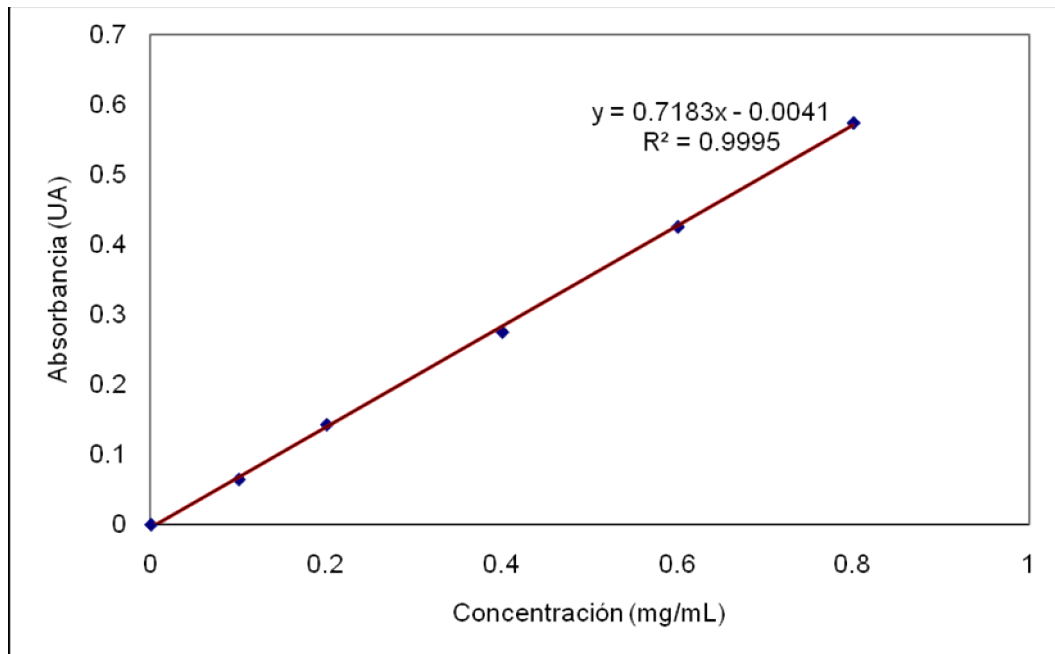


Fig. 1: Curva de calibración para concentración de proteínas, elaborada con patrones de albumina.

Tabla 1. Patrones de albumina preparados para la curva de calibración

Patrón	Concentración de albúmina (mg/mL)
1	0.1
2	0.2
3	0.4
4	0.6
5	0.8

ANEXO B: SOLUCIONES WESTERN BLOTTING

Tabla 1: Composición solución de carga para electroforesis 1D

REACTIVO	PORCENTAJE (P/V)
SDS al 10%	40
Mercaptoetanol	10
Azul de bromofenol	5
Glicerol	20
Tris-HCl 0.5M	25

Tabla 2: Composición solución de corrido para electroforesis 1D

REACTIVO	PORCENTAJE (P/V)
Glicina	1.44
SDS	0.3

Tabla 3: Composición buffer de transferencia

REACTIVO	PORCENTAJE (P/V)
Tris Base	0.3
Glicina	1.44
Metanol	15

Tabla 4: Composición solución TBS

REACTIVO	PORCENTAJE (P/V)
NaCl	0.9
Tris-HCl 1M pH 7.4	2

Tabla 5: Composición solución de bloqueo

REACTIVO	PORCENTAJE (P/V)
Leche descremada en polvo	5
Tween 20	1
TBS	Aforar a 100mL

Tabla 6: Composición solución de dilución

REACTIVO	PORCENTAJE (P/V)
Leche descremada	0.5
Tween 20	0.2
TBS	Aforar a 100mL

Tabla 7: Composición solución de lavados

REACTIVO	PORCENTAJE (P/V)
Tween 20	0.5
TBS	Aforar a 100mL

Tabla 8: Composición solución de dilución

REACTIVO	PORCENTAJE (P/V)
Leche descremada	0.5
Tween 20	0.2
TBS	Aforar a 100mL

Tabla 9: Composición solución de fosfatasa alcalina

REACTIVO	PORCENTAJE (P/V)
NaCl 1M	1
Tris-HCl 1M pH 9.5	19
MgCl ₂	0.5

Tabla 10: Composición solución de sustratos fosfatasa alcalina

REACTIVO	PORCENTAJE (P/V)
NTB	0.66
BCIP	0.33
Aforar con solución de fosfatasa alcalina	

ANEXO C: CROMATOGRAMAS SEPHADEX G-25

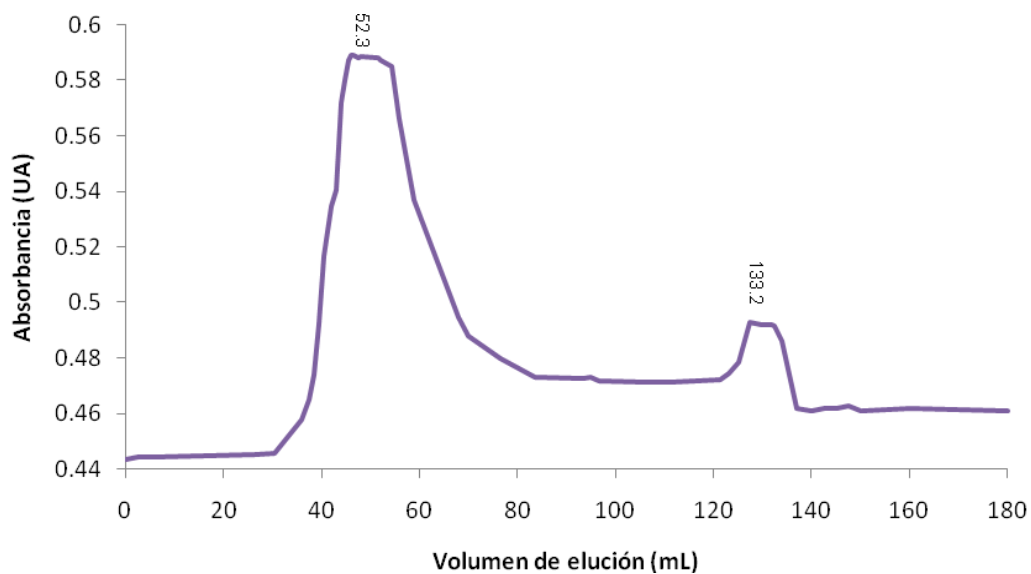


Fig. 1: Cromatograma de exclusión molecular para muestra MAN93 usando Sephadex G-25.

