



**ANALISIS PROTEOMICO EN PLASMA DE PACIENTES CON EVENTOS
CORONARIOS AGUDOS**

YENI BUENO DUARTE

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
BUCARAMANGA
2011**



**ANALISIS PROTEOMICO EN PLASMA DE PACIENTES CON EVENTOS
CORONARIOS AGUDOS**

YENI BUENO DUARTE

TRABAJO DE GRADO:

Para optar el título de Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas

Director

Dr Rodrigo Torres Sáez

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE SALUD

ESCUELA DE MEDICINA

BUCARAMANGA

2011

DEDICATORIA

A Dios porque todo lo que soy se lo debo a Él. Él es la fuente de inteligencia y sabiduría.

A mis padres y hermanas, por su inmenso amor y apoyo incondicional. Siempre serán un gran incentivo para ir más allá.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rodrigo Torres por su confianza, apoyo incondicional y por la gran motivación que representa su ejemplo: *“lo más importante es querer y esforzarse”*.

Al Dr. Gerardo Muñoz, por su apoyo y colaboración en la realización de esta investigación.

Al medico Manuel Barrios Socarrás por sus enseñanzas, consejos, amistad y esfuerzo en el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Carolina Méndez y al Dr. Marcos López, por aceptar ser los calificadores de este trabajo de investigación. Del mismo modo, por su asesoría, apoyo y consejos.

A *COLCIENCIAS* por el apoyo económico brindado para realizar esta investigación; a la Universidad Industrial de Santander y al Departamento de Ciencias Básicas Biomédicas por el programa de apoyo a movilidad de investigadores.

A mis padres, hermanas, amigos y compañeros de la maestría: Luz Angela, Manuel, Néstor, Laura, Sandra. A los compañeros del grupo de Investigación: Rocío, Oveimar, Sergio, Víctor, Magaly, Jennifer.

TABLA DE CONTENIDO

1.MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES.....	24
1.1 LA ENFERMEDAD CORONARIA.....	24
1.1.1 La arterioesclerosis	25
1.1.2 Formación de la placa de ateroma	26
1.1.3 Ruptura de la placa.....	27
1.1.4 Ruptura de la placa.....	28
1.1.5 Síndrome coronario agudo	28
1.1.6 Clasificación.....	29
1.2 MARCADORES BIOQUÍMICOS.....	30
1.2.1 Biomarcadores de inflamación.....	31
1.2.2 Biomarcadores de estrés oxidativo.....	32
1.2.3 Biomarcadores de remodelamiento de la matrix extracelular.....	33
1.2.4 Biomarcadores de estrés de los miocitos.....	33
1.2.5 Biomarcadores de lesión de los miocitos.....	34
1.2.....	PROTEÓMICA
.....	36
1.3.1 Electroforesis bidimensional.....	37
1.3.2 Espectrometría de masas.....	39
1.3.4 Identificación de Proteínas.....	42
1.4 LA PROTEÓMICA DEL PLASMA HUMANO	44
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
1.1SELECCIÓN DE LOS PACIENTES Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	
.....	52
2.1.1. Grupos de estudio.....	53
2.1.2 Manejo de la muestra biológica.....	54
1.2METODOS	EXPERIMENTALES
.....	55

2.2.1 preparación de la muestra para electroforesis bidimensional.	55
1.3METODOS	ANALÍTICOS
.....	58
2.3.1 Electroforesis unidimensional (1D).	58
2.3.2 Electroforesis bidimensional.	59
2.3.3 Verificación de la repetibilidad y reproducibilidad de la técnica de separación de proteínas 2D-PAGE.....	62
2.4CAPTURA DE IMÁGENES Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2D)	63
2.5IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN LOS GELES BIODIMENSIONALES (2D).....	66
2.5.1. Identificación de proteínas mediante Espectrometría de masas con trampa iónica (Sistema LC/MS/MS)	66
2.5.2 Identificación de las proteínas expresadas diferencialmente por análisis bioinformático.	66
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
3.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	68
3.1.1 Análisis por electroforesis unidimensional (1D-SDS-PAGE) de los precipitados y sobrenadantes obtenidos en los procedimientos ensayados en la preparación de la muestra de plasma.	70
3.2 ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL 2D-SDS-PAGE	72
3.2.1 Ajuste de las condiciones de electroforesis bidimensional 2D-SDS- PAGE.....	72
3.2.2 Verificación de las figuras de mérito del método.	75
3.2.3 Separación de las proteínas de las muestras de plasma tratadas con los métodos de precipitación seleccionados, utilizando electroforesis bidimensional SDS-2D-PAGE.....	78
3.2.4 Electroforesis bidimensional SDS-2D-PAGE de los grupos de pacientes analizados.....	82

3.3ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2D).....	88
3.3.1 Análisis de los tres grupos NSTEMI; AI y controles.....	89
3.3.2. Análisis multivariado.	92
3.4 IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LAS PROTEÍNAS EXPRESADAS DIFERENCIALMENTE ($p < 0.05$).	94
3.5. IDENTIFICACIÓN POR ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS PROTEÍNAS EXPRESADAS DIFERENCIALMENTE.	104
3.5.1 Identificación de las proteínas aumentadas en los pacientes con NSTEMI.	106
3.5.2 Identificación de las proteínas aumentadas en los pacientes con AI. ..	108
3.5.3 Identificación de las proteínas aumentadas en los pacientes con SCA.	111
3.5.4 Identificación de la proteína disminuida en los pacientes con SCA.	114
4. CONCLUSIONES	118
5. RECOMENDACIONES.....	120
ESTRATEGIAS DE PUBLICACIÓN.....	121
BIBLIOGRAFÍA.....	122
MATRIZ DE ESTRUCTURA DEL ANÁLISIS DISCRIMINANTE	141
 Anexos.....	 130

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Representación del corazón humano y sus arterias	25
Figura 1.2. Representación esquemática de la electroforesis bidimensional.....	39
Figura 1.3. Métodos de ionización suave.....	41
Figura 1.4. (A) Representación esquemática de un espectrómetro de masas de tipo MALDI-TOF.....	43
Figura 1.5. Relación de los grupos proteicos del plasma, concentración y proteínas representativas de cada grupo.....	46
Figura 2.2. Representación del análisis de imágenes realizada por el programa PD-QUEST.	65
Figura 3.1. Electroforesis en 1D de proteínas de plasma humano sometido a diferentes tipos de tratamiento de remoción de proteínas abundantes.....	70
Figura 3.2. Geles de 2D-PAGE obtenidos durante el proceso determinación de las mejores condiciones de separación de proteínas de muestras de plasma humano.	74
Figura 3.3. Gel de 2D-PAGE utilizando las mejores condiciones de separación de las proteínas de suero:	75
Figura 3.4. Análisis de las imágenes de los geles 2D-PAGE de una muestra de plasma de un individuo control.....	76
Figura 3.5. Análisis de las imágenes de los geles 2D-PAGE de la muestra de plasma de un individuo control.....	78
Figura 3.6 Gel 2D-PAGE del plasma humano con y sin tratamiento de precipitación	81
Figura 3.7. Geles bidimensionales 2D-PAGE de los plasmas de pacientes con NSTEMI (N1 a N10).....	84
Figura 3.8. Geles bidimensionales 2D-PAGE de los plasmas de los pacientes con AI (A1a A10).	86

Figura 3.9. Geles bidimensionales 2D-PAGE de los plasmas de los pacientes sanos tomados como control (C1 a C10).....	88
Figura 3.10 Resumen del análisis comparativo de las diferencias en niveles de expresión de proteínas en cada uno de los análisis realizados.	91
Figura 3.11. Análisis discriminante de los grupos de pacientes analizados.....	93
Figura 3.16. Diagrama circular que presenta la clasificación de las proteínas identificadas por el análisis bioinformático, en grupos funcionales asociados con la patología cardiovascular.	115

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1. Marcadores Bioquímicos en SCA. Marcadores de lesión de los miocitos más usados en la práctica clínica.	36
Tabla 2.1 Características y antecedentes de los grupos de pacientes analizados en el análisis proteómico del plasma de pacientes con Síndrome coronario agudo sin elevación del segment ST.	54
Tabla 3.1. Concentración de proteína de los precipitados y sobrenadantes obtenidos en los métodos de preparación de muestra de plasma de un individuo control.....	69
Tabla 3.2. Reporte global de las réplicas analizadas mediante el software PD-QUEST versión 8.0.1	77
Tabla 3.3. Reporte global de las replicas analizadas mediante el software PD-QUEST versión 8.0.1	78
Tabla 3.4 Valores de peso molecular (PM) y punto isoeléctrico (pI) de las proteínas identificadas en el gel correspondiente a la muestra de plasma tratada con acetona que estuvieron ausentes en el gel de la muestra de plasma sin tratamiento.....	80
Tabla 3.5. Manchas identificadas en el estudio que presentaron diferencias estadísticamente significativas en sus niveles de expresión.	94
Tabla 3.6. Isoformas de la α 1-AACT identificadas en el plasma de pacientes con NSTEMI,	99
Tabla 3.7. Manchas identificadas en el estudio que presentaron diferencias en sus niveles de expresión.	105
Tabla 3.8. Proteínas identificadas por análisis bioinformático utilizando la base de datos SWISS 2D-PAGE (Instituto suizo de Bioinformática).	106
Tabla 3.9. Proteínas identificadas por análisis bioinformático utilizando la base de datos SWISS 2D-PAGE	109
Tabla 3.10. Proteínas identificadas por análisis bioinformático utilizando la base de datos SWISS 2D-PAGE	112

Tabla 3.11. Proteínas identificadas por análisis bioinformático utilizando la base de datos SWISS 2D-PAGE 114

LISTA DE ANEXOS

ANEXOS 1	140
ANEXO 2	141
ANEXO 3	143
ANEXO 4	145

ABREVIATURAS

1D	Una dimensión
2D	Dos dimensiones
AACT	Antiquimiotripsina
ACN	Acetonitrilo
AE	Angina estable
AI	Angina inestable
ATT	α -1 antitripsina
BNP	Péptido natriurético proB
BR	Buffer de resuspensión
BSA	Solución de albúmina de bovino
CHAPS	3-(cloroamido propil)-dimetilamonio-1 propanosulfato
cLDL	Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
CPK-MB	Creatin fosfoquinasa fracción MB
DTT	Ditiotreitol
EKG	Electrocardiograma

ESI	Ionización suave electrospray
FAB	Ionización por bombardeo con átomos rápidos
FD	Desorción por campo eléctrico
FT	Transformada de Fourier
Hb	Hemoglobina
HCII	Cofactor II de la heparina
Hp	Haptoglobina
HUS	Hospital Universitario de Santander
IAM	Infarto agudo del miocardio
IC	Instituto del corazón
I-CAM	Moléculas de adhesión vascular intercelular
ICR	Analizadores de resonancia ciclotrónica de iones
IEF	Isoelectroenfoque
Ig	Inmunoglobulina
LC	Cromatografía líquida
LDL	Lipoproteína de baja densidad

Lpa	Apolipoproteína
m/z	Masa por unidad de carga
MALDI	Desorción de iones por láser asistida por matriz
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteasas matriciales
MS	Espectrometría de masas
MS (GC/MS)	Sistemas acoplados para cromatografía de gases
NSTEMI	Infarto agudo del miocardio sin supradesnivel
P	Precipitado
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAPP-A	Proteína A del plasma
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Proteína C reactiva
pl	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
PR	Fase reversa

PZ	Proteína Z
Q	Analizadores de cuadrupolo
QIT	Trampa de iones cuadrupolar
S	Sobrenadante
SCA	Síndrome coronario agudo
SDS	Dodecil sulfato sódico
-SH	Grupos tioles
SIMS	Espectrometría de masas de iones secundarios
S-S	Puentes disulfuro
SSA	Proteína amiloide del suero
TEMED	“Tetramethylethylenediamine”
TFA	Ácido trifluoroacético
TOF	Analizadores de tiempo de vuelo
t-PA	Activador tisular del plasminógeno
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UV	Ultra violeta

V-CAM

Moléculas de adhesión vascular celular

RESUMEN

Título:

*Análisis proteómico en plasma de pacientes con síndrome coronario agudo.**

Autor:

Yenny Bueno Duarte **

Palabras clave:

Análisis proteómico, electroforesis de proteínas 2D, Síndrome coronario agudo.

Descripción:

Las dificultades que se presentan al establecer la gravedad de las afecciones coronarias que muestran los pacientes con síndrome coronario agudo (SCA) sin elevación del segmento ST; nos permitieron plantear la importancia que representarían en el diagnóstico, pronóstico y en el entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad; las proteínas con niveles de expresión alterados, que puedan ser identificadas en el plasma de estos pacientes. Por ello, se comparó la expresión de proteínas en el plasma de diez pacientes con infarto agudo del miocardio (NSTEMI), diez pacientes con angina inestable (AI) y diez pacientes sanos tomados como control. La separación de proteínas se realizó usando herramientas proteómicas como: electroforesis bidimensional (2D-PAGE). Posteriormente, el análisis de los mapas proteicos se llevó a cabo mediante el software PD-QUEST versión 8.0.1 (Biorad) y finalmente, se determinó la identidad de las proteínas de interés por medio de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS); y las bases de datos especializadas de proteínas, haciendo uso de los motores de búsqueda Phenyx y Sequest, respectivamente. Las manchas identificadas inequívocamente, que presentaron niveles de expresión aumentados en los pacientes con NSTEMI, con respecto a los demás pacientes analizados, fueron: la haptoglobina, la antitrombina y una "proteína no caracterizada". Por otro lado se identificaron isoformas de la α 1-Antiquimiotripsina, cuyos niveles de expresión fueron menores en los pacientes con SCA con respecto a los controles.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Salud – Escuela de Medicina – Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas – Director TORRES SÁEZ, Rodrigo Gonzalo.

SUMMARY

Proteomics analysis in plasma of patients with acute coronary syndrome*

Author:

Yenny Bueno Duarte**

Keywords: Proteomic analysis, 2D protein electrophoresis, acute coronary syndrome.

Description:

The difficulties encountered in establishing the severity of coronary artery disease shown by patients with non-ST elevation acute coronary syndrome (ACS), we were allowed to raise the importance of voice at diagnosis, prognosis and information on the physiological of proteins with altered expression levels, which can be identified in the plasma of these patients. Therefore, we compared the expression of proteins in the plasma of ten patients with acute myocardial infarction (NSTEMI), ten patients with unstable angina (UA) and ten healthy patients taken as control. Protein separation was performed using proteomics tools such as two-dimensional electrophoresis (2D-PAGE). Subsequently, the protein map analysis was performed using PD-QUEST software (Biorad) and finally determined the identity of the proteins of interest by liquid chromatography with *tandem* mass spectrometry detection (*LC-MS/MS*) using *NCBI* and two different search engines, namely PHENYX and SEQUEST, respectively for the identification and characterization of proteins and peptides. The unequivocally identified spot that showed increased expression levels in patients with NSTEMI, with respect to the other two patients were haptoglobin, antithrombin and an "uncharacterized protein." Also identified some isoforms of α 1-Antiquimiotripsina, whose expression levels were lower in ACS patients compared to controls.

* Thesis

** Faculty of Health –School of Medicine– Mastery in Basic Biomedical Science – Director
TORRES SÁEZ, Rodrigo Gonzalo.

INTRODUCCIÓN

El fallecimiento de más de 15 millones de personas en el mundo a causa de enfermedades coronarias, hace que esta enfermedad sea considerada la pandemia más importante del siglo XXI. Las estadísticas publicadas por el Ministerio de Protección Social, muestran que en Colombia los Síndromes coronarios agudos (SCA) son la principal causa de muerte tanto en hombres como en mujeres mayores de 45 años, superando incluso las muertes violentas o las producidas por los diferentes tipos de cánceres (Beltrán y col., 2008).

Dentro de los SCA cobran especial interés aquellos pacientes que no presentan registros de supradesnivel en el electrocardiograma; en este caso los marcadores bioquímicos son los que establecen la gravedad de la afección, al discriminar entre un Infarto agudo del miocardio (NSTEMI) o una Angina inestable (AI) (cuadro clínico menos grave) (Antman y col., 2000). No obstante, la baja especificidad de los marcadores bioquímicos disponibles y el tiempo que tardan en elevar sus niveles en el plasma, contribuye al aumento de los índices de mortalidad y los gastos médicos (Rubio, 2003).

Los avances en el conocimiento de la fisiopatología de los SCA, sugieren que se trata de una enfermedad multifactorial, donde intervienen diversos factores genéticos, inmunológicos e inflamatorios; además de los factores de riesgo que favorecen el progreso de la arterioesclerosis y por ende el desarrollo de los SCA (Vilariño y col., 2004; Morrow y col., 2003). En la actualidad, los estudios se dirigen hacia encontrar moléculas, enzimas o proteínas que se relacionen con un estado patológico o normal, y para ello se han desarrollado herramientas proteómicas, como la electroforesis bidimensional 2D-PAGE, la espectrometría de masas y el análisis bioinformático (Issaq y col., 2008). El conocimiento de los mecanismos

que están involucrados en el desarrollo de los SCA, sumado al uso de las estrategias proteómicas, constituyen un buen escenario en la búsqueda de proteínas que podrían ser candidatos a marcadores bioquímicos de los SCA sin supradesnivel.