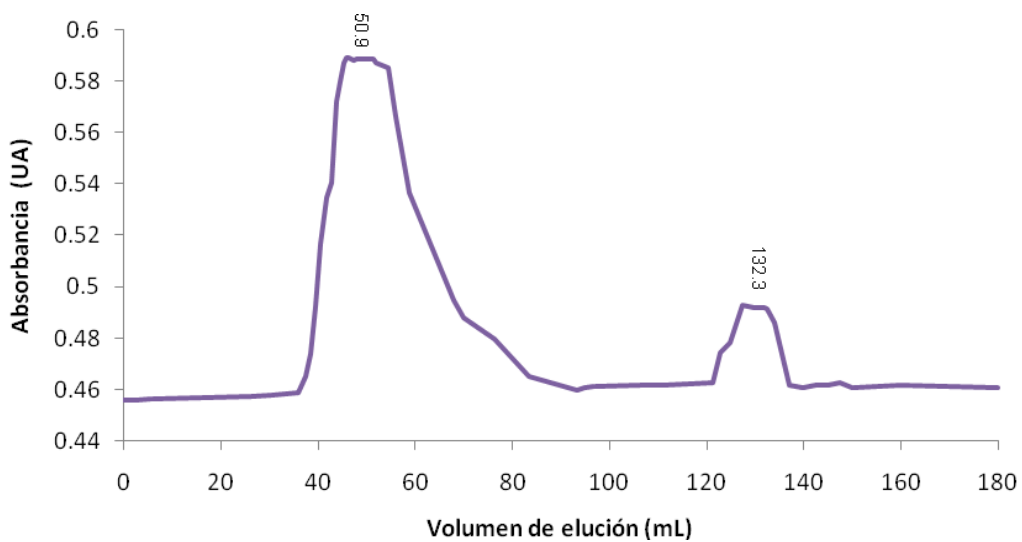


Fig. 2: Cromatograma de exclusión molecular para muestra AE032 usando Sephadex G-25.

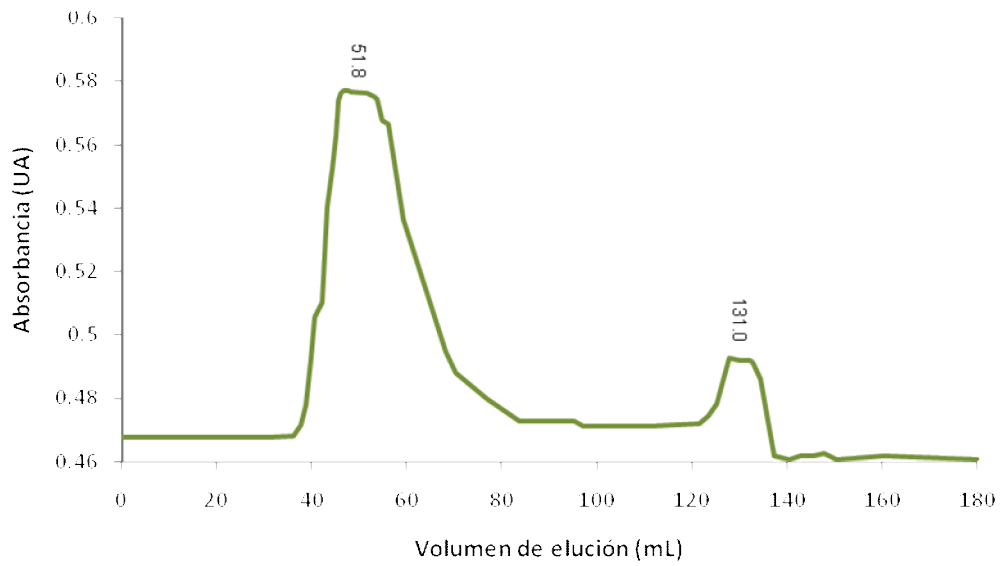


Fig. 3: Cromatograma de exclusión molecular para muestra FDC078 usando Sephadex G-25.