Por ello, en este estudio se estudia la expresión diferencial de proteínas, mediante electroforesis bidimensional 2D PAGE, espectrometría de masas (LC-MS/MS) y bioinformática, del plasma de 20 pacientes con SCA sin supradesnivel ((10) NSTEMI y (10) AI en la fase aguda), y un grupo de 10 pacientes sanos tomados como controles. Estas proteínas diferencialmente expresadas podrían ser candidatos a marcadores bioquímicos de la enfermedad, contribuyendo de esta manera a establecer el diagnóstico y por ende mejorar el tratamiento de los pacientes con SCA sin supradesnivel.

1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES



1.1 LA ENFERMEDAD CORONARIA

“En la actualidad, la enfermedad coronaria se considera la pandemia más importante del siglo XXI. Se calcula que en 1996 fallecieron en el mundo 15 millones de personas por enfermedades cardiovasculares, lo que representa 29% de la mortalidad total. Por otra parte, la aterosclerosis y sus complicaciones son la principal causa de mortalidad y morbilidad en los países desarrollados. En Estados Unidos 60 millones de adultos padecen de enfermedades cardiovasculares, lo cual representa un 42% de las muertes que se presentan en un año y costos económicos en tratamientos que ascienden a \$218 billones de dólares. Sin embargo, de acuerdo con datos de la OMS, el número absoluto de muertes atribuibles a enfermedad cardiovascular es mayor en países en vías de desarrollo en comparación con los más desarrollados (9 vs. 3 millones) (*Organización Mundial de la Salud: Reporte de morbilidad y mortalidad 2003*).

Estadísticas publicadas por el Ministerio de Protección Social muestran que en Colombia la enfermedad isquémica del corazón es la principal causa de muerte tanto en hombres como en mujeres mayores de 45 años, superando incluso las muertes violentas o las producidas por los diferentes tipos de cánceres. Los departamentos con mayores tasas de mortalidad por enfermedad coronaria (datos del 2008) fueron en su orden: Caldas, Boyacá, Quindío y Tolima, y las menores fueron en Guainía y Vaupés” (Beltrán y col., 2008).

1.1.1 **La arterioesclerosis** El desempeño eficiente del músculo cardíaco está condicionado al aporte continuo de oxígeno, esta contribución la obtiene de la sangre que viaja a través de las arterias coronarias. La *arterioesclerosis* o acumulación durante años de depósitos de naturaleza lipídica y la posterior formación de placas de ateroma en las paredes arteriales; provoca el engrosamiento y endurecimiento de la pared vascular. La erosión y ruptura de estas placas ocasionan la formación de un trombo o coagulo que impide el flujo sanguíneo a través de la arteria, provocando isquemia o deficiencia de oxígeno, lo cual es la causa de los *Síndromes coronarios agudos (SCA)*. (Parmet 2004) (Fig.1).

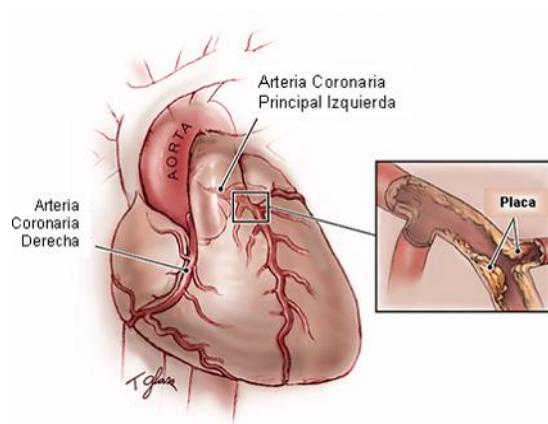


Figura 1.1. Representación del corazón humano y sus arterias. Se muestra en detalle la formación de placa de ateroma en la arteria coronaria izquierda. Tomada de Parmet S, Glass TJ, Glass RM. JAMA 2004; 292: 254.

La *arterioesclerosis* es una enfermedad lentamente progresiva que comienza en la infancia y tiene su máxima incidencia de los 45 y 60 años. El desarrollo de la arterioesclerosis presenta dos etapas evolutivas bien definidas. Las fases iniciales de formación de la placa de lípidos en las arterias, y la ruptura y posterior trombosis de la placa ya formada, que da lugar a la angina inestable, el infarto del miocardio y la muerte súbita (Zarco, 1996).

“El proceso aterosclerótico presenta como síntoma patológico inicial la disfunción endotelial; cuando el endotelio funciona normalmente, es un órgano de un trillón de células que producen más de 60 moléculas que contribuyen a la homeostasis vascular mediante la regulación de la vasodilatación arterial, la inflamación, la proliferación celular, y la modulación de la trombosis-fibrinólisis. Un endotelio disfuncional genera un entorno caracterizado por inflamación, proliferación y estado pro-trombótico que favorece la instalación de la aterosclerosis” (Weiss y col., 2002; Fuster y col., 1991).

1.1.2 Formación de la placa de ateroma Las células endoteliales disfuncionales expresan moléculas de adhesión celular como selectinas (moléculas de adhesión vascular celular [V-CAM] e intercelular [I-CAM]), sintetizan y liberan citoquinas inflamatorias y proteínas quimiotácticas que contribuyen a la migración y penetración de monocitos y linfocitos T en la pared arterial (Cybulsky y col., 2001). Una vez adheridos e introducidos en la íntima arterial, los leucocitos participan del proceso inflamatorio, lo retroalimentan y perpetúan, transformándose en macrófagos que expresan receptores (receptores recolectores) que fagocitan las lipoproteínas especialmente modificadas por la oxidación (LDL oxidadas). Aparentemente no existe un mecanismo que regule el proceso de fagocitosis de lipoproteínas en los macrófagos, lo cual induce su degradación y posterior transformación en células espumosas, (*foam cells*) responsables de la aparición de estrías grasas (Hansson, 2005). Un estudio del contenido de macrófagos en el tejido de la placa coronaria realizado a pacientes con síndrome coronario agudo (SCA) estables e inestables, concluyó que aquellas áreas ricas en macrófagos son mayormente encontradas en pacientes con angina inestable e infarto agudo del miocardio sin elevación del segmento ST (Moreno y col., 1994).

Finalmente, la lesión progresa con la migración alrededor del núcleo lipídico de las células musculares lisas de la pared arterial, que posteriormente conformarán la

capa fibrosa de la placa de ateroma con la producción de proteínas de matriz como elastina, colágeno y proteoglicanos. Aunque estas proteínas refuerzan la placa y la protegen de la ruptura, se ha determinado que en placas vulnerables los linfocitos T liberan interferón gamma en el seno de la placa, que inhibe la síntesis de colágeno por las células musculares lisas de la pared arterial, lo que limita su capacidad de renovar el colágeno que refuerza la cubierta de la placa haciéndola más frágil y susceptible a la ruptura (Falk y col., 1995; Gensini y col., 2002; Vilariño y col., 2004).

1.1.3 Ruptura de la placa La ruptura de la placa de ateroma se presenta por diversos factores. Se ha destacado la influencia de factores mecánicos que producen la ruptura y/o desgaste de la placa debido al impacto del flujo sanguíneo sobre ésta; y factores biológicos, concernientes a la inflamación y a la apoptosis de las células del tejido muscular liso (Gutstein 1999; Bauriedel y col., 1999; Göran y col., 2005).

El proceso inflamatorio además de ser el promotor de la iniciación, progresión y posterior vulnerabilidad de las lesiones ateroscleróticas; contribuye decisivamente a la precipitación de las complicaciones trombóticas producto de la ruptura de la placa de ateroma. El macrófago activado, muy abundante en el ateroma, puede producir enzimas proteolíticas, como las metaloproteinasas matriciales (MMP), familia de más de 20 componentes que incluye colagenasas, gelatinasas y elastasas; capaces de degradar los componentes de la capa fibrosa protectora del ateroma, adelgazándola y debilitándola. (Loftus y col., 2002; Dobaczewski y col., 2010). “Con la ruptura o erosión de una placa aterosclerótica, la matriz subendotelial (núcleo lipídico, colágeno y factor tisular) queda expuesta a la sangre circulante y sobreviene la formación de un trombo no oclusivo rico en plaquetas (Fuster 1991). La liberación del factor tisular parece ser el mecanismo por el cual se activa el sistema plasmático de la coagulación, que a través de la

activación del factor X (Xa) origina la formación de trombina, y a su vez tiene un rol central en la trombosis arterial” (Vilariño 2004).

1.1.4 Ruptura de la placa, manifestaciones clínicas El principal mecanismo para la oclusión del flujo es la formación intraluminal de un trombo, pues la exposición del centro lipídico de la lesión y las fibras de colágeno, favorecen la formación del coágulo. La extensión de la exposición de los componentes de la placa, el grado de estenosis y la tendencia del sistema trombolítico son los factores más importantes al establecer el grado de la respuesta trombolítica ante la ruptura de la placa de ateroma. Si bien el tamaño de una placa es importante, no lo es menos su morfología y su tendencia a la ruptura y la trombosis. En definitiva, la presentación clínica depende de la magnitud y lo abrupto de la ruptura de la placa, el tamaño del trombo, la vasoconstricción local y por ende, la duración de la obstrucción flujo sanguíneo (Falk y col., 1995; Antman y col., 2000; Gensini y col., 2002).

Adicionalmente, en la actualidad se considera la existencia de pacientes vulnerables que presentan de manera difusa placas, sangre y miocardio vulnerables (Beltrán y col., 2008). Además de otros factores, cuya presencia está asociada con un incremento de la trombogenicidad de la sangre, como la elevación de los niveles séricos del cLDL, el hábito tabáquico, la hiperglucemia y la hemostasia, entre otros (Vilariño y col., 2004).

1.1.5 Síndrome coronario agudo. El conjunto de manifestaciones de cardiopatía isquémica o insuficiencia coronaria, que tienen como causa común la disminución del aporte de sangre al miocardio, producto de la obstrucción parcial o total de las arterias coronarias, generalmente causada por placas de ateroma (por sí mismas o por la trombosis provocada por su ruptura), constituye los síndromes coronarios agudos (SCA) y comprende tres grupos de afecciones: *angina de*

pecho inestable, cuando la isquemia no llega a provocar necrosis en el tejido miocárdico; el *infarto agudo de miocardio*, cuando la isquemia produce necrosis en una porción del miocardio; y la *muerte súbita*, cuando los impulsos eléctricos del corazón se alteran (taquicardia y/o fibrilación ventricular) provocando el paro cardíaco” (Mumarriz, 2009).

1.1.6 Clasificación Actualmente, los criterios de diagnóstico en un SCA se han atribuido mayormente, al aumento en los marcadores bioquímicos de daño miocárdico y las alteraciones en el electrocardiograma; especialmente en el tramo existente entre el final del complejo QRS y la onda T (segmento ST). La desviación del segmento ST respecto a la línea base, es considerada como el mejor indicador no invasivo para evaluar la presencia de un trastorno isquémico (González 2004). De acuerdo a esto y a las diferencias en la extensión y duración de la isquemia que resulta de la obstrucción del flujo coronario; los diferentes SCA se han clasificado en: SCA con elevación del segmento ST y SCA sin elevación de dicho segmento. El SCA con elevación del segmento ST, comprende el Infarto Agudo del Miocardio (IAM), que implica irrigación sanguínea deficiente, daño tisular en una parte del corazón y tratamiento de reperfusión urgente. El SCA sin elevación de dicho segmento, incluye la angina inestable (AI), que no compromete daño en el tejido cardíaco y se considera un estado transitorio que finalmente produce angina de reposo; y el Infarto Agudo del Miocardio sin elevación del segmento ST (NSTEMI). La presentación clínica de los SCA sin elevación del ST es similar, pero difiere en la severidad. Es decir, en la gravedad de la isquemia a la que fue sometido el músculo cardíaco, y si ésta es lo suficientemente severa como para causar daño en el tejido que pueda ser detectado a través de los marcadores de daño miocárdico (troponina, la creatin fosfocinasa fracción MB (CPK-MB, entre otros). De modo que la elevación en estos marcadores, indicaría que se trata de un NSTEMI. No obstante, el aumento en los niveles de estos marcadores

bioquímicos, puede tardar en elevarse, y el manejo inicial de ambos síndromes (AI, NSTEMI) debe ser idéntico (Antman y col., 2000).

En los centros especializados del corazón en nuestro país, los pacientes con SCA sin elevación del ST son sometidos a terapia de reperfusión, sin establecer si corresponde a un NSTEMI o una AI. Además del incremento en los gastos médicos al realizar esta intervención, este procedimiento se ha asociado con efectos adversos producto de la activación de la cascada inflamatoria que se manifiesta con el deterioro funcional, arritmia y la progresión acelerada de la muerte celular en determinados miocitos heridos (Buja 2005). Mientras tanto, en los hospitales de primer nivel, los pacientes con SCA sin elevación del ST deben esperar los resultados de los marcadores de daño miocárdico, para recibir un tratamiento adecuado. Actualmente, la medición de los niveles de troponina constituye la herramienta de diagnóstico más efectiva. Sin embargo, su uso es limitado, debido a que su medición no se realiza en todos los hospitales y no está cubierto por el Plan Obligatorio de Salud (POS). Sumado a esto, se presentan dificultades en establecer los valores positivos o negativos que determinan el diagnóstico de estos pacientes y en el tiempo necesario para que se presente la elevación de sus niveles en el plasma, lo cual contribuye al aumento de la mortalidad asociada a esta patología (Rubio, 2003).

1.2 MARCADORES BIOQUÍMICOS.

Los avances en el conocimiento de la fisiopatología de los SCA han permitido establecer nuevos biomarcadores, es decir, se ha determinado la presencia de moléculas, proteínas o enzimas cuyos cambios medibles pueden estar asociados al desarrollo de la enfermedad, al funcionamiento cardiovascular adecuado o a una respuesta a un tratamiento o medicamento (Ramachandran, 2006).

La comprensión de los eventos que desencadenan un SCA y la alta incidencia de esta enfermedad; han planteado la necesidad de usar una estrategia de multi-biomarcadores, que permitan apoyar y hacer más eficiente el diagnóstico, principalmente de los pacientes con SCA sin elevación del segmento ST (Morrow y col., 2003). Los hallazgos en el electrocardiograma de los pacientes con SCA con supradesnivel, indican que deben ser sometidos a un procedimiento inmediato dirigido a restablecer el flujo sanguíneo, sin considerar el resultado analítico de los niveles de los marcadores bioquímicos de daño miocárdico. Mientras que, en los SCA sin supradesnivel, la presencia de los marcadores bioquímicos es vital para discriminar entre una angina inestable y un NSTEMI. En el caso de presentarse un NSTEMI, los pacientes requieren, al igual que en el IAM, un tratamiento invasivo para restablecer el flujo sanguíneo. (Antman y col., 2000; Rubio, 2003; Lugo y col., 2006). Han surgido biomarcadores de inflamación, necrosis de los miocitos, estrés hemodinámico, daño vascular, progresión de la arterioesclerosis, entre otros. Estas moléculas constituyen un medio no invasivo, útil en el entendimiento de las causas, consecuencias y repercusión de los SCA. La estrategia de multi-biomarcadores podría convertirse en una gran herramienta que junto a los hallazgos físicos y electrocardiográficos podrían ayudar en la toma de decisiones en cuanto al diagnóstico y tratamiento de los SCA (Morrow y col., 2003; Vivanco y col., 2005). A continuación presentamos algunas de las proteínas más representativas de cada uno de los grupos asociados con enfermedades cardiovasculares.

1.2.1 Biomarcadores de inflamación La inflamación es importante en la patogénesis y progresión de muchas formas de falla cardíaca y sus marcadores proteínicos han sido objeto de intensa investigación. La *proteína C reactiva* es una proteína de fase aguda sintetizada por hepatocitos en respuesta a la citoquina proinflamatoria interleucina 6. La elevación en los niveles de proteína C reactiva desencadena efectos adversos en el endotelio vascular, debido a la reducción en

la liberación de óxido nítrico, el incremento en la producción de endotelina-1 e inducción de expresión de moléculas de adhesión endotelial. Estos descubrimientos sugieren que la proteína C reactiva podría presentar un rol causal en la enfermedad vascular y por tanto convertirse en un blanco terapéutico. Sin embargo, los niveles elevados de proteína C reactiva carecen de especificidad; debido a que infecciones agudas o crónicas, consumo de cigarrillo y los estados inflamatorios activos son frecuentemente asociados con niveles elevados de proteína C reactiva (Göran y col., 2005).

En 1990, Levine y col. describieron niveles elevados de *TNF- α* en pacientes con falla cardiaca. La *TNF- α* y las últimas tres interleucinas (interleucina 1, 6, 18) son consideradas citoquinas proinflamatorias producidas por las células nucleadas en el corazón. La *TNF- α* causa dilatación ventricular izquierda, aparentemente a través de la activación de metaloproteínas. La hipótesis de las citoquinas propone que ante un efecto estresante, como una lesión cardiaca isquémica, se desencadenan respuestas innatas de estrés e incluso elaboración de citoquinas proinflamatorias. El efecto de esas citoquinas está asociado con el deterioro en la función ventricular izquierda, puesto que promueve la formación de la placa de ateroma y por ello, la aceleración de la progresión de la falla cardiaca. Se ha propuesto el uso de inhibidores de Interleucina 18 con el propósito de limitar la progresión y las complicaciones de la arterioesclerosis (Hartford y col., 2010)

1.2.2 Biomarcadores de estrés oxidativo. El estrés oxidativo es producto de un desbalance entre las especies reactivas de oxígeno y los antioxidantes endógenos de los mecanismos de defensa. El desbalance provoca profundo deterioro en la función endotelial y favorece la progresión de la falla cardiaca (Weseler y col., 2010). El estrés oxidativo produce apoptosis o necrosis de los miocitos. Esto está asociado con arritmia y disfunción endotelial. Estas dificultades asociadas a la aparición de estrés oxidativo, han permitido medir los siguientes

marcadores indirectos: *Lipoproteínas de baja densidad oxidadas*, *malondialdehído* y *mieloperoxidasa*. Hay evidencia de que la *xantina oxidasa*, la cual cataliza la producción de dos oxidantes: la *hipoxantina* y la *xantina*, participa en la disfunción endotelial, la hipertensión y en la falla cardíaca (Berry y col., 2004; Braunwald, 2008).

1.2.3 Biomarcadores de remodelamiento de la matrix extracelular. El remodelamiento de los ventrículos desempeña un rol importante en la enfermedad coronaria, debido a que la matriz extracelular provee un esqueleto para los miocitos y determina su tamaño y forma. Normalmente, existe un balance entre las *metaloproteinasas* de la matriz y los *inhibidores de los tejidos de metaloproteinasas*. Un desbalance en este equilibrio está asociado con dilatación ventricular y remodelamiento. Por lo tanto, los marcadores elevados de regeneración de matriz extracelular, por un lado, y de la síntesis de colágeno excesivo; por el otro, son asociados con el deterioro de la función ventricular izquierda. Los marcadores bioquímicos de estos procesos parecen ser objetivos importantes en la terapia de este tipo de enfermedades. Actualmente han sido identificadas 15 metaloproteinasas de la matriz, varias formas de procolágeno y de inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (Loftus y col., 2002).

1.2.4 Biomarcadores de estrés de los miocitos. La tensión del miocardio, la hipoxia tisular y otros factores desencadenantes, generan la liberación de péptidos y proteínas que han sido evaluadas en el diagnóstico de los SCA y actualmente es objeto de intensa investigación el papel que podrían desempeñar en la estratificación del riesgo y predicción de la mortalidad en pacientes con SCA (Rebhi y col., 2010). Dentro de estos péptidos destacamos el péptido natriurético proB, puesto que su expresión no sólo está condicionada al estrés de los miocitos, sino que se ha correlacionado con remodelamiento de la

matriz extracelular, disfunción endotelial y falla cardiaca congestiva (Morrow y col., 2003).

El *Péptido natriurético tipo B (BNP)* es un péptido que actúa como una neurohormona y se segrega en los ventrículos y los tejidos auriculares como respuesta a la dilatación volumétrica y a la sobrecarga de presión. Esta prohormona de 108 aminoácidos es procesada por una proteasa que libera una molécula madura de 32 aminoácidos y un fragmento amino-terminal. Las dos formas del péptido circulan en el plasma y están presentes en altas concentraciones en pacientes con hipertrofia ventricular o falla cardiaca congestiva, lo cual lo convierte en una herramienta útil en el diagnóstico de disfunción ventricular (Levin 1998; Rebhi y col., 2010; Kim y col., 2010). Adicionalmente, cinco estudios robustos han reportado asociación en los niveles plasmáticos del BNP y/o NT.proBNP con el riesgo a corto y largo plazo de sufrir un SCA, incluso en aquellos pacientes que no presentaban antecedentes cardiovasculares (De Lemos y col., 2001; Omland y col., 2002; Jernberg y col., 2002; James y col., 2003; Morrow y col., 2003).

1.2.5 Biomarcadores de lesión de los miocitos. La lesión de los miocitos resulta de la isquemia severa, pero también es consecuencia del proceso inflamatorio, el estrés oxidativo, la apoptosis de las células del músculo liso y la activación neurohormonal. Las proteínas liberadas en este proceso constituyen los marcadores bioquímicos que actualmente se utilizan en la práctica clínica, teniendo en cuenta la relación directa que presentan con el daño necrótico en el tejido cardiaco. A continuación se describen los tres marcadores de lesión de los miocitos más utilizados:

- ✦ Las *Troponinas* son proteínas globulares formadas por un complejo de tres subunidades, que se integran en la contracción muscular. Las *troponinas* se

liberan cuando se lesiona el músculo cardíaco y constituyen un marcador específico y la mejor prueba diagnóstica que indica un infarto del miocardio. Sin embargo, el mayor inconveniente radica en el tiempo necesario para su aparición (Bardaji y col., 2005; Latini, 2008).

- ✱ La *creatinfosfoquinasa (CPK)*. Es una enzima intracelular. Se encuentra en el músculo esquelético, cardíaco y cerebro. Un aumento en la concentración en el suero, es índice de lesión celular. La extensión y gravedad de la lesión determinarán la magnitud de la elevación, valores por encima de 0,1-0,4 ng/ml son predictores independientes de mortalidad e infarto en pacientes con angina inestable. El incremento de CPK puede producirse en numerosas situaciones no isquémicas, tales como la pericarditis, daño muscular esquelético y fracaso renal (Soler 2007).

- ✱ La *mioglobina*. Es una proteína presente en el músculo esquelético y cardíaco. Cuando se presenta un daño en el músculo, la mioglobina es liberada en el torrente sanguíneo y finalmente es excretada por la orina. El rango normal es de 0 a 85 ng/ml, niveles mayores indican NSTEMI, inflamación, sangrado, isquemia y/o trauma del músculo cardíaco, entre otros (Rubio, 2003).

Finalmente, la tabla 1.1 expone una relación de los marcadores Bioquímicos más utilizados; relacionando el tiempo necesario para el inicio de la elevación de sus niveles, las ventajas y los inconvenientes de su uso en el diagnóstico de los SCA sin elevación del segmento ST.

Tabla 1.1. Marcadores Bioquímicos en SCA. Marcadores de lesión de los miocitos más usados en la práctica clínica.

Marcador	Inicio de la elevación (Horas)	Duración (Horas)	Ventajas	Inconvenientes
Troponina	3-12	120-360 120-240	Mayor sensibilidad y especificidad Utilidad pronóstica y de selección terapéutica	Baja sensibilidad en fase precoz (<6h) Baja sensibilidad para detección de reinfartos pequeños
CPK mb	3-12	48-72	Detección de reinfartos	Baja especificidad Baja sensibilidad para IAM precoz o daño pequeño
Mioglobina	1-4	24	Sensibilidad alta Detección precoz Resultado negativo: descarta IAM	Muy baja especificidad

1.2 PROTEÓMICA

La fisiopatología del Infarto agudo del miocardio sin supradesnivel, demuestra que ésta es una enfermedad multifactorial, inflamatoria e inmunológica. Adicionalmente, se presentan dificultades al establecer la gravedad de la afección cuando se presenta un SCA sin supradesnivel, como consecuencia, entre otras, de la baja sensibilidad y especificidad de los marcadores bioquímicos utilizados actualmente. Esto confirma la necesidad de realizar estudios encaminados a encontrar posibles candidatos a marcadores bioquímicos de los SCA sin elevación del segmento ST.

La proteómica es una herramienta de análisis que se encarga del estudio de proteomas (conjunto de proteínas expresada por una célula, tejido u organismo) y del análisis de los cambios cuantitativos y las modificaciones postraduccionales de las proteínas en la célula. Cualquier cambio o modificación en la expresión de una proteína, asociada con una enfermedad o con un tratamiento, en dos o más estados de una célula o un organismo; tiene el potencial de ser un biomarcador. El interés en las estrategias proteómicas para la identificación de biomarcadores se ha incrementado en los últimos años, debido a que proporcionan información sobre el diagnóstico, pronóstico y terapia de diversas enfermedades. Para analizar e identificar el proteoma de cualquier organismo se dispone de un amplio abanico de instrumentación para la separación e identificación de proteínas. La proteómica se basa principalmente en tres metodologías: electroforesis bidimensional, espectrometría de masas y bioinformática:

1.3.1 Electroforesis bidimensional. Uno de los mayores desafíos de los análisis de proteomas es el fraccionamiento reproducible de esas mezclas complejas de proteínas conservando al mismo tiempo la relación cuantitativa y cualitativa. Actualmente, la electroforesis en dos dimensiones en geles de poliacrilamida (2-D PAGE) es el único método que puede utilizarse en esta tarea. Mediante esta técnica es posible resolver más de 2000 proteínas en un único gel, lo cual la convierte en una herramienta importante en investigaciones proteómicas, donde múltiples proteínas deben ser separadas en análisis paralelos (Issaq y col., 2008).

La *electroforesis bidimensional* 2DE, es una técnica de separación ortogonal en la que las proteínas son separadas por dos principios fisicoquímicos; primero dependiendo de su punto isoeléctrico (isoelectroenfoco (IEF)) y posteriormente por su masa molecular haciendo uso del detergente dodecil sulfato sódico (SDS). Ambos procedimientos se llevan a cabo en geles de poliacrilamida (Langen y col.,

1997). El procedimiento comprende cuatro etapas: *preparación de la muestra, separación por isoelectroenfoque, separación por peso molecular y tinción.*

- ✚ Los *métodos de preparación de la muestra* permiten debilitar las estructuras secundarias de las proteínas que impiden la movilidad y aumentar su solubilidad. Los métodos de preparación de la muestra van desde la extracción por solubilización con soluciones simples a complejas mezclas de agentes caotrópicos, detergentes y agentes reductores.

- ✚ La *separación por isoelectroenfoque* se basa en la diferencia en el punto isoeléctrico de las proteínas. Cuando una proteína se pone en un medio con un gradiente de pH y se somete a un campo eléctrico, ésta se desplaza a través del electrodo con carga opuesta hasta su individual y característico punto isoeléctrico. El enfoque es un mecanismo (estado-equilibrio) con respecto al pH, donde las proteínas migran a su posición de (estado-equilibrio) desde cualquier parte del sistema y la mantienen por largos periodos de tiempo. En contraste, las proteínas en electroforesis convencional, continúan moviéndose a través del medio hasta que el campo eléctrico sea removido.

- ✚ La *separación de acuerdo con el peso molecular* se basa en la propiedad que poseen las proteínas, de migrar a través de un gel o una matriz de naturaleza porosa, en presencia de un campo eléctrico. La electroforesis con SDS-PAGE es un excelente método para identificar, monitorear y determinar el peso molecular de las subunidades de proteínas durante un proceso de purificación. El detergente aniónico sodio dodecil sulfato se une a las proteínas por absorción no específica (aproximadamente una molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácidos, con una relación SDS/proteína máximo de 1,4 g/g). El SDS desnatura por completo las proteínas y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria.

Independientemente de la composición aminoácida y la secuencia de la proteína, el SDS quita la carga de las proteínas y les confiere una carga negativa proporcional a su masa, permitiendo que todas las proteínas viajen al ánodo (Laemmli 1970).

- Finalmente, las proteínas deben ser visualizadas mediante un método de *tinción* adecuado de acuerdo a la concentración de éstas en la muestra de interés. La tinción con azul de Coomassie es útil en muestras con alta concentración de proteínas. Proteínas menos abundantes, desde 1ng de proteína, pueden ser visualizadas mediante tinción con plata y tinción fluorescente. (Görg y col., 2004). En la figura 1.2, se muestra el esquema de un análisis de proteómica diferencial.

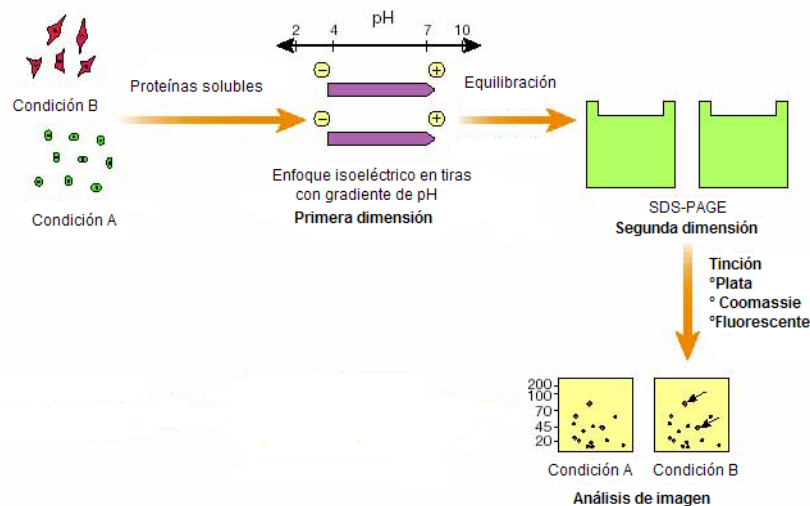


Figura 1.2. Representación esquemática de la electroforesis bidimensional. Tomada de http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs02-03/A_Ramos/2d.html

1.3.2 Espectrometría de masas. La identidad inequívoca de las proteínas separadas mediante electroforesis bidimensional (2D-PAGE), que constituyen un

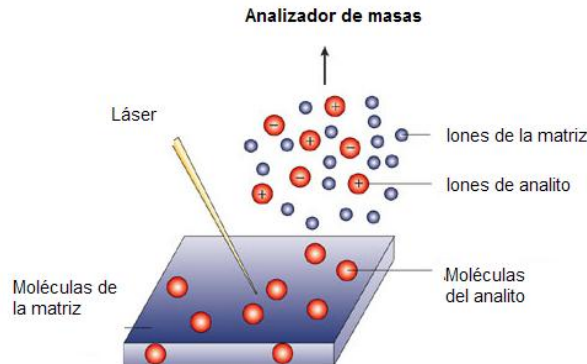
blanco de interés para una patología o un tratamiento en particular, puede ser establecida mediante espectrometría de masas.

Fundamentalmente, la MS mide la relación masa-carga (m/z) de los iones en fase gaseosa. Los espectrómetros de masas consisten en una fuente de iones que convierte las moléculas de analito en iones en fase gaseosa, un analizador de masas que separa los analitos ionizados sobre la base de la relación m/z , y un detector que registra el número y el valor m/z de los iones. El desarrollo de técnicas de ionización suave, como la ionización por electrospray (ESI) y la desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI), revolucionaron el análisis de proteínas mediante espectrometría de masas (MS). El analizador de masas es fundamental para la tecnología MS. Para la investigación proteómica, cuatro tipos de analizadores de masas se utilizan comúnmente: cuadrupolo (Q), trampa de iones (trampa de iones cuadrupolo QIT; trampa de iones lineal, o LTQ LIT), analizador de masas tiempo de vuelo (TOF) analizador de masas, y analizador de masas de Transformada de Fourier resonancia ion-ciclotrón (FTICR). (Karas y col., 1988)

1.3.3 Espectrometría de masas en análisis proteómicos

El analizador de masas de mayor uso en los análisis proteómicos es el analizador de tiempo de vuelo (TOF, Time-Of-Flight), en el que los iones formados mediante el láser se separan en función de su relación masa-carga tras ser acelerados en un campo eléctrico, que posteriormente los dirige al analizador de masas (tubo de vuelo). Las diferencias de energía iniciales son corregidas mediante el reflector (o espejo de iones) y los iones llegan al detector, que contiene un fotomultiplicador que amplifica la señal o en un analizador TOF/TOF que proporciona un mejor enfoque de los iones y, por tanto, mayor resolución y precisión másica.

A.



B.

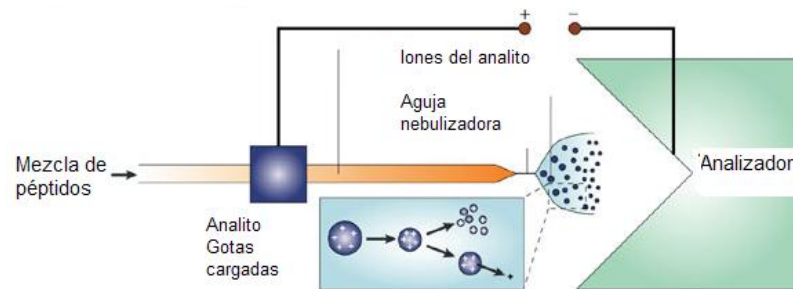


Figura 1.3. Métodos de ionización suave. A. Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (**MALDI**). **B.** Electrospray (ESI) **ESI**. Tomada de *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 699-711 (September 2004).