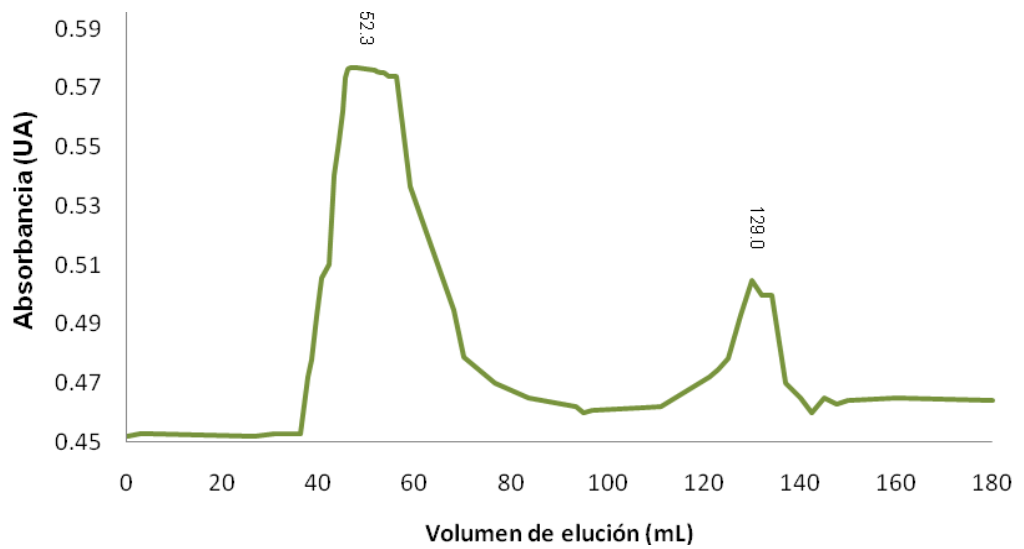


Fig. 4: Cromatograma de exclusión molecular para muestra RCA015 usando Sephadex G-25.

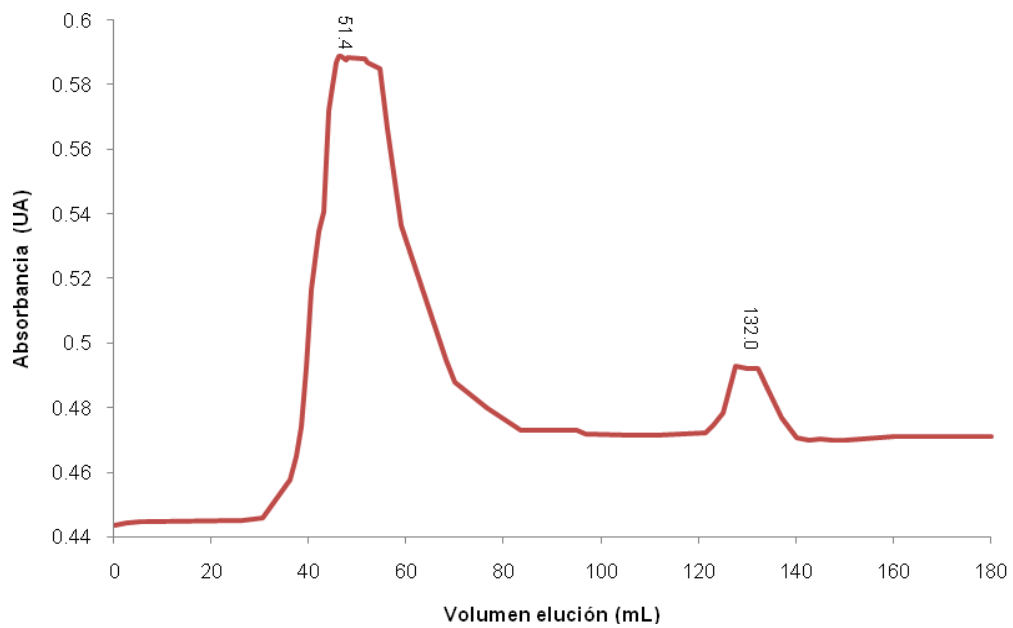


Fig. 5: Cromatograma de exclusión molecular para muestra C07 usando Sephadex G-25.

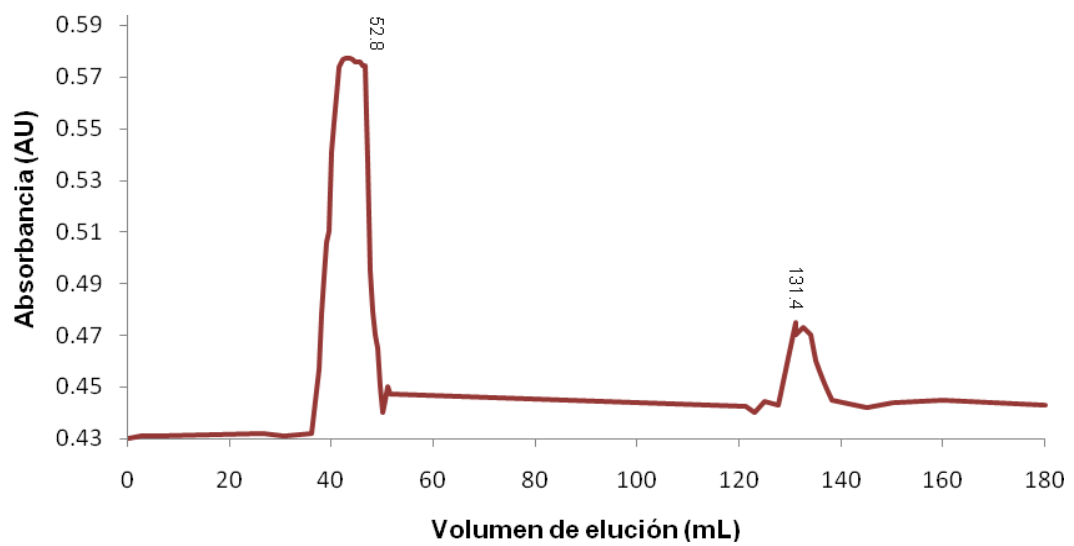


Fig. 6: Cromatograma de exclusión molecular para muestra C73 usando Sephadex G-25.