En el primer TOF los iones son acelerados a bajo voltaje, favoreciendo la fragmentación metaestable. Mediante un pulsador se selecciona un determinado ión padre, cuya entrada a la cámara de colisión es regulada por la puerta de iones (sólo pasarán aquellos que tengan la relación m/z que haya sido seleccionada previamente). En la cámara de colisión los péptidos se fragmentan y son acelerados por un nuevo campo eléctrico que los dirige al segundo analizador de masas (TOF tiempo de vuelo). Finalmente, las diferencias de energía iniciales son corregidas mediante el reflector (o espejo de iones) y los iones llegan al detector, que contiene un fotomultiplicador que amplifica la señal (figura 1.3).

1.3.4 Identificación de Proteínas. En un análisis proteómico pueden ser analizadas las proteínas mediante espectrometría de masas utilizando diferentes procedimientos; de acuerdo con la complejidad de la muestra y la abundancia de aquellas proteínas expresadas diferencialmente. Si las proteínas de interés forman una muestra compleja de concentración apreciable, la separación por electroforesis 1D o 2D PAGE puede ser de gran utilidad. Una vez separadas, las proteínas deben ser extraídas del gel. La extracción puede realizarse manualmente o con un robot para evitar manipulación del gel y la posible contaminación con queratinas. Posteriormente, se lleva a cabo la digestión de las proteínas mediante una proteasa específica (generalmente tripsina porcina), que genera un conjunto de péptidos que pasan a ser analizados por espectrometría de masas siguiendo diferentes metodologías:

Los péptidos resultantes de la digestión de proteínas se depositan sobre una placa MALDI junto con una matriz química (α -ciano-4-hidoxicinámico). Las muestras depositadas se analizan mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF, obteniéndose un espectro de masas (MS) denominado “Huella Peptídica”. Adicionalmente, se obtienen espectros de fragmentación (MS/MS) de las 3-5 masas mayoritarias dentro de cada una de las huellas peptídicas. La identificación de proteínas se realiza automáticamente mediante el sistema GPS (Global Protein Server) acoplado a los datos del TOF-TOF, combinando ambos tipos de espectros (MS-MS/MS) obtenidos para cada muestra y usando como motor de búsqueda MASCOT (MatrixScience, UK) sobre bases de datos públicas de secuencias de proteínas. (Pusch y col., 2003; Raczyński y col., 2010).

Si las proteínas de interés están presentes en bajas concentraciones y forman parte de fracciones obtenidas de separaciones cromatográficas o constituyen un extracto proteico que contiene mezcla de proteínas; el análisis comenzaría llevando a cabo una limpieza de la muestra, seguida de la desnaturalización,

reducción, alquilación y digestión, mediante una enzima, de la muestra de proteínas.

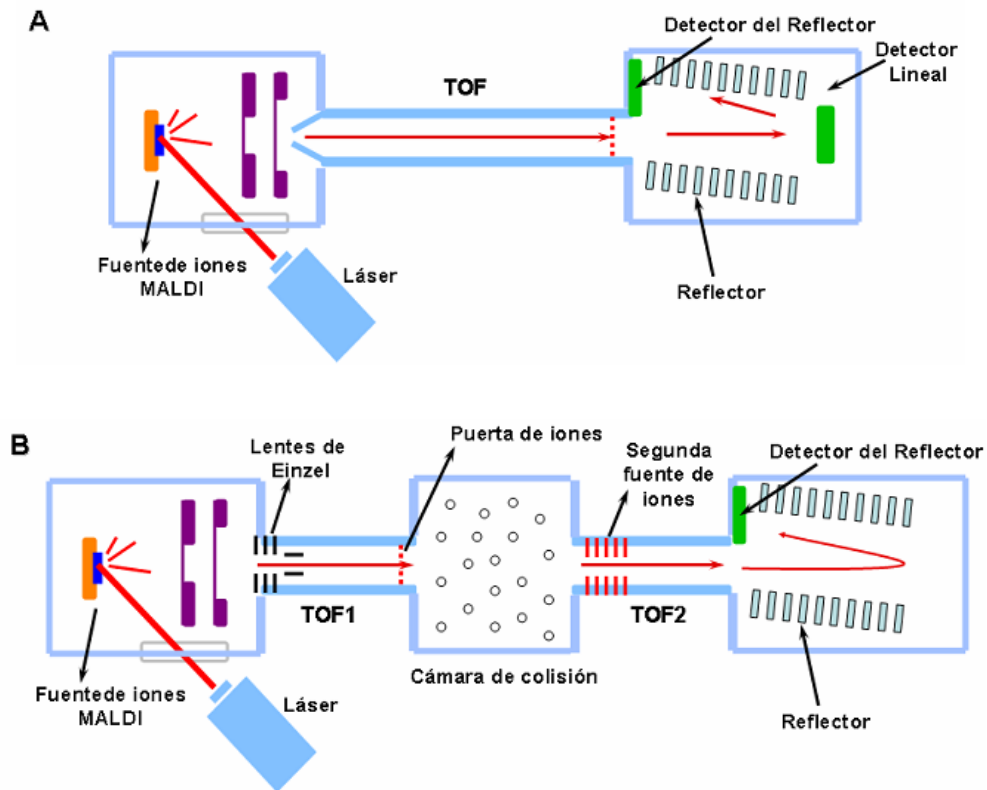


Figura 1.4. (A) Representación esquemática de un espectrómetro de masas de tipo MALDI-TOF. (B) Representación esquemática de un espectrómetro de masas de tipo MALDI-TOF-TOF.

Los péptidos obtenidos de la digestión de proteínas son separados por cromatografía líquida (separación cromatográfica de fase reversa en un nanoHPLC ó LC 2D: separación cromatográfica de intercambio catiónico fuerte (SCX) en un microHPLC, seguida de una separación cromatográfica de fase reversa en un nano-HPLC). Una vez separados los péptidos se analizan en un espectrómetro de masas tipo Trampa de Iones con fuente de ionización de electrospray (ESI) o electronebulización. En este caso, se obtienen espectros de

fragmentación de cada una de las masas que detecta el espectrómetro de masas. Estas técnicas permiten el análisis en tiempo real de péptidos individuales presentes en la mezcla mediante la fragmentación de los mismos y la obtención de espectros de fragmentación o espectros MS/MS de manera mucho más efectiva que en el análisis por MALDI-TOF/TOF. La identificación de proteínas se realiza, de igual forma que el apartado anterior, sobre bases de datos públicas de secuencias de proteínas (Xuemei Han 2008).

1.4 LA PROTEÓMICA DEL PLASMA HUMANO

El plasma contiene alta abundancia proteica. Sus proteínas se clasifican en: proteínas mayoritarias como inmunoglobulinas, haptoglobulinas, y transferinas; proteínas producidas por las células circulantes de la sangre y proteínas liberadas al torrente sanguíneo por diferentes tejidos. La presencia de estas proteínas en el plasma demuestra que este fluido contiene información sobre el estado de diferentes sistemas del organismo. Además, es una muestra apropiada, de fácil obtención y no invasiva; lo que la convierte en un fluido útil desde el punto de vista clínico y de monitoreo de la presencia de biomarcadores.

La presencia de aquellas proteínas abundantes del plasma que representan aproximadamente el 70% del contenido proteico total, podría dificultar la detección de proteínas minoritarias. Ante esta dificultad metodológica se han desarrollado diversos procedimientos, que van desde compuestos que favorecen la precipitación de las proteínas abundantes hasta métodos de cromatografía de afinidad para retirar proteínas específicas, que facilitan el análisis del plasma mediante 2D-PAGE. Estos avances aportan nuevas perspectivas al análisis de proteínas del plasma como herramienta para la búsqueda de biomarcadores (Jiang 2003, Chen 2005, Tu 2010)

No obstante, se han realizado diversos estudios en enfermedades crónicas, con el objetivo de encontrar proteínas que puedan servir como biomarcadores y/o blancos terapéuticos para el diseño de fármacos. Igualmente, se ha determinado que además de las proteínas abundantes del plasma, este fluido contiene proteínas liberadas por los tejidos, citoquinas, diversos péptidos y proteínas pequeñas. En general, el 50% de proteínas en el plasma presentan pesos aproximados de 45 KDa. La figura 1.5 muestra 70 proteínas identificadas en el plasma y su abundancia relativa. (Antman y col., 2000; Anderson y col., 2002; Crosley y col.,2009; Zolla 2008; Kullolli y col.,2010; Leth-Larsen y col.,2010).

A pesar de la importancia del plasma como fluido para conocer la regulación celular como respuesta a enfermedades o medicamentos, son pocos los estudios de expresión de proteínas en el plasma de pacientes con SCA. En 2004, Mateos y colaboradores, realizaron análisis proteómicos del plasma en 19 pacientes con SCA, distribuidos en dos grupos: pacientes con Infarto Agudo al Miocardio (IAM) y Angina Inestable (AI). Una de las observaciones más importantes, fue la determinación de diferentes isoformas de α -1 antitripsina (ATT) que presentaron cambios durante el SCA. Estos investigadores encontraron siete diferentes isoformas en los pacientes control. La isoforma 1 no se encontró en los pacientes con SCA y se presentó una significativa reducción en las isoformas 5, 6 y 7 en pacientes con IAM comparados con aquellos con AI. Como el ATT es un poderoso inhibidor de muchas enzimas proteolíticas, se pudo establecer que en ausencia de suficiente cantidad de ATT en las infecciones del tracto respiratorio, se presenta un incremento en la carga de los factores proinflamatorios.

Asimismo, se identificaron 3 isoformas diferentes de la cadena gamma del fibrinógeno en el plasma de los pacientes con SCA y en los controles. Dos de éstas se incrementaron en los pacientes con AMI comparados con los controles. Estas variaciones en la estructura del fibrinógeno se correlacionan con el riesgo

trombótico. Igualmente, encontraron cinco isoformas de la apolipoproteína A-I en el plasma de los pacientes con SCA y los pacientes control; presentando un aumento en los pacientes con AI con respecto a aquellos con IAM. Esta observación se asoció con la severidad del síndrome coronario. Finalmente, se encontraron incrementos en los niveles de la cadena pesada de la Inmunoglobulina G (IgG) en los pacientes con SCA, cuyo incremento se relaciona con el carácter inflamatorio de los SCA (Mateos y col., 2004).

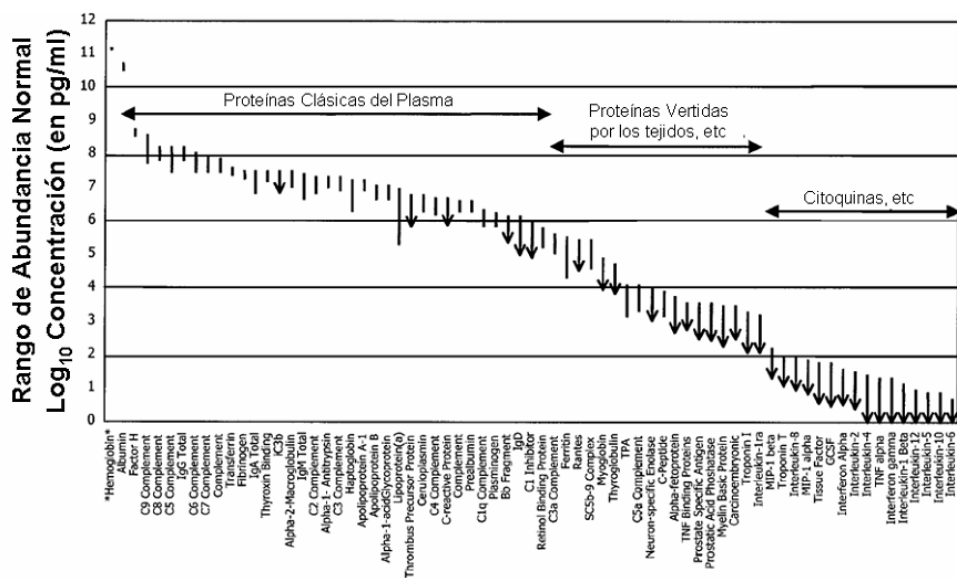


Figura 1.5. Relación de los grupos proteicos del plasma, concentración y proteínas representativas de cada grupo. Tomada de Anderson NL, Anderson NG. Mol. Cel. Proteomics. 2002; 1: 845-67.

Se han realizado estudios de proteínas específicas evaluadas como indicadores pronóstico de SCA. En el 2003 se realizó un estudio en 515 pacientes con SCA sin elevación del segmento ST, en el cual se evaluó el poder predictivo de la Troponina I, la proteína reactiva C, el fibrinógeno y la homocisteína. Se determinó que todos los marcadores bioquímicos analizados predijeron mayores eventos cardiacos como muerte cardiaca o riesgo de sufrir un nuevo infarto al miocardio.

Sin embargo, los marcadores más efectivos que están relacionados con mayores eventos cardiacos fueron la troponina I en concentraciones mayores de 3ng/ml y la proteína reactiva C en concentraciones mayores de 11mg/L (Bodí y col., 2003).

Se han realizado otros estudios en pacientes con SCA sin elevación del segmento ST del electrocardiograma relacionando la presencia de la proteína reactiva C (PCR) y el desarrollo de lesiones coronarias complejas, y los resultados reportados son contradictorios. En 2004 Sanchís y colaboradores, realizaron un estudio a 125 pacientes a los cuales se les midió los niveles de la proteína C reactiva (PCR), troponina y la complejidad angiográfica de la lesión causante del SCA. Como resultado, ellos reportaron asociación entre el aumento de los niveles de PCR, la elevación de la troponina y el grado de complejidad coronaria (Sanchís y col.,2004). En el 2004, Navarro Estrada y colaboradores, realizaron un estudio multicéntrico con 1250 pacientes a los que se les realizó angiografía coronaria y medición de PCR dentro de las nueve horas próximas a la aparición de los síntomas; y encontraron que los niveles altos de PCR no predicen la presencia de ninguno de los componentes de lesión coronaria compleja en los pacientes con SCA sin elevación del ST (Navarro y col., 2004).

Además de los marcadores bioquímicos de amplio uso en la actualidad, se han reportado otras proteínas como predictores de riesgo en pacientes con SCA. En 2004 Laterza y colaboradores, evaluaron las altas concentraciones de proteína A del plasma asociadas al embarazo (PAPP-A), las cuales fueron relacionadas con incrementos en el riesgo de SCA. Para ello, realizaron un estudio en 346 pacientes con síntomas de SCA y encontraron que el 9.5% de pacientes desarrollaron eventos adversos a un corte de concentración de PAPP-A de 0.22 mUI/l. La PAPP-A se mostró como un predictor de eventos adversos con una sensibilidad y especificidad del 66.7% y 51.1%, respectivamente (Laterza y col., 2004).

En 2009 Weterö y colaboradores, reportaron la disminución en los niveles de auto-anticuerpos contra la proteína reactiva C (PRC) en los pacientes con síndrome coronario agudo (SCA), con respecto a pacientes con Angina estable (AE) y controles. Realizaron análisis mediante la prueba de ELISA de 140 pacientes: 50 sanos, 40 con SCA y 50 con angina estable. Los autores plantean una posible relación entre la disminución en el nivel de anticuerpos contra la PRC y el alto riesgo de desarrollo de enfermedades cardiovasculares en pacientes con enfermedades autoinmunes, que no puede ser explicado por los factores de riesgo tradicionales como fumar o diabetes (Weterö y col., 2009).

Otro marcador bioquímico que ha sido ampliamente estudiado es el péptido natriurético proB. Se ha determinado que este péptido es sintetizado como una prohormona de 108 aminoácidos denominada proBNP, la cual es proteolíticamente escindida para liberar el péptido BNP de 32 aminoácidos y el fragmento NT-proBNP. Se han reportado numerosos estudios sobre el incremento en los niveles de BNP como respuesta a la severidad de la falla cardíaca (Thoughton y col., 2000; Clerico y col., 2000; Kaski y col., 2010). Sin embargo, algunos estudios sugieren que los niveles de péptido natriurético se elevan con la edad y son más altos en mujeres que en hombres (Redfield y col., 2002). La obesidad aparece también como un factor de confusión, al observar que los niveles de péptido disminuyen al aumentar el índice de masa corporal, y la insuficiencia renal también afecta los niveles de péptido. Por otro lado, se ha reportado en algunos artículos la circulación de material de alto peso molecular, presumiblemente formas de proBNP y material de bajo peso molecular, posiblemente isoformas de BNP (Tateyama y col., 1992; Yandle y col., 1993).