ANEXO D: CROMATOGRAMAS RP-HPLC

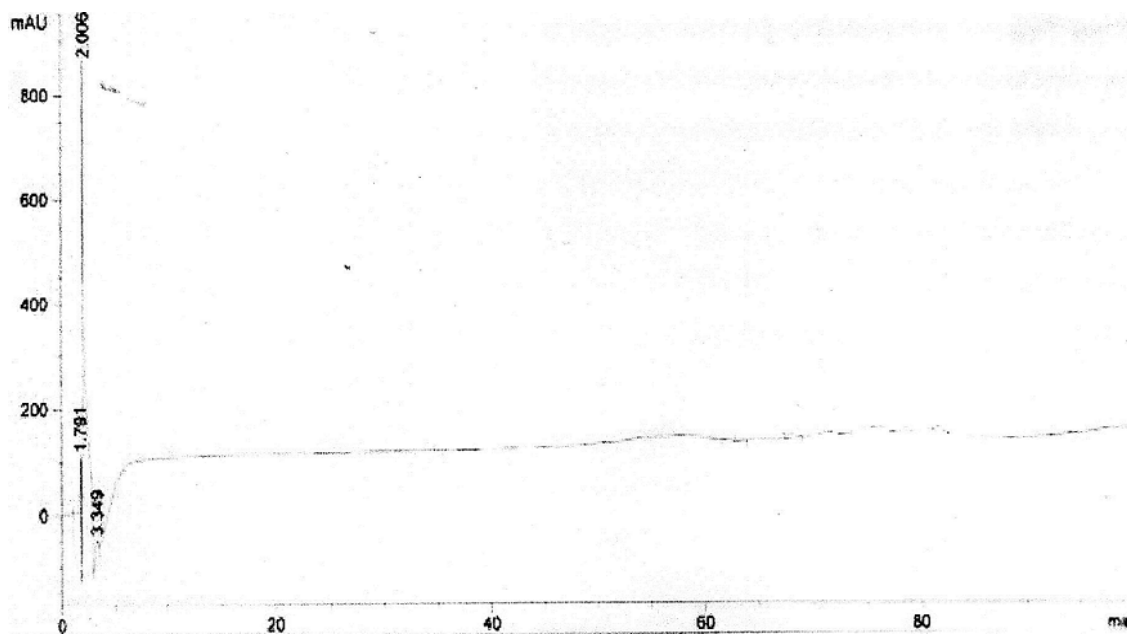


Fig. 1: Cromatograma del blanco. Fase móvil usada en exclusión molecular

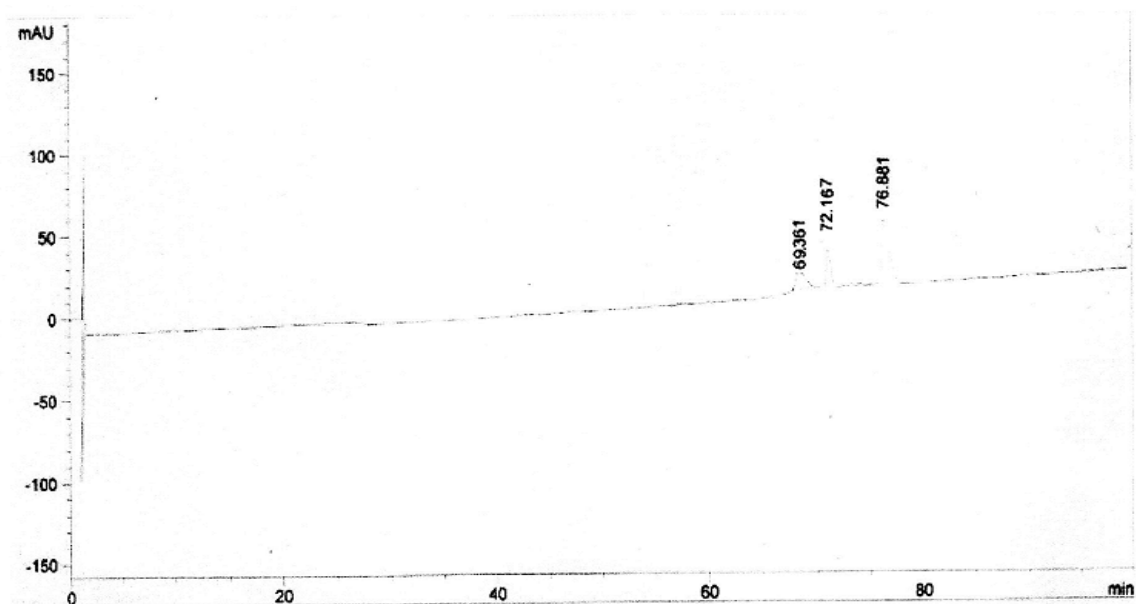


Fig. 2: Cromatograma RP-HPLC fracción muestra MAN093

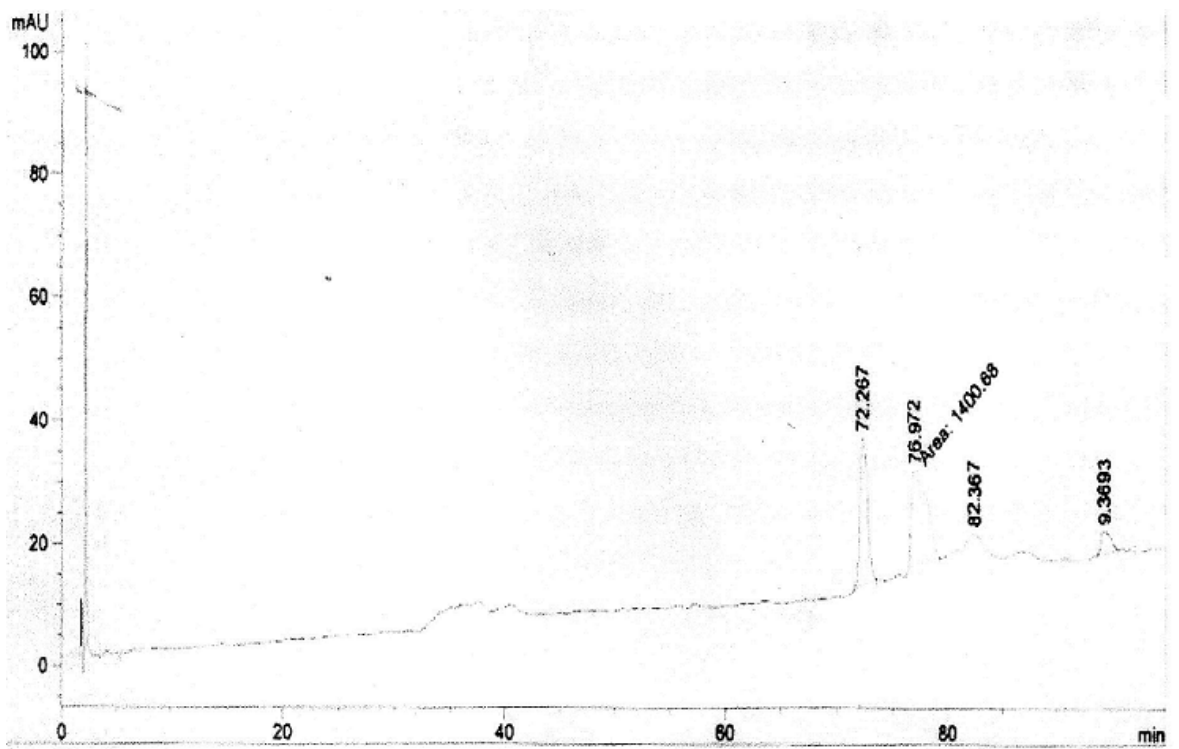


Fig. 3: Cromatograma RP-HPLC fracción muestra AE032