La alta incidencia de los SCA, las dificultades asociadas al diagnóstico de los SCA sin elevación del ST, las múltiples causas que intervienen en su desarrollo y los avances en la comprensión de los procesos implicados en su fisiopatología;

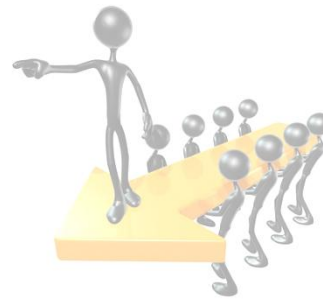
evidencian la necesidad de emplear una estrategia de multi-biomarcadores: marcadores de inflamación, marcadores de necrosis miocítica, marcadores de estrés oxidativo y marcadores de estrés hemodinámico. Estos marcadores brindan información de los procesos predominantes implicados en la fisiopatología de los SCA, podrían ser de gran utilidad en la discriminación de la gravedad de la lesión presente en los SCA sin supradesnivel y permitirían orientar el tratamiento hacia el eje causal predominante en cada caso particular. La comprensión y asociación de estos biomarcadores proporcionaría información más completa respecto al riesgo isquémico y la probabilidad de presentar eventos coronarios mayores.

La importancia del plasma como un medio valioso en el conocimiento del estado de los diferentes sistemas, sumado a la resolución efectiva y rápida de miles de proteínas por medio de la proteómica; constituyen una herramienta útil en el desarrollo de nuevos marcadores de diagnóstico y pronóstico en diversas enfermedades humanas. Es por ello, que este trabajo de investigación pretende mediante herramientas proteómicas como: electroforesis bidimensional (2D-PAGE) y análisis bioinformático, determinar la expresión diferencial de proteínas en los pacientes con eventos coronarios agudos sin elevación del segmento ST, como una aproximación en la determinación de biomarcadores específicos, que podrían aportar al conocimiento de los procesos fisiológicos implicados en este tipo de patología. Del mismo modo, estos candidatos a biomarcadores podrían contribuir al diagnóstico correcto de la patología y en la implementación de estrategias terapéuticas adecuadas en estos pacientes.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existen diferencias en la expresión de proteínas en el plasma de pacientes con infarto agudo del miocardio sin elevación del segmento ST (NSTEMI) en la fase aguda, con respecto a aquellos que presentan angina de pecho inestable (AI)?

OBJETIVOS



Objetivo general

Identificar las proteínas expresadas diferencialmente en el plasma de pacientes con síndrome coronario agudo, que podrían constituir candidatos a biomarcadores, útiles en el diagnóstico de pacientes con Angina Inestable e Infarto agudo del miocardio sin supradesnivel.

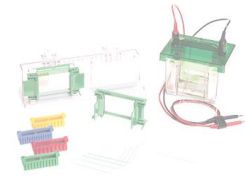
Objetivos específicos

Determinar el perfil proteico del plasma de pacientes con síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST (Infarto agudo del miocardio y angina inestable) y el plasma de personas sanas tomadas como controles.

Establecer las diferencias en los proteomas de cada grupo de pacientes con síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST (Infarto agudo del miocardio y angina inestable) con respecto a los controles sanos.

Identificar las proteínas expresadas diferencialmente en los pacientes con síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST (Infarto agudo del miocardio y angina inestable).

2. MATERIALES Y MÉTODOS



1.1 SELECCIÓN DE LOS PACIENTES Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Los pacientes con Infarto agudo del miocardio sin elevación del segmento ST (NSTEMI) y Angina Inestable (AI) fueron seleccionados de aquellos clasificados con NSTEMI o AI por los cardiólogos de la sección de Urgencias del Hospital Universitario de Santander (HUS) y el Instituto del Corazón (IC); durante las primeras horas posteriores al evento cardiaco. La evaluación de la inclusión de los pacientes, y la recolección de los datos necesarios para ser incluidos en el estudio, fue realizada y/o coordinada por el médico Manuel Barrios Socarrás, participante del grupo de investigación, y quien actualmente está vinculado al proyecto denominado *“Identificación de marcadores derivados del péptido natriurético como predictores de mortalidad en pacientes con síndrome coronario agudo”*, proyecto financiado por COLCIENCIAS, y el cual anida el presente proyecto de investigación. Fueron escogidos aquellos pacientes con NSTEMI que presentaron dolor precordial, electrocardiograma (EKG) sin elevación del segmento ST y marcadores bioquímicos elevados (troponina > 0,1 ng/ml) y los pacientes con Angina Inestable que mostraron dolor precordial, y marcadores de daño miocárdico negativos (troponina negativa). Fueron excluidos, en su mayoría, aquellos pacientes que presentaban enfermedades pulmonares, diabetes o insuficiencia renal. Esto con el objetivo de garantizar que las diferencias en los proteomas de los grupos de estudio sean propias de las afecciones cardíacas y no producto de otras patologías.

Los pacientes sanos, tomados como controles fueron recolectados del Centro de Salud de Morrórico y el barrio Albania de Bucaramanga. Los integrantes de este grupo, correspondieron a aquellos pacientes sanos del mismo género de la

población general (pacientes con NSTEMI), previo examen físico para descartar cualquier patología cardiovascular y un EKG para verificar su estado (EKG normal). La valoración inicial de estos pacientes fue realizada por el médico Manuel Barrios Socarrás y el electrocardiograma fue ejecutado y analizado por el grupo de electrocardiografía de la Universidad Industrial de Santander (UIS).

El proceso de toma y recolección de las muestras y el análisis clínico de la patología en pro de fortalecer el diagnóstico, fue realizado por estudiantes de últimos semestres de bacteriología y medicina de la UIS. El estudio contó con la aprobación de los comités de ética del HUS y el IC.

2.1. Grupos de estudio. En definitiva, fueron analizados 30 pacientes que firmaron el consentimiento informado y fueron distribuidos en los siguientes grupos: un grupo de 10 pacientes con Infarto agudo al miocardio sin aumento en el segmento ST del electrocardiograma (NSTEMI), un grupo de 10 pacientes con Angina Inestable y un grupo control de 10 pacientes sanos. En la tabla 2.1 se consigna el resumen de las características y los antecedentes de los pacientes incluidos en cada grupo de estudio.

2.1.2 Manejo de la muestra biológica. Las muestras de sangre fueron tomadas en tres tubos vacutainer Becton Dickinson con heparina de litio y gel separador (Collinson y col., 2004). Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 4500 rpm por 10 minutos. Durante el transporte de las muestras, desde los diferentes centros de captación hasta el Laboratorio Clínico de la Universidad Industrial de Santander donde fueron almacenadas, se mantuvo la cadena de frío en pro de cuidar la calidad proteínica de la muestra

Tabla 2.1 Características y antecedentes de los grupos de pacientes analizados en el análisis proteómico del plasma de pacientes con Síndrome coronario agudo sin elevación del segment ST. Los valores de edad y troponina se presentan como la media \pm DS (NA: no aplica).

Características y Antecedentes de los pacientes incluidos en el estudio			
	NSTEMI	ANGINA INESTABLE	CONTROLES
Hombres	50.0%	80.0%	50.0%
Mujeres	50.0%	20.0%	50.0%
Edad promedio (años (DS))	62.0 (12.3)	57.0 (13.3)	64.6 (12.0)
Troponina mg/ml (DS)	0.830 (0.50)	0.062 (0.03)	NA
Hipertensión arterial	70.0%	50.0%	30.0%
Dislipidemia	70.0%	40.0%	30.0%
Arritmia	-	10.0%	-
Enfermedad coronaria	20.0%	60.0%	-
Tabaquismo	10.0%	-	30.0%
Diabetes	-	20%	-
Enfermedad pulmonar	-	20%	-
Hipotiroidismo	-	10%	-

2.1.2 Manejo de la muestra biológica. Las muestras de sangre fueron tomadas en tres tubos vacutainer Becton Dickinson con heparina de litio y gel separador (Collinson y col., 2004). Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 4500 rpm por 10 minutos. Durante el transporte de las muestras, desde los diferentes centros de captación hasta el Laboratorio Clínico de la Universidad Industrial de Santander donde fueron almacenadas, se mantuvo la cadena de frío en pro de cuidar la calidad proteínica de la muestra. El plasma fue

repartido en alícuotas y almacenado a (-20°C) hasta su posterior análisis de proteínas.

1.2 METODOS EXPERIMENTALES

2.2.1 preparación de la muestra para electroforesis bidimensional. Con el propósito de limpiar la muestra de plasma lípidos e impurezas, y retirar proteínas mayoritarias que podrían interferir en la detección de proteínas de menor abundancia; se realizó una comparación entre diversos procedimientos: un kit comercial Aurum serum protein mini-Kit (Biorad), precipitación con ácido trifluoroacético-Acetonitrilo (TFA-A) (Ala-Kopsala y col.,2004), precipitación con acetona (Jiang y col.,2004), precipitación con acetonitrilo (Zhang y col., 2009) y precipitación con sulfato de amonio (30, 50 y 70% de saturación) (Jiang y col., 2004). El plasma usado correspondía a la muestra de un individuo control con 88.5 mg/ml de concentración de proteína, cuantificada mediante el método de Bradford (ver anexo 1).

A continuación se detallan los procedimientos llevados a cabo en cada método empleado:

La cromatografía de afinidad es un procedimiento de purificación de proteínas basado en la alta afinidad de grupos funcionales inmovilizados por los sitios enlazantes de numerosas proteínas. Este es un método versátil y rápido. Se presentan tres tipos de cromatografía de afinidad: cromatografía negativa, cromatografía positiva y cromatografía en tándem.

Kit Aurum serum protein mini-kit (ASP): El ASP contiene una resina de afinidad que teóricamente remueve el 90% de albúmina y globulinas con alta especificidad. Es una columna con un recubrimiento interno que retiene albúmina e IgG mediante anticuerpos monoclonales. Sometida a múltiples pasos de

centrifugación, es posible obtener un eluato libre de proteínas de alto peso molecular.

- Se siguieron las instrucciones de la casa comercial Bio-Rad para su uso: inicialmente, se equilibró la resina durante cinco minutos. Posteriormente se lavó con buffer de unión (Aurum serum protein) y se secó mediante centrifugación por 20 segundos a 10000 g; 200 μ L de plasma diluido en buffer de unión, fueron depositados en la cima de la columna. Posterior centrifugación por 20 segundos a 10000g fue colectado el eluido de la muestra de plasma libre de albúmina e Inmunoglobulina G.

Los solventes orgánicos ocasionan gran variedad de efectos que permiten la precipitación de proteínas. Una de las acciones más importantes es la reducción en la actividad del agua. La adición del solvente orgánico genera una disminución en la constante dieléctrica del medio, permitiendo así que disminuya el poder de solvatación del agua por los grupos hidrofílicos, lo cual reduce la solubilidad de las proteínas y se presenta su precipitación.

- **Precipitación con ácido trifluoroacético-acetonitrilo:** 300 μ L de plasma se mezclaron con 200 μ L de una solución de ácido trifluoroacético/acetonitrilo TFA/ACN (1mL/L). Posteriormente, se centrifugó la mezcla a 10000g por 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se repitió el ciclo de centrifugación hasta obtener un sobrenadante claro. Finalmente, los precipitados obtenidos fueron resuspendidos en buffer de resuspensión (RS).
- **Precipitación con acetona:** una muestra de plasma que contenía 799,5 μ g de proteína fue diluida hasta 50 μ L en PBS (Buffer fosfato salino). Tres volúmenes de acetona fría fueron agregados a la mezcla e incubada toda la noche en

hielo. Posteriormente, fue centrifugada a 10000g por 30 min. El pelet obtenido se dejó secar al aire y se resuspendió en 200 μ L de buffer RS.

- **Precipitación con acetonitrilo:** 50 μ l de plasma se disolvieron en 350 μ l de agua desionizada y 100 μ l de ACN. Las muestras fueron incubadas por 30 minutos y posteriormente centrifugadas a 14000g por el mismo periodo. El pelet obtenido fue resuspendido en 200 μ L de buffer RS

La clase de precipitación más común es la precipitación provocada por sales. Altas concentraciones de sales en el medio disminuyen la repulsión electrostática en los grupos de carga similar en la superficie de la proteína, y separan las moléculas de agua del entorno de la proteína globular. La competencia por las moléculas de agua en altas concentraciones de sales, disminuye la solubilidad de éstas y se produce la precipitación. Los grupos apolares, la distribución de las cargas y los residuos hidrofóbicos en la superficie de las proteínas; determinan la concentración de sales necesaria para causar la precipitación de las proteínas.

- **Precipitación con sulfato de amonio (30%, 50% y 70% de saturación)**

Se disolvió 2mg de proteína de plasma en PBS hasta un volumen final de 500 μ l, se adicionó 88mg de sulfato de amonio hasta alcanzar un 30% de saturación. Se mezcló suavemente por 10 minutos, se incubó durante una hora a temperatura ambiente y se centrifugó a 10000g a 20°C por 30min. Las proteínas en el sobrenadante fueron fraccionadas al 50 y 70% de saturación al adicionar 72 y 77mg respectivamente. La mezcla fue tratada como se detalló anteriormente. Cada pelet obtenido, fue lavado con 300 μ l de acetona fría al 90% y resuspendidos en 200 μ l de BR.

El plasma de los pacientes con NSTEMI, AI y los controles fueron procesados de acuerdo a los resultados obtenidos al realizar la comparación de los métodos

descritos previamente. Posteriormente, se determinó la concentración de proteínas en el plasma mediante el método de Bradford (Bradford 1976).

1.3 METODOS ANALÍTICOS

2.3.1 Electroforesis unidimensional (1D). Los precipitados y sobrenadantes obtenidos en los procedimientos anteriormente expuestos, fueron analizados por electroforesis unidimensional (1D) en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% y en condiciones denaturantes.

a. Preparación del gel:

Con este propósito, se utilizó una cámara de electroforesis marca BIORAD, modelo Mini-Protean Tetra cell. Inicialmente, se ensamblaron los vidrios de acuerdo a las especificaciones de manufactura, y se prepararon 5 ml de gel de separación (Acrilamida/bisacrilamida al 12/0.32% p/v, Tris-HCL 0.39M pH 8.8, SDS al 0.1% v/v, persulfato de amonio al 0.05% p/v y TEMED 0.2%). El gel se vertió entre los vidrios y se cubrió con una capa de isopropanol, con el propósito de hacer más efectiva la polimerización. Una vez polimerizado el gel de separación, se lavó con abundante agua desionizada para retirar el isopropanol y las porciones de acrilamida sin polimerizar. Posteriormente, se secó con papel de filtro y se llenó con 3 ml de gel de concentración compuesto por acrilamida/bisacrilamida al 0,12% p/v, Tris-HCl pH 6,8 0,125M, SDS al 0,1 %, persulfato de amonio al 0,2% y Tetrametilendiamina TEMED 0,2%. Se introdujo el peine en la solución y se dejó polimerizar. Terminada la polimerización se sacó el peine, se limpiaron los pozos, se introdujo el montaje en la cámara de electroforesis y se cubrió con buffer de corrido (Tris base al 0,20% p/v, glicina 1,44% p/v, SDS al 0,10% v/v).

b. Preparación de las muestras:

Las muestras para el análisis por electroforesis fueron preparadas mezclando 20µL de los precipitados y/o sobrenadantes de 1µg/µL de concentración, con 20µL de buffer de carga (tris-HCl pH 8,8 al 25%, glicerol al 20%, SDS al 40%, mercaptoetanol al 10% y azul de bromofenol al 5%). La mezcla se calentó durante 5 minutos en baño maría. Posteriormente, se depositaron en los pozos 30 µL de cada muestra, y un pozo con marcador de peso molecular marca FERMENTAS, que contenía proteínas entre 10 y 200 KDa de masa molecular.

c. Separación de las proteínas y tinción:

Las proteínas se separaron en los geles a un voltaje de 100 V durante 1,5 h. Posteriormente, se desmontaron los geles de las placas de vidrio y tiñeron durante 20 minutos con azul de Coomassie R-250, preparado al 0,25% p/v en solución de metanol al 50 % v/v y ácido acético al 10% v/v disueltas en agua destilada. Para observar las bandas de proteínas, se destiñó el gel sumergiéndolo en solución decolorante compuesta por metanol al 50 %v/v y ácido acético al 10%v/v disueltas en agua destilada. Posteriormente, se escaneó el gel con las proteínas teñidas en un densitómetro UMAX, PowerLook 2100XL.

2.3.2 Electroforesis bidimensional. Con el objetivo de ajustar las condiciones de la separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional, se realizaron múltiples ensayos con el plasma de un paciente control (80 mg/ml de proteína). En estas pruebas se variaron rangos de pH, tiempos de rehidratación, condiciones de isoelectroenfoco y se probaron diversos métodos de tinción; hasta lograr mapas proteómicos con alta definición y resolución.