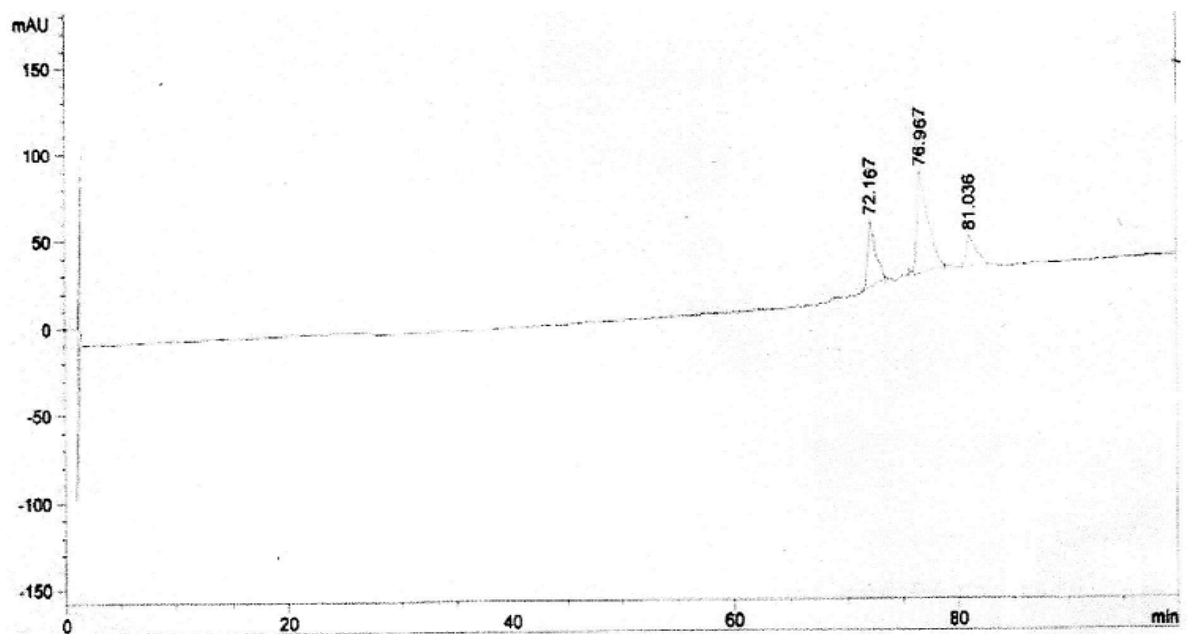


Fig. 4: Cromatograma RP-HPLC fracción muestra FDC078

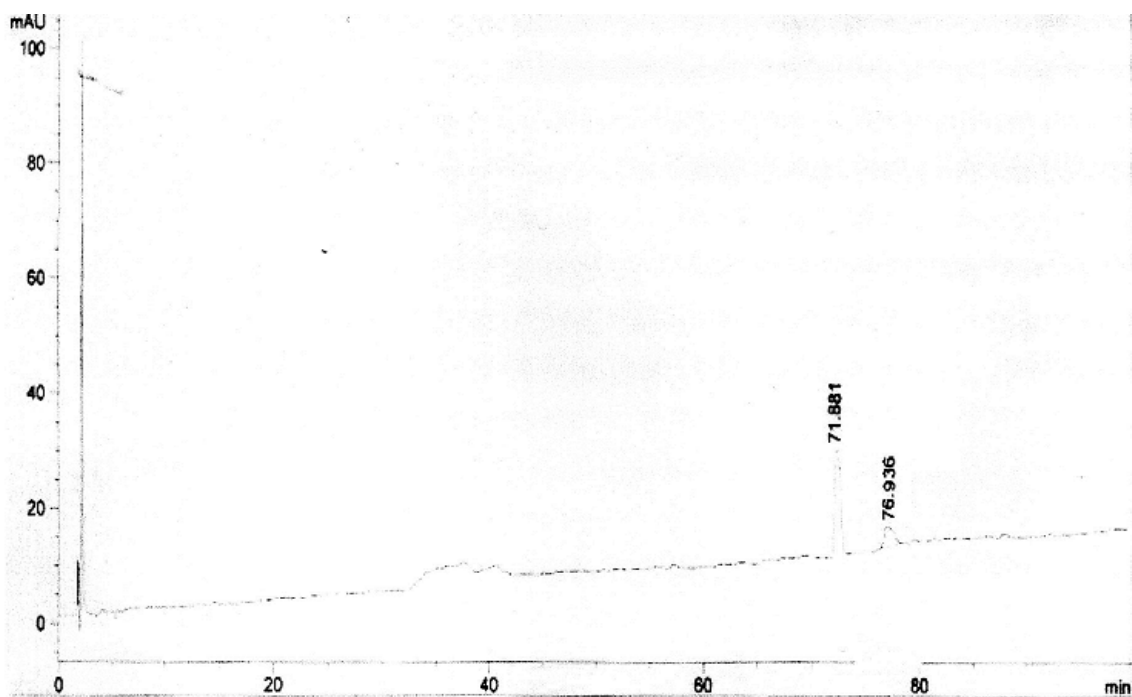


Fig. 5: Cromatograma RP-HPLC fracción muestra RCA015

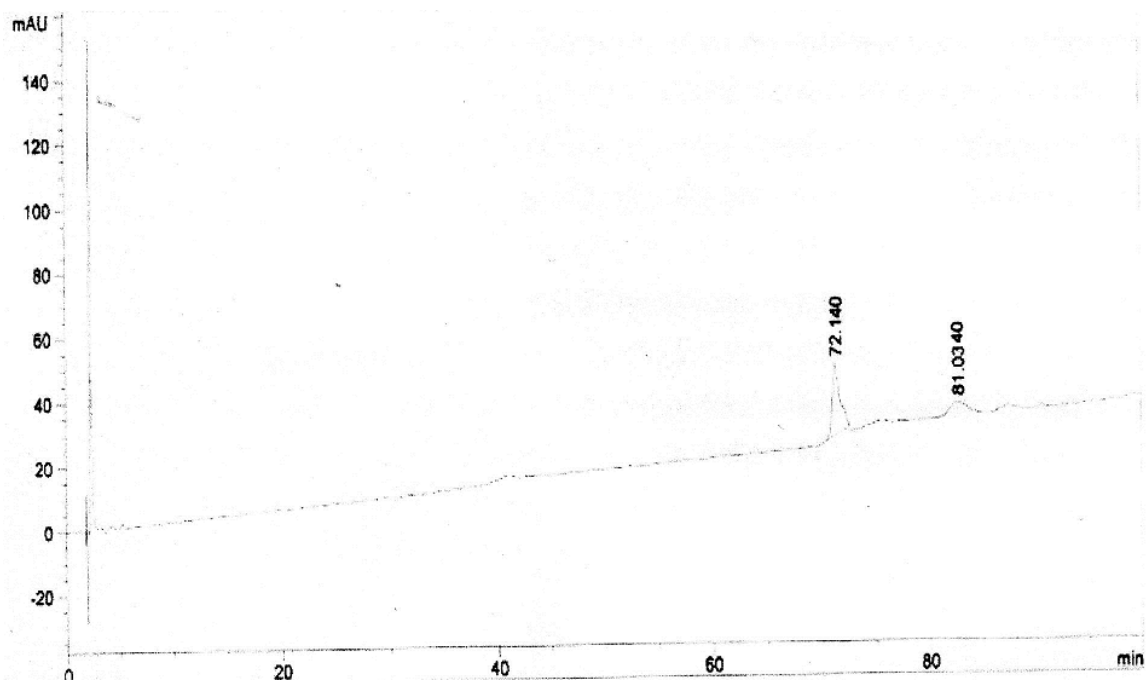


Fig. 6: Cromatograma RP-HPLC fracción muestra C07

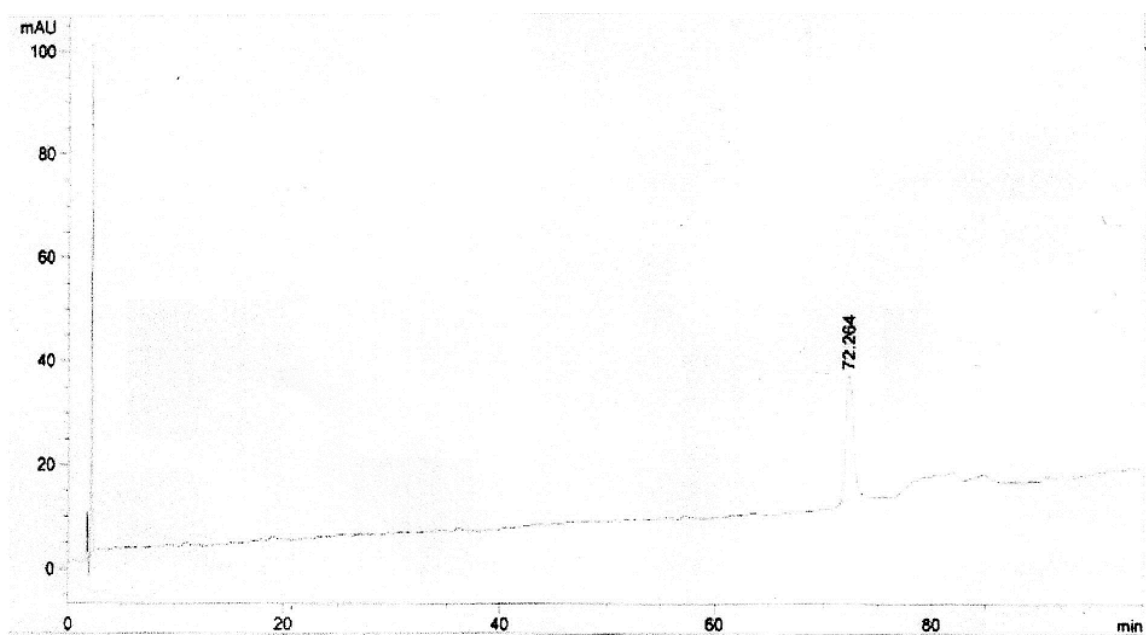


Fig. 7: Cromatograma RP-HPLC fracción muestra C073

ANEXO E: CROMATOGRAMAS SEPHADEX G-50

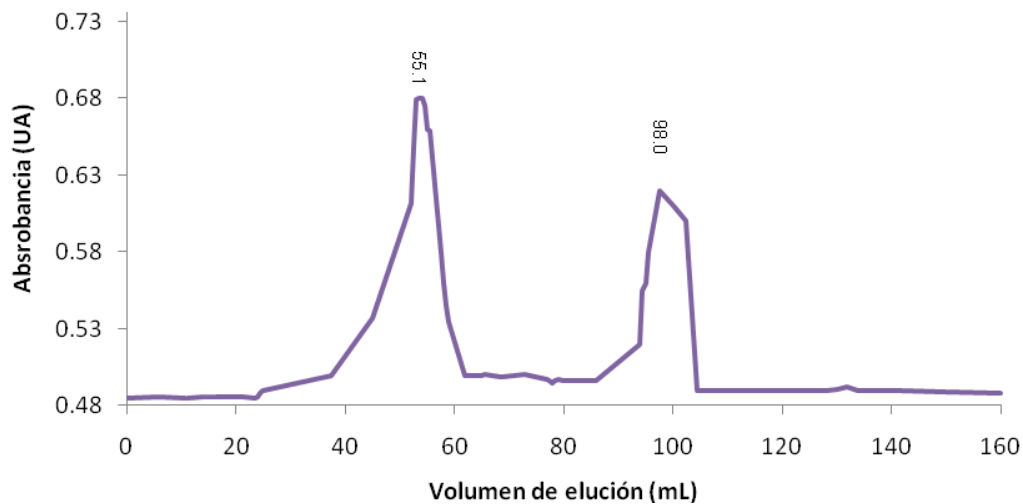


Fig. 1: Cromatograma de exclusión molecular para la muestra MAN93, usando Sephadex G-50.

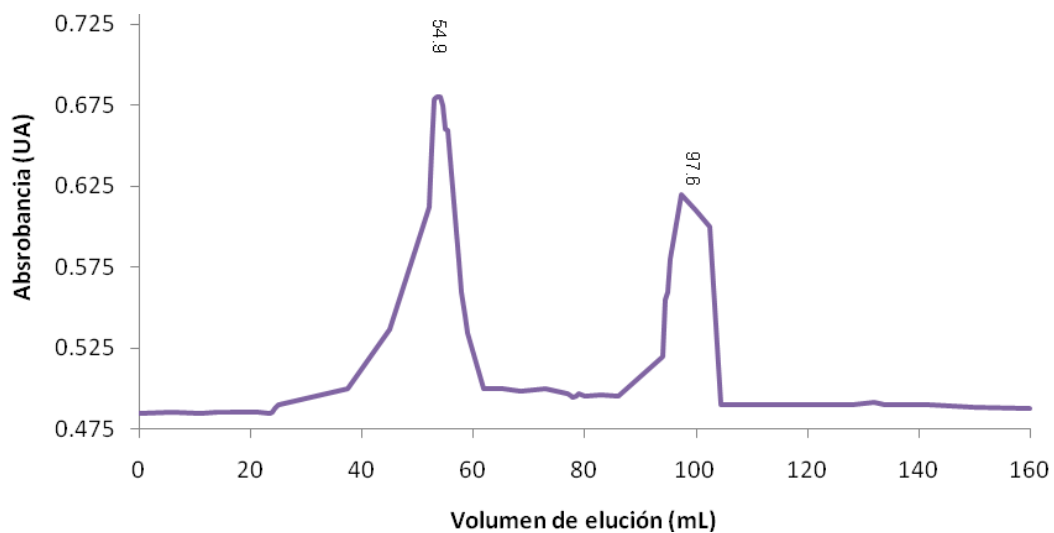