Posteriormente, el plasma de los pacientes con NSTEMI, AI y el grupo control, fueron sometidos a electroforesis bidimensional, con el objetivo de encontrar los perfiles proteicos de cada grupo de pacientes. Las condiciones de

isoelectroenfoque y de separación por peso molecular se describen a continuación (La figura 2.1 presenta un esquema y resumen del proceso):

a. Primera dimensión isoelectroénfoque:

180µg de proteína del plasma de cada paciente, fue disuelto en buffer de rehidratación que contenía urea 8M, CHAPS 2%, DTT 50mM, anfolitos 0,2% y azul de bromofenol al 0,001%. Esta mezcla fue aplicada a tiras de 7cm en un rango de pH de 4-7 y conservadas en una bandeja de rehidratación, durante 10 horas para permitir la absorción de la muestra sobre la tira de pH inmovilizado. A continuación, las tiras fueron trasladadas a una bandeja Protean IEF seca y sometidas a isoelectroenfoque durante 14 horas, según el siguiente programa: Lineal 30' 300V, Lineal 3h 3500V, Lineal 1,5h 6000V y finalmente en aumento rápido de voltaje hasta 50000VH.

b. Equilibración:

Posteriormente, las tiras fueron trasladadas a una bandeja de rehidratación-equilibración e incubadas durante 15 minutos en agitación, con buffer de equilibración I compuesto por el buffer patrón (úrea 6M, Tris-HCl 0,375M pH 8,8, SDS 2% y glicerol 20%) más 2% de DTT. Enseguida fue descartada esta solución y reemplazada por buffer de equilibración II compuesto por el buffer patrón adicionado con 2% de iodoacetamida, durante 15 minutos en agitación constante. Este proceso reduce los enlaces disulfuro y alquila los grupos tiol de los residuos de cisteína. Simultáneamente, las proteínas son cubiertas con SDS para su posterior separación por peso molecular (MW).

c. Segunda dimensión SDS-PAGE:

La separación de las proteínas de acuerdo a su masa, se realizó en cámaras de electroforesis Mini-Protean BIO-RAD, mediante geles de poliacrilamida al 10%

compuestos de acuerdo al método de Laemmli (Laemmli, 1970) por agua tipo I, acrilamida-bisacrilamida 9,93-0,27%, Tris-HCl 0,39M, dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0,1% como agente desnaturante, persulfato de amonio al 0,05% y TEMED al 0,2% como catalizadores de la reacción. La tira fue ubicada sobre gel y cubierta con agarosa (0,5% agarosa, 1% SDS y trazas de azul de bromofenol). Se llenó la cámara con buffer de corrido integrado por Tris 0,2%, SDS 0,1% y glicina 1,44%. Finalmente, se conectó la cámara a una fuente de voltaje Power Pac HC *Biorad*, que permitió realizar la separación de las proteínas de acuerdo a su peso molecular durante 1 hora y 25 minutos a 120V.

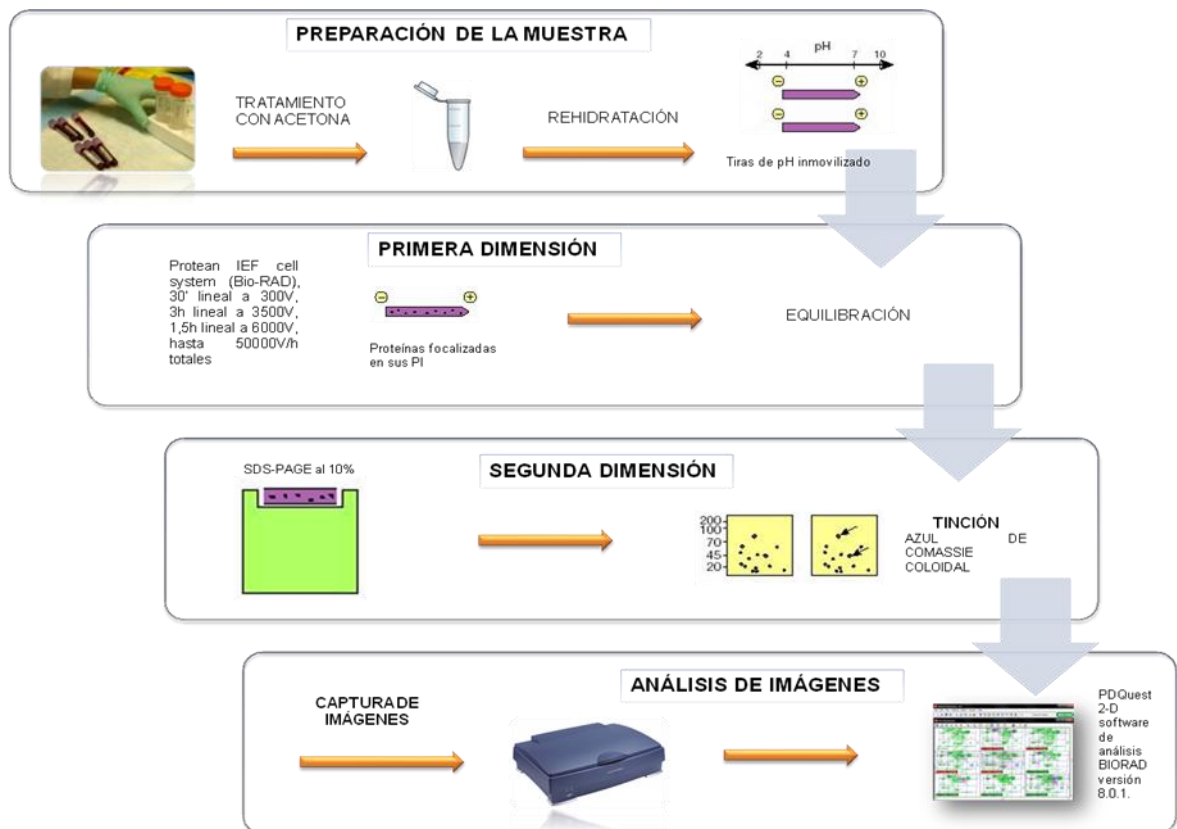


Figura 2.1 Representación gráfica del análisis de proteínas mediante electroforesis bidimensional 2D-PAGE

d. Tinción de proteínas:

Posterior a la segunda dimensión y con el objetivo de visualizar hasta 10ng de proteína, se realizó la tinción de los geles con azul de Coomassie coloidal mediante el siguiente procedimiento: los geles fueron incubados durante tres horas a temperatura ambiente y con agitación constante en una solución fijadora que contenía 30% de etanol y 2% de ácido fosfórico. Posteriormente se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con agua tipo I. Manteniendo la agitación fueron incubados durante una hora en la solución de tinción que estaba compuesta por 17% de sulfato de amonio, 3% de ácido fosfórico y 33% de metanol. A esta solución fue agregado azul de Coomassie G-250 (disuelto en metanol), hasta una concentración final de 0,06%. Los geles permanecieron en esta solución durante 20 minutos y el contraste adecuado para observar las proteínas fue alcanzado al desteñir con agua.

2.3.3 Verificación de la repetibilidad y reproducibilidad de la técnica de separación de proteínas 2D-PAGE. El plasma del individuo control (88.5mg/mL de proteína) fue usado para realizar los procedimientos necesarios para verificar la repetibilidad y reproducibilidad de la técnica.

Repetibilidad de la técnica.

La repetibilidad del procedimiento fue verificada mediante la realización de dos geles de la muestra de plasma del individuo control. Éstos fueron realizados el mismo día, corridos al mismo tiempo, tanto en la separación por punto isoelectrico (IEF) como en la separación por peso molecular (SDS-PAGE), se utilizaron los mismos reactivos para los dos geles en todas las etapas de la separación por 2D-PAGE.

Reproducibilidad de la técnica.

Con el objetivo de verificar la reproducibilidad del procedimiento, fue realizado un gel de la muestra de plasma y cinco meses más tarde fue realizado otro gel de la misma muestra (plasma individuo control 88.5 mg/ml). En este segundo gel fueron renovadas todas las soluciones necesarias para llevar a cabo la separación: rehidratación, separación por Isoelectroenfoque, separación por peso molecular y tinción.

2. CAPTURA DE IMÁGENES Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2D).

Después de decolorar por 14 horas, los geles fueron escaneados mediante un scanner UMAX Powerlook 2100 XL. Este dispositivo digitaliza las imágenes con 800 x 1600 puntos por pulgada (dpi), lo cual ofrece alta resolución y permite capturar finos detalles cuando se escanean transparencias.

Una vez escaneados, los geles fueron enviados al software de análisis PD-Quest versión 8.0.1 de BIORAD. Este programa filtra y suaviza la imagen del gel e identifica las manchas proteicas, mediante la creación de una representación gaussiana en tres dimensiones de las manchas clarificadas. La intensidad de las manchas es la suma de las intensidades de todos los pixeles que forman la imagen, lo que permite obtener medidas del nivel de expresión de cada una de ellas.

Las imágenes importadas fueron filtradas empleando la opción “sal y pimienta” gaussiana de 9 x 9. A continuación fueron analizadas, utilizando los mismos parámetros de detección para identificar manchas en todos los geles que forman los grupos a analizar; el programa incluye todos los geles que se van a comparar y nivela diferencias producto del tipo de tinción, intensidad de las manchas y ruido

de fondo. Adicionalmente, con el objetivo de compensar las posibles variaciones entre geles debidas a diferencias en la eficacia de la tinción, se aplicó el método de normalización más sofisticado disponible en el software, mediante el modelo de regresión local “Local Regression Model”, éste calcula una curva en el diagrama de dispersión que minimiza la distancia a todos los puntos de la grafica y asigna el factor de normalización para cada mancha. En seguida el programa densitometra las manchas proteicas, lo que permite obtener medidas del nivel de expresión de cada una de ellas. No obstante, se realizó una revisión manual pormenorizada, la edición y corrección de alguna de las manchas o de los emparejamientos detectados automáticamente. Finalmente el programa nos arrojó una imagen maestra “master” que reúne todas las manchas, con una distribución gaussiana, identificadas en los geles que conforman cada grupo.

Inicialmente se realizó el análisis de todos los geles que conformaron el experimento, clasificados en los grupos de análisis expuestos anteriormente. En seguida se realizó el análisis comparativo cualitativo entre el grupo de NSTEMI y AI con respecto a los controles sanos. Posteriormente, se obtuvo la imagen maestra de cada grupo, en esta imagen sólo se incluyeron las manchas que estaban presentes en mínimo cinco de los geles que conformaban cada grupo. Finalmente, se establecieron las diferencias entre los tres geles “master” (NSTEMI, AI y controles). Los datos de intensidad de la expresión fueron exportados a excel, donde se obtuvo la media (M) y el error estándar de la media (ESM), sólo se consideraron significativas aquellas manchas con niveles de expresión alterados en $\pm 30\%$ y valores $p < 0.05$, de acuerdo a la prueba de Mann-Whitney. La figura 2.2 muestra el diagrama de barras y la imagen tridimensional que representa las diferencias en intensidad de cada proteína separada.

Adicionalmente, los datos obtenidos mediante el analizador de imágenes PD-QUEST 8.0.1, fueron exportados a la hoja de cálculo Excel. Con el objetivo de facilitar el manejo de los resultados y lograr una distribución normal; se aplicó

logaritmo natural a los datos obtenidos y sólo fueron incluidas en el análisis, aquellas proteínas que estaban presentes en por lo menos seis de los pacientes analizados. Estos resultados fueron analizados en el programa SPSS versión 13.0, mediante un análisis discriminante, que nos permitió conocer las proteínas que aportaban información para separar los grupos analizados en nuestro estudio. Posteriormente, las proteínas identificadas en el análisis discriminante fueron sometidas a la prueba de ANOVA, que nos permite comparar las medias de una misma variable, en más de dos grupos. Primeramente, se realizó la prueba de Levene para comprobar la homogeneidad en las varianzas, las variables que cumplieron esta condición, fueron sometidas a la prueba de ANOVA, seguida de la prueba de Dunnett. Sólo se consideran significativos los cambios en los niveles de las proteínas que presenten valores de $p < 0.05$.

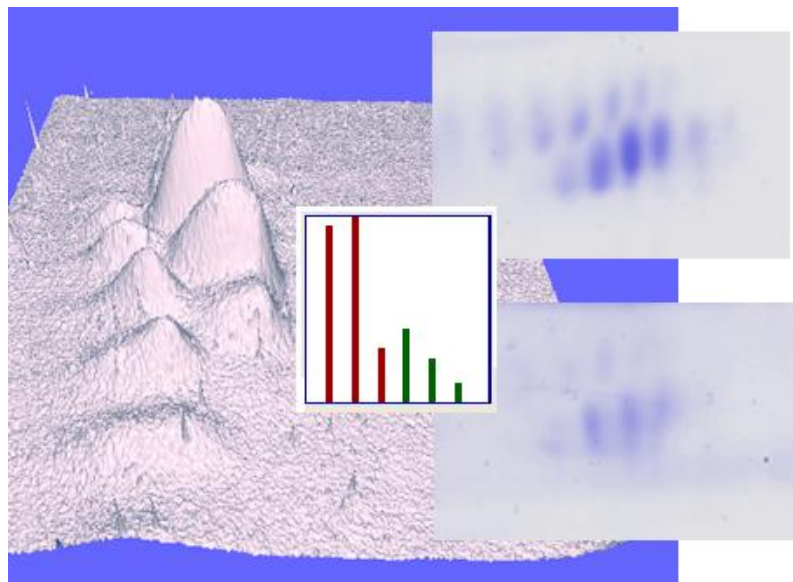


Figura 2.2. Representación del análisis de imágenes realizada por el programa PD-QUEST.

3. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN LOS GELES BIODIMENSIONALES (2D)

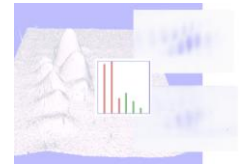
2.5.1. Identificación de proteínas mediante Espectrometría de masas con trampa iónica (Sistema LC/MS/MS). “Las manchas que presentaron diferencias estadísticamente significativas en sus niveles de expresión fueron recortadas de forma manual y digeridas con tripsina empleando un protocolo basado en el descrito por Shevchenko et al (1996). El sobrenadante de la digestión (que contiene los péptidos) se acidificó con TFA (0.1% concentración final), se secó en speedvac y fue resuspendido en ácido acético al 0.5% v/v para su posterior análisis por cromatografía líquida en fase reversa-espectrometría de masas (LC/RP-MS) en un espectrómetro de masas de tipo electrospray acoplado a trampa iónica (ESI-IT) modelo Deca-XP, (Thermo-Finnigan, San José, California, USA) empleando una columna de 180 mm de diámetro interno a un flujo de 1,5 mL/m en modo micro-spray con una interface “metal needle-kit” (Thermo-Finnigan). El método empleado (“Exclusión Dinámica”) fragmenta potencialmente todos los péptidos resueltos contenidos en la mezcla inicial. Los espectros de fragmentación obtenidos (MS/MS) se analizaron mediante el motor de búsqueda Phenyx y se confirmaron con motor Sequest. Las secuencias parciales obtenidas se utilizaron para encontrar homologías empleando el programa FASTA” (Niño 2009).

2.5.2 Identificación de las proteínas expresadas diferencialmente por análisis bioinformático. Como una aproximación para encontrar la posible identidad de aquellas manchas que presentaron diferencias en sus niveles de expresión con $p > 0.05$; se realizó una comparación entre los valores de masa molecular (PM) y punto isoeléctrico (pI) de las proteínas identificadas en el estudio, con respecto a los PM y pI de aquellas proteínas plasmáticas relacionadas con enfermedades

cardiovasculares. Para determinar las proteínas plasmáticas relacionadas con enfermedades cardiovasculares, se realizó una revisión de las bases de datos especializadas de proteínas. Inicialmente, la búsqueda se concentró en aquellas proteínas identificadas en la *base de datos de proteínas del plasma* (HUPO). Sin embargo, los estudios de proteínas plasmáticas basados en herramientas proteómicas, nos permitieron reducir el número de proteínas a incluir en la base de datos (Berhane y col., 2005; Arab y col., 2006; Vivanco y col., 2005; Anderson, 2005; Howes y col., 2008; Kim y col., 2010).

Finalmente, fueron incluidas en esta base de datos, aquellas proteínas propuestas como marcadores bioquímicos para enfermedades cardiovasculares, que están registradas en el *banco de datos de proteínas* (PDB). La (PM) y el (pl) de estas proteínas, fue calculado a partir de la herramienta proteómica de caracterización *compute pI/Mw*; y adicionalmente, estos valores fueron contrastados con aquellos encontrados en la base de datos de proteínas *SWISS 2D-PAGE*, la cual contiene los valores de PM y pl, encontrados experimentalmente en geles 2D-PAGE, de las proteínas identificadas por Ms en el mapa de proteínas del plasma humano. Estas aplicaciones están disponibles en el *sistema experto de análisis de proteínas* (expasy) (www.expasy.org). Posteriormente, se realizó la comparación de los valores de MP y pl teóricos, con los valores de PM y pl que se encontraron para las proteínas que fueron identificadas en el presente estudio. A continuación, se asignó la posible identidad de estas proteínas. Sólo fueron asignadas las identidades a aquellas proteínas que presentaban diferencias en sus valores de MP iguales o menores a ± 1.5 KDa, y diferencias en los pl iguales o menores de ± 0.2 unidades con respecto a los valores de PM y pl tomados de las bases de datos. El criterio de identificación se determinó teniendo en cuenta las variaciones que se han reportado en las proteínas identificadas, separadas por 2D-PAGE, que se encuentran reportadas en la base de datos (SWISS 2D-PAGE).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



3.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

El plasma humano es la muestra humana más importante y más usada en el diagnóstico de diversas enfermedades (Anderson y col., 2002). Sin embargo, es una de las muestras más difíciles de analizar por 2D-PAGE, no sólo por las proteínas abundantes que constituyen el mayor porcentaje de su contenido proteico; sino por las interferencias que contiene y que dificultan la separación de proteínas (Kim y col., 2007).

Inicialmente, se realizaron ensayos preliminares con el plasma de un paciente control, con el objetivo de encontrar el procedimiento más adecuado de preparación de la muestra de plasma. La tabla 3.1, muestra la concentración de proteína, estimada por medio del método de Bradford (ver anexo 1), de los precipitados y sobrenadantes obtenidos en cada uno de los procedimientos realizados.

Se realizaron ensayos preliminares donde se evaluaron los patrones electroforéticos, mediante electroforesis unidimensional (1D-PAGE), de los precipitados y sobrenadantes obtenidos en los métodos de preparación de la muestra. Se determinó que aquellos tratamientos (precipitados y/o sobrenadantes) cuya concentración de proteína estaba entre (1,5 -40) mg/mL, podían ser evaluados por electroforesis 1D. Los resultados mostraron que las proteínas presentes en aquellas muestras que presentaban concentraciones menores a 1,5mg/mL, no eran detectadas por el colorante utilizado (azul de Comassie R-250). Del mismo modo, aquellas muestras con concentraciones mayores a

40mg/ml, al ser analizadas por 1D- PAGE, distorsionaban el corrido de las muestras adyacentes.

Tabla 3.1. Concentración de proteína de los precipitados y sobrenadantes obtenidos en los métodos de preparación de muestra de plasma de un individuo control ¹

MUESTRA	Concentración de proteína (mg/ml)	
	Sobrenadante (S)	Precipitado (P)
Eluido kit Aurum Serum protein mini-kit BIORAD	1,1	
Precipitación con TFA/ACN (1ml/1L)	38,3	21,3
Precipitación con Acetona	0,5	3,77
Precipitación con ACN	0,13	30,2
Precipitación con sulfato de amonio 30%	55,6	45,8
Precipitación con sulfato de amonio 50%	60,7	5,4
Precipitación con sulfato de amonio 70%	49,3	0,8

¹ **Concentración de Proteína en la muestra control: 88,5 (mg/ml)**

De acuerdo con lo anterior, y con base en los resultados obtenidos en la tabla 3.1; se seleccionaron aquellas muestras cuyas concentraciones de proteína, en el precipitado y/o sobrenadante, estaban entre (1-38,3) mg/mL. Posteriormente, estas muestras se separaron por 1D-PAGE, para encontrar el método de preparación de la muestra más adecuado; cuyos resultados fuesen comparables con aquellos obtenidos con el kit BIORAD, el cual fue tomado como método de referencia.

3.1.1 Análisis por electroforesis unidimensional (1D-SDS-PAGE) de los precipitados y sobrenadantes obtenidos en los procedimientos ensayados en la preparación de la muestra de plasma. En la figura 3.1 se presentan los patrones electroforéticos de los precipitados y sobrenadantes de diferentes tipos de tratamientos de eliminación de proteínas abundantes como albumina e inmunoglobulinas en la muestra control.

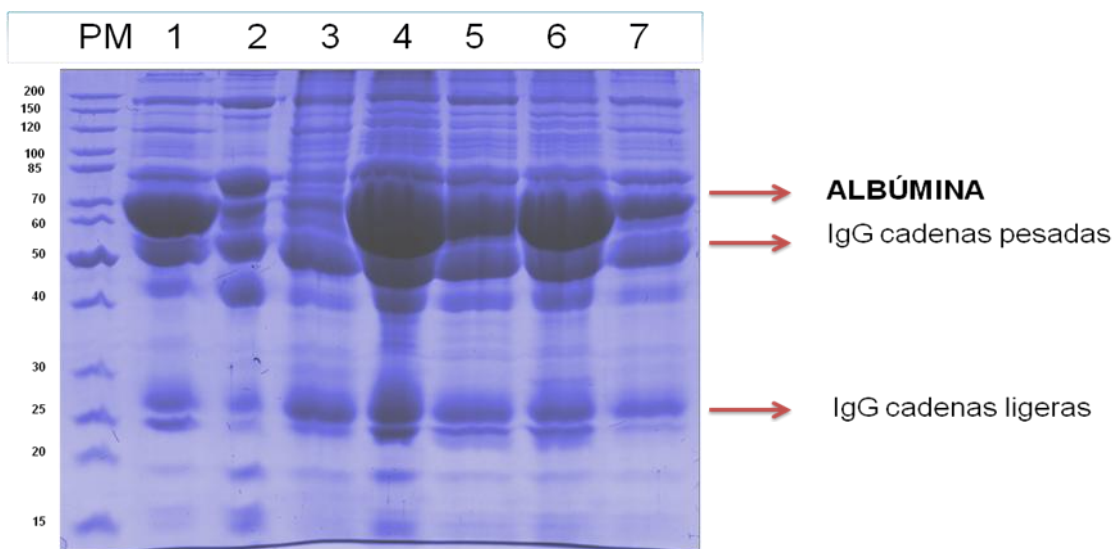


Figura 3.1. Electroforesis en 1D de proteínas de plasma humano sometido a diferentes tipos de tratamiento de remoción de proteínas abundantes. PM) Marcadores de peso molecular, 1) Muestra de plasma sin tratamiento, 2) Muestra de plasma tratada utilizando el Kit aurum serum protein (BIORAD), 3) Muestra de plasma tratada con precipitación con sulfato de amonio al 50% de saturación (P) , 4)Muestra de plasma tratada con precipitación con Acetonitrilo/ácido trifluoroacético (TFA/ACN 1ml/1L) (S), 5)Muestra de plasma tratada con precipitación con Acetonitrilo/ácido trifluoroacético (TFA/ACN 1ml/1L) (P), 6) Muestra de plasma tratada con precipitación con ACN 20% (P), 7) Muestra de plasma tratada con precipitación con acetona 75%(P). La separación 1D-SDS-PAGE se realizó utilizando geles de poliacrilamida al 10%, teñidos con azul de Coomassie R-250. (P): precipitado, (S): sobrenadante.

Como se observa en la figura 3.1, los tratamientos de precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50% de saturación y con acetona al 75%, representados por los patrones de proteínas presentes en los carriles 3 y 7, presentan patrones electroforéticos similares a los obtenidos con el kit Aurum serum protein de Bio-rad (carril 2). Los resultados obtenidos con estos tratamientos ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50% y acetona al 75%), muestran disminución en la concentración de albúmina, mayor intensidad en las bandas separadas y la presencia de algunas proteínas que no fueron detectadas en el patrón electroforético de la muestra sin tratamiento (carril 1).

La acetona y el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ constituyen las sustancias más utilizadas en los procedimientos de precipitación con solventes orgánicos y sales, respectivamente; porque presentan mayor estabilidad, eficiencia y son de fácil manipulación (Kumar y col., 2003). Los resultados expuestos en la figura 3.1 confirman la eficiencia de estos agentes precipitantes y coinciden con los resultados encontrados por (Jiang y col., 2003), en cuyo trabajo reportó que el método de precipitación con acetona constituye una alternativa fácil, útil para concentrar proteínas y limpiar la muestra de plasma. Por su parte, el método de precipitación con sulfato de amonio al 50% mostró, en los ensayos realizados por Jiang, que el pelet obtenido al realizar el procedimiento contenía la mayor cantidad de proteínas y sólo un pequeño porcentaje de albúmina.

Aunque se han realizado grandes esfuerzos en el desarrollado diversos métodos para retirar las proteínas abundantes del plasma, los procedimientos disponibles presentan dificultades relacionadas con la disponibilidad y la especificidad. En los métodos basados en la afinidad de la albúmina por algunos colorantes, se ha determinado que su baja especificidad permite la unión de otras proteínas (Stempfer y col., 2008). Adicionalmente, se ha comprobado que la albúmina presenta múltiples sitios de unión a proteínas y metabolitos; lo que sugiere que al retirarla del plasma, también se están perdiendo proteínas de baja abundancia

(Curry y col., 1998). Técnicas basadas en la unión específica de la albúmina a anticuerpos también se han utilizado, pero su alto costo, baja capacidad de muestra y la reactividad cruzada con otras proteínas han limitado su uso (Kim y col., 2007). Igualmente, los métodos físicos relacionados con membranas de filtración, inicialmente fueron descartados para retirar proteínas abundantes en análisis de proteínas por 2D-PAGE (Georgiou y col., 2001). Sin embargo, un trabajo publicado por Greening y col. en el 2010, muestra buenos resultados en el análisis por LC-MS/MS de proteínas de pesos moleculares inferiores a 25KDa (Greening y Simpson, 2010). De acuerdo a esto, un método ideal sería aquel que presentara bajos costos, viabilidad y permitiera retirar las proteínas abundantes del plasma, sin alterar los niveles de otros péptidos y proteínas. Se ha determinado que la albúmina es soluble en solventes orgánicos y que mezclas de acetona al 80% con ácido trifluoroacético (TCA) permitieron separar la albúmina de la globulina en el suero (Chen y col., 2005). Esto es consistente con el patrón de proteínas 1D-PAGE observado para la muestra de plasma tratada con acetona al 75%. Adicionalmente, el tratamiento con acetona permite retirar interferencias, además de su bajo costo y que no requiere equipo especializado.

3.2 ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL 2D-SDS-PAGE

3.2.1 Ajuste de las condiciones de electroforesis bidimensional 2D-SDS-PAGE. De la misma manera como se expuso en el primer apartado, se realizaron ensayos preliminares con el plasma de un paciente control para encontrar las condiciones de separación por punto isoeléctrico (IEF) y separación por peso molecular que nos permitieran obtener geles bidimensionales reproducibles y con alta resolución. Inicialmente, fueron rehidratados 120µg de proteína en tiras de 7cm de rango de pH de 3-10. La separación por punto isoeléctrico (pI) se realizó con las condiciones reportadas por (Lugo y col., 2005): lineal 1' 500V, lineal 2h 30' 4000V y en rampa rápida hasta 5000 VH. La separación por peso molecular se

llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 12% teñidos con azul de Comassie R-250 (Figura 3.3A).

Separación por punto isoeléctrico pI

De acuerdo a los resultados obtenidos en la figura 3.2A, no se identificaron proteínas en los extremos ácidos y básicos del gel. Del mismo modo, fue pobre la resolución y definición en las manchas identificadas, observándose líneas, ruido de fondo, y pocas manchas proteicas separadas. Debido a lo anterior, y con el propósito de mejorar la resolución de las proteínas de interés, se redujo el rango de pH a 4-7 y se aumentó el tiempo de focalización, de acuerdo con las condiciones reportadas por Mateos-Cáceres (Mateos-Cáceres y col., 2004): 250 V, 10,000 V, 10,000 V (30,000 VH). No obstante, los resultados obtenidos en los ensayos realizados (figura 3.2A, 3.2B) nos llevaron a implementar varias modificaciones en las condiciones de separación por pI, basadas en la naturaleza y complejidad de la muestra problema, hasta obtener las condiciones reportadas a continuación: Lineal 30' 300V, Lineal 3h 3500V, Lineal 1.5h 6000V, 50000VH.

Separación por peso molecular

El análisis de la separación por peso molecular del gel presentado en la figura 3.2B, mostró acumulación de las proteínas de alto PM y escasa presencia de proteínas de bajo PM (figura 3.2A, 3.2B, 3.2C). Por esta razón, se disminuyó la concentración de acrilamida, se varió la concentración de proteínas en la muestra y se compararon tres tipos de tinción de proteínas separadas en geles de poliacrilamida (Coomassie simple, Coomassie coloidal y Sypro Ruby).

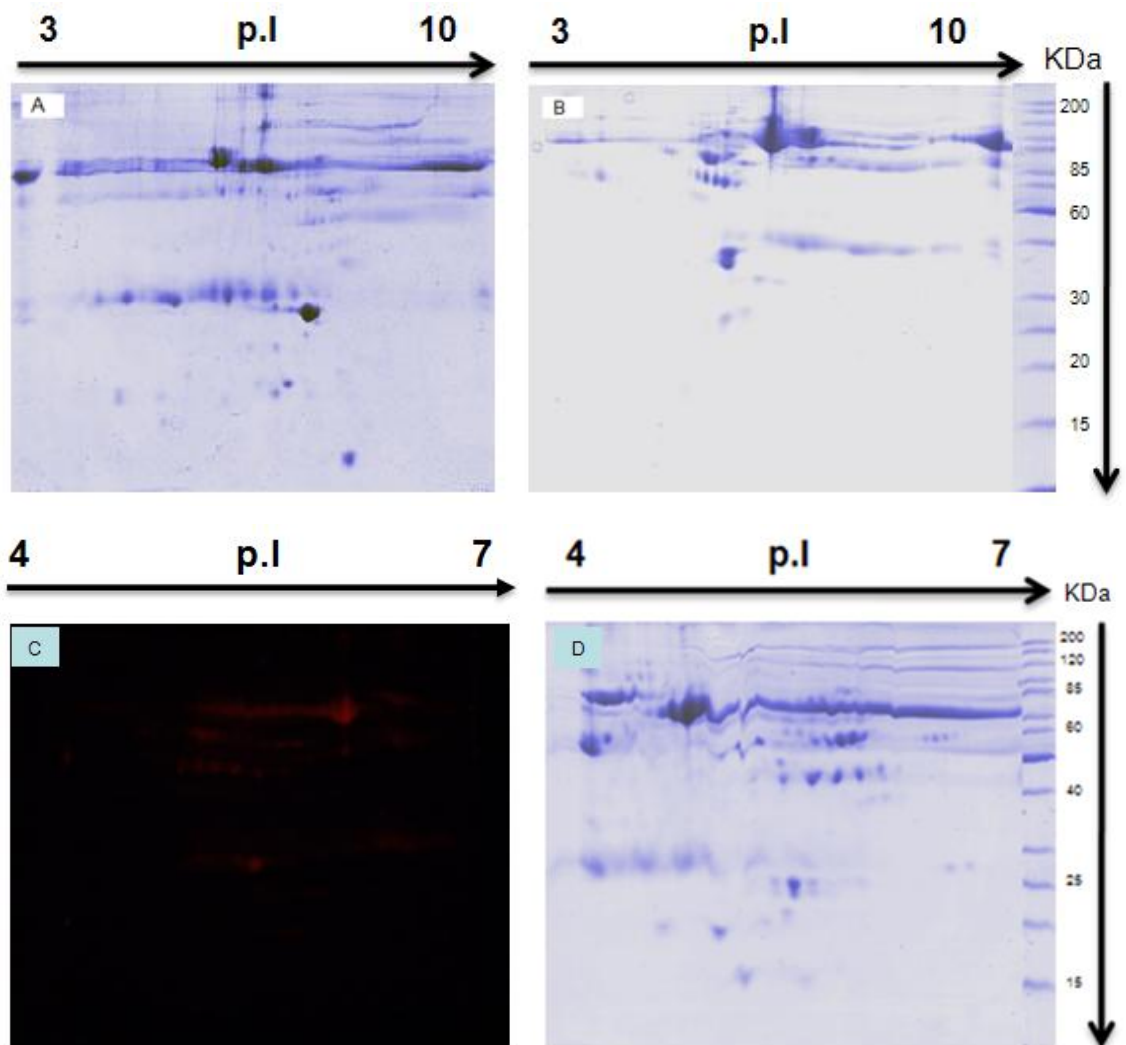


Figura 3.2. Geles de 2D-PAGE obtenidos durante el proceso de determinación de las mejores condiciones de separación de proteínas de muestras de plasma humano. (A) Gel 2D-PAGE realizado con 120 μ g de proteína separados en tiras de 7cm de 3-10 de pH, poliacrilamida al 12% y teñido con azul de Coomassie R-250. (B) Gel 2D-PAGE realizado con 140 μ g de proteína separada en tiras de 7cm de 4-7 de pH, poliacrilamida al 10% y teñido con azul de Coomassie R-250. (C) Gel 2D-PAGE realizado con 100 μ g de proteína separados en tiras de 7cm de 4-7 de pH, poliacrilamida al 10% y teñido con Sypro Ruby. (D) Gel 2D-PAGE realizado con 180 μ g de proteína separados en tiras de pH de 4-7, poliacrilamida al 10% y teñido con azul de Coomassie coloidal G-250.

Finalmente, en la figura 3.3 muestra un gel representativo realizado con las condiciones de separación establecidas (condiciones de IEF: Lineal 30' 300V, Lineal 3h 3500V, Lineal 1.5h 6000V, 50000VH, poliacrilamida al 10%, tinción con azul de Comassie coloidal G-250). Estas condiciones nos permitieron obtener geles con mejor resolución y manchas proteicas más definidas. A través del uso de tiras de electroisoeñoque (IEF) pequeñas (7cm), que facilitan el manejo y transporte de los geles, y disminuye los costos del procedimiento, permitiendo así el análisis de un mayor número de muestras.

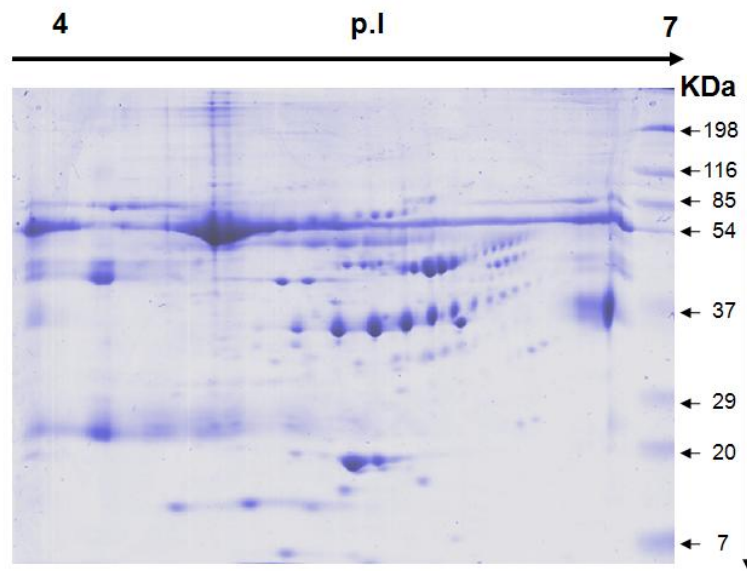


Figura 3.3. Gel de 2D-PAGE utilizando las mejores condiciones de separación de las proteínas de suero: 180µg de proteína rehidratados en tiras de 7cm de rango de pH 4-7 rehidratado por 10 horas, separadas por pI mediante las siguientes condiciones de IEF: Lineal 30' 300V, Lineal 3h 3500V, Lineal 1.5h 6000V, 50000VH, y por SDS-PAGE en la segunda dimensión en geles de poliacrilamida al 10% teñidos con azul de Comassie coloidal G-250.

3.2.2 Verificación de las figuras de mérito del método. Usando una muestra del plasma de un individuo control, se realizaron ensayos para confirmar que las condiciones estandarizadas de separación por IEF y peso molecular, nos

permitían obtener geles repetibles y reproducibles. Los geles fueron escaneados y las imágenes obtenidas en estos ensayos fueron analizadas mediante el software PD-QUEST versión 8.0.1. Los resultados se presentan mediante un análisis gráfico y una tabla que muestra las manchas identificadas, así como el coeficiente de correlación encontrado entre las réplicas.

Verificación de la reproducibilidad de la técnica de separación.

Los resultados consignados en la figura 3.4 y la tabla 3.2 muestran que en la réplica B fueron expresadas tres proteínas menos, comparada con aquellas manchas proteicas identificadas en la réplica C. Igualmente, se observan algunas diferencias en la intensidad de las manchas comunes en las dos réplicas. Sin embargo, se mantiene el patrón de separación electroforética y el coeficiente de correlación (Tabla 3.2) demuestra el alto grado de similitud presente entre las dos réplicas.

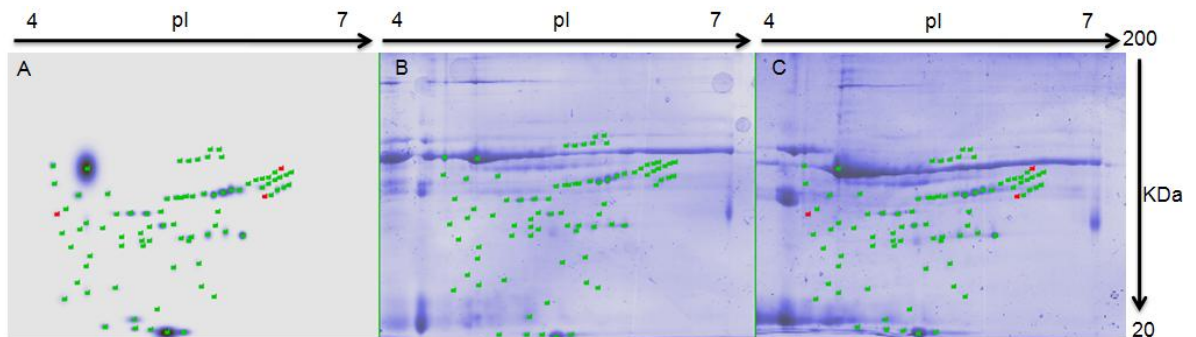


Figura 3.4. Análisis de las imágenes de los geles 2D-PAGE de una muestra de plasma de un individuo control. A) Gel Master, las manchas marcadas con verde corresponden a aquellas proteínas que son comunes en los geles B y C, las manchas en rojo pertenecen al gel C y están ausentes en el gel B. B) y C) corresponden a las réplicas de los geles de la muestra de plasma de un paciente control. La separación fue realizada en tiras de pH de 4-7, geles de poliacrilamida al 10% y teñidos con azul de Coomassie coloidal G-250.

Tabla 3.2. Reporte global de las réplicas analizadas mediante el software PD-QUEST versión 8.0.1

Réplicas	Manchas detectadas	Coefficiente de correlación
Gel B	80	0.887
Gel C	83	1.000

Verificación de la reproducibilidad de la técnica

Como se observa en la figura 3.5 y la tabla 3.3, se presentan algunas diferencias en los geles obtenidos. En el gel de la figura 3.6B fueron identificadas cuatro manchas que no fueron detectadas en el gel realizado cinco meses después (figura 3.5C). Igualmente, en este último gel, se identificaron ocho manchas que no fueron detectadas en el gel realizado inicialmente (figura 3.5B). Estas diferencias pueden deberse a mayor eficiencia en el tratamiento de la muestra separada en el gel C (realizado cinco meses después). Como se observa en las imágenes, este gel presenta el fondo más claro, lo cual favorece la detección de proteínas de baja concentración. Del mismo modo, el gel B presenta mayor definición de las manchas comunes con respecto a aquellas presentes en el gel C. Esto puede ser producto de algún grado de degradación de las proteínas presentes en la muestra de plasma almacenada (separada cinco meses después), debido probablemente a los cambios de temperatura en los periodos de congelación/descongelación. No obstante, se conserva el perfil de separación electroforética y el coeficiente de correlación, aunque disminuyó con respecto a la prueba de reproducibilidad, presenta un resultado aceptable y demuestra alto grado de similitud; si se tiene en cuenta las condiciones totalmente renovadas en las cuales se realizó esta nueva separación.

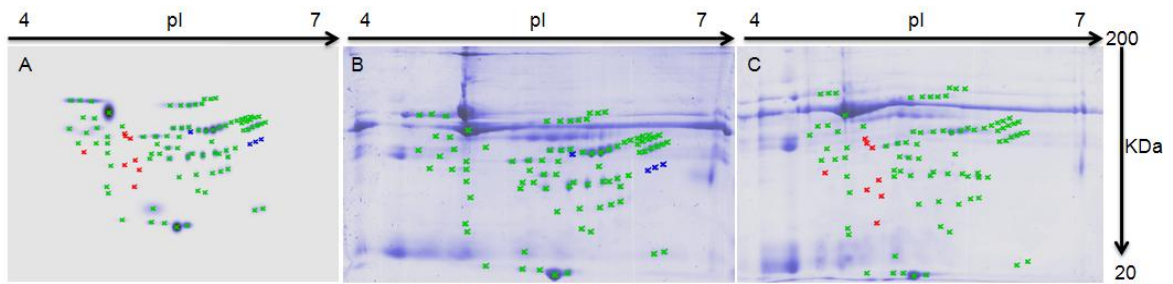


Figura 3.5. Análisis de las imágenes de los geles 2D-PAGE de la muestra de plasma de un individuo control. A) Gel master, las manchas marcadas con verde corresponden a aquellas proteínas que son comunes en los geles B y C, las manchas azules pertenecen al gel B y están ausentes en el gel C, las manchas rojas pertenecen al gel C y están ausentes en el gel B. B) Réplica 1. C) Réplica 2, realizada cinco meses después de la realización de la réplica 1. La separación se llevó a cabo en tiras de pH de 4-7 y geles de poliacrilamida al 10%, teñidos con azul de Coomassie coloidal G-250.

Tabla 3.3. Reporte global de las replicas analizadas mediante el software PD-QUEST versión 8.0.1

Replicas	Manchas detectadas	Coefficiente de correlación
Gel B	93	0.76
Gel C	89	1.00

3.2.3 Separación de las proteínas de las muestras de plasma tratadas con los métodos de precipitación seleccionados, utilizando electroforesis bidimensional SDS-2D-PAGE. Una vez establecidas las condiciones de separación de proteínas por SDS-2D-PAGE, se realizaron los geles bidimensionales de las muestras de plasma tratadas con los métodos de precipitación seleccionados. La figura 3.6 muestra los resultados para las muestras de plasma sin tratamiento, y las muestras de plasma tratadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50% de saturación y acetona, respectivamente. El gel bidimensional 2D-PAGE de la muestra tratada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ muestra aparentes dificultades en la migración de las proteínas, reflejada en la distorsión de las manchas separadas,

y en la disminución del espacio entre proteínas de pesos moleculares consecutivos. Esto puede ser producto de sales remanentes después del tratamiento, que pueden interferir al enfocar las proteínas en la separación por punto isoeléctrico (Kim y Kim, 2007). Lo anterior implica que aquellas muestras tratadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ requieren de un procedimiento adicional de desalinización, que representa un aumento en el tiempo de análisis y en el costo del procedimiento de preparación de las muestras.

Por otro lado, al observar de forma general la tinción de los geles obtenidos de la muestra de plasma sin tratamiento y la muestra de plasma tratada con acetona, se observa que el gel correspondiente a la muestra de plasma sin tratar posee porciones más oscuras, a pesar de la uniformidad en la concentración de la solución de tinción, y en los tiempos de corrido, tinción y destinción aplicados en todos los geles. Del mismo modo, se presenta más líneas horizontales y verticales en el gel de la muestra de plasma sin tratar comparado con aquel que muestra la separación de proteínas de la muestra tratada con acetona. Por consiguiente, este último presenta mayor nitidez en las proteínas separadas, y tal como se resalta en los óvalos de la figura (3.6D), se identifican otras proteínas que estaban ausentes en el gel 2D-PAGE de la muestra de plasma sin tratar.

Con el propósito de ratificar estas observaciones, se realizó el análisis de las imágenes e identificación de las manchas obtenidas en los geles realizados para el tratamiento con acetona, con respecto a aquellos identificados en la muestra sin tratamiento, mediante el software PD-Quest Advanced versión 8.0.1. Los resultados obtenidos muestran la presencia de 104 manchas; de las cuales 22 no fueron identificadas en el gel sin tratamiento y 45 manchas cuyas intensidades fueron mayores en el gel correspondiente a la muestra tratada con acetona con respecto al gel obtenido de la muestra sin tratamiento. La tabla 3.4, presenta una lista de los valores de masa y punto isoeléctrico (pI) de las veintidós proteínas que

no fueron identificadas en el gel correspondiente a la muestra de plasma sin tratamiento.

Tabla 3.4 Valores de peso molecular (PM) y punto isoeléctrico (pI) de las proteínas identificadas en el gel correspondiente a la muestra de plasma tratada con acetona que estuvieron ausentes en el gel de la muestra de plasma sin tratamiento. El análisis se realizó en el software de análisis PD-QUEST versión 8.0.1. Los valores de pI se determinaron tomando como referencia las masas y pI de proteínas conocidas.

PROTEÍNA	MASA KDa	PUNTO ISOELÉCTRICO pI	PROTEÍNA	MASA KDa	PUNTO ISOELÉCTRICO pI
1	28,7	6,5	12	56,1	5,1
2	78,3	6,1	13	77,4	5,2
3	78,6	6,0	14	58,1	5,0
4	78,7	6,0	15	78,2	4,9
5	46,5	5,3	16	63,3	4,3
6	49,0	5,6	17	76,3	4,4
7	43,4	5,0	18	52,3	4,7
8	44,1	5,2	19	76,5	4,7
9	57,3	5,2	20	60,2	4,1
10	58,8	5,2	21	48,6	4,5
11	76,4	4,5	22	63,6	4,5

La ausencia de estas proteínas en la muestra sin tratamiento, pueden ser producto de la eliminación de los lípidos presentes en la muestra de plasma al precipitar con acetona. Como se ha señalado, las proteínas pueden enlazarse a lípidos mediante interacciones hidrofóbicas, las cuales producen artefactos en los geles de 2D-PAGE. Los complejos lípidos-proteína pueden ser completamente insolubles en soluciones acuosas y consecuentemente podrían no migrar en la matriz de poliacrilamida (Lundblag, 2006).

Del mismo modo, las diferencias en la apariencia de la tinción de los geles pueden generarse como resultado de las interacciones de los lípidos e impurezas con las partículas coloidales del colorante. Asimismo, la interacción de impurezas en la solución de tinción podría interferir en el anclaje de las moléculas de colorante a la fracción de proteína, y de esta manera, obstaculizar las interacciones hidrofóbicas de éste con los residuos aromáticos a lo largo del esqueleto polipéptidico (Candiano y col., 2004).

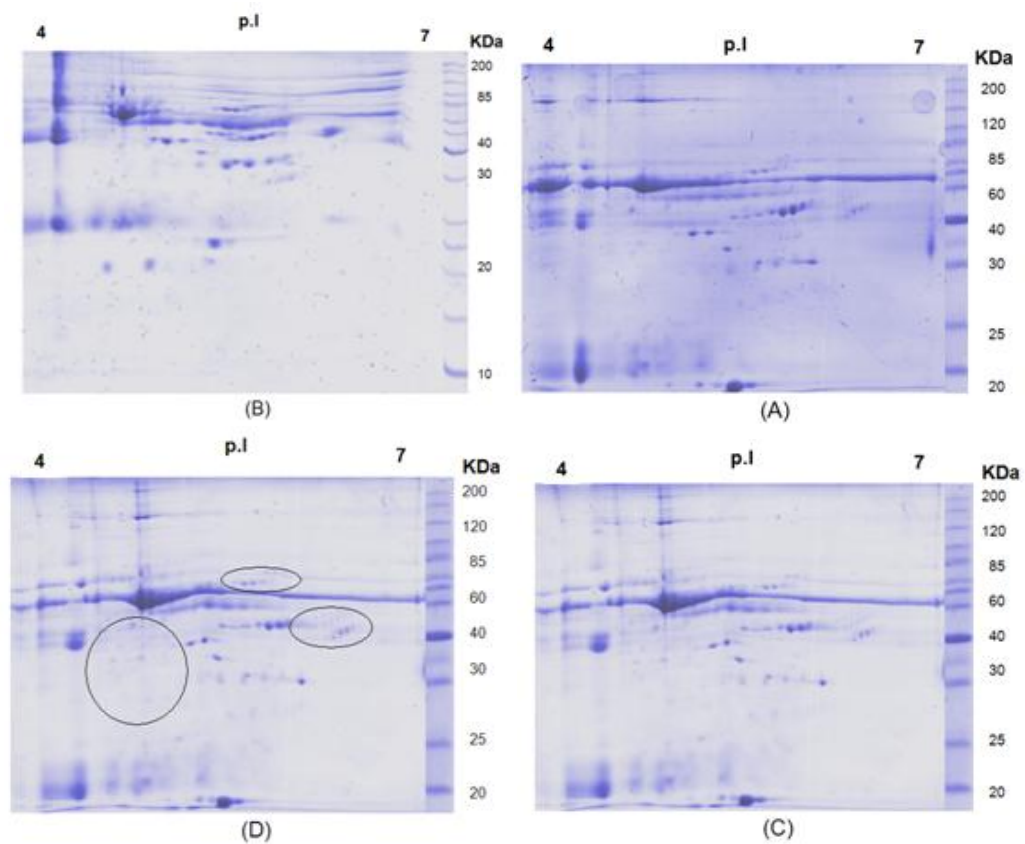