Fig. 2: Cromatograma de exclusión molecular para la muestra AE032, usando Sephadex G-50.

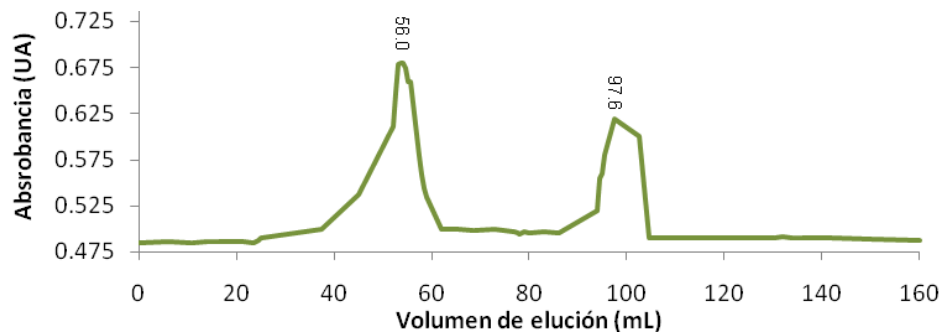


Fig. 3: Cromatograma de exclusión molecular para la muestra CEP041, usando Sephadex G-50.

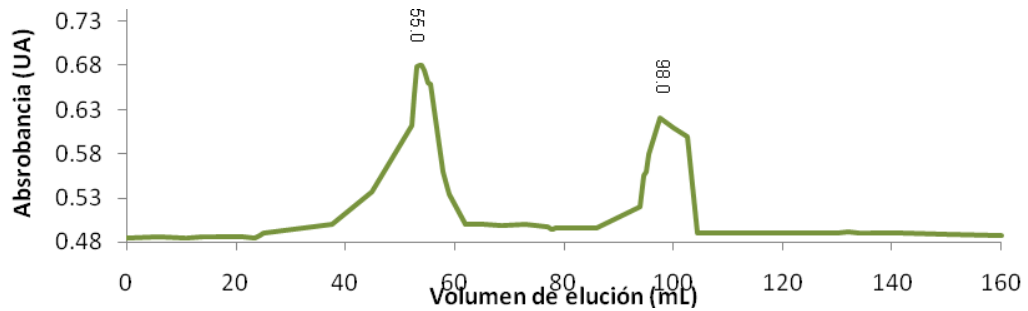


Fig. 4: Cromatograma de exclusión molecular para la muestra FDC078, usando Sephadex G-50.

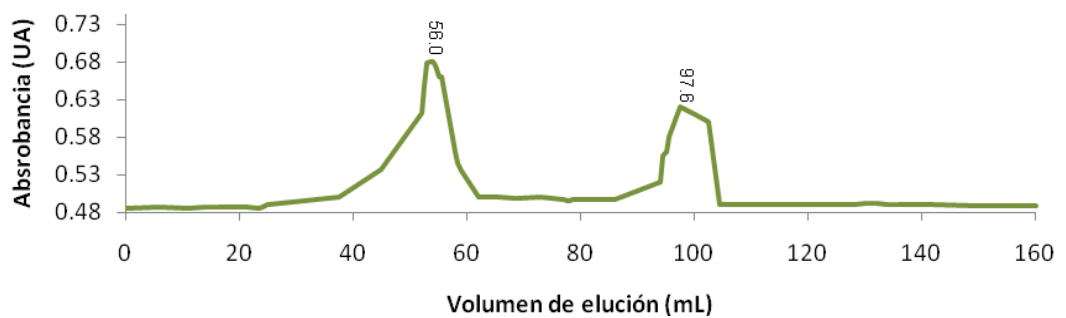


Fig. 5: Cromatograma de exclusión molecular para la muestra RCA015, usando Sephadex G-50.

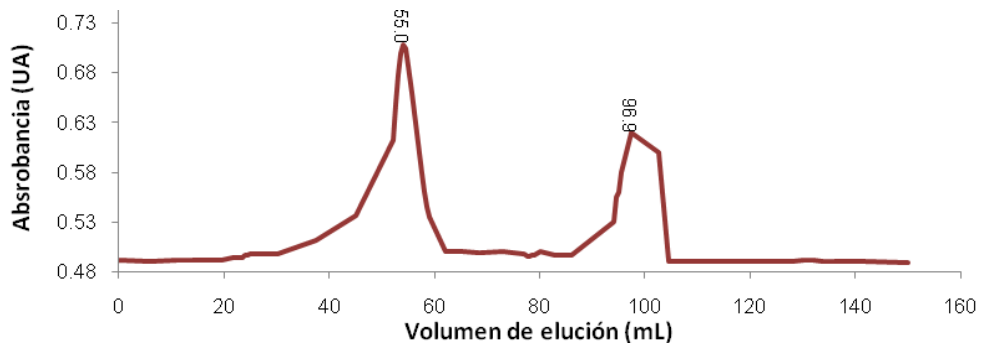


Fig. 6: Cromatograma de exclusión molecular para la muestra C02, usando Sephadex G-50.

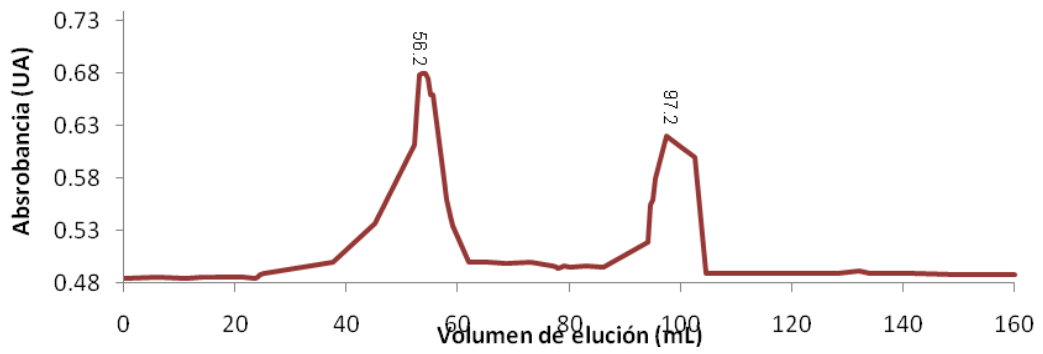


Fig. 7: Cromatograma de exclusión molecular para la muestra C07, usando Sephadex G-50.

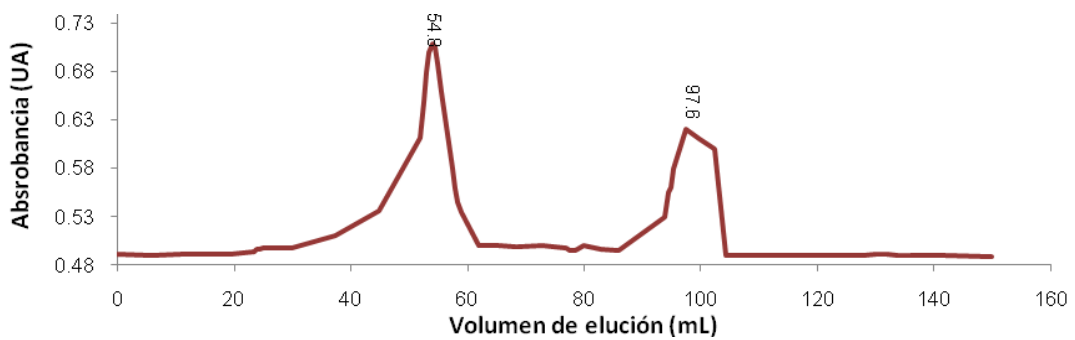


Fig. 7: Cromatograma de exclusión molecular para la muestra C73, usando Sephadex G-50.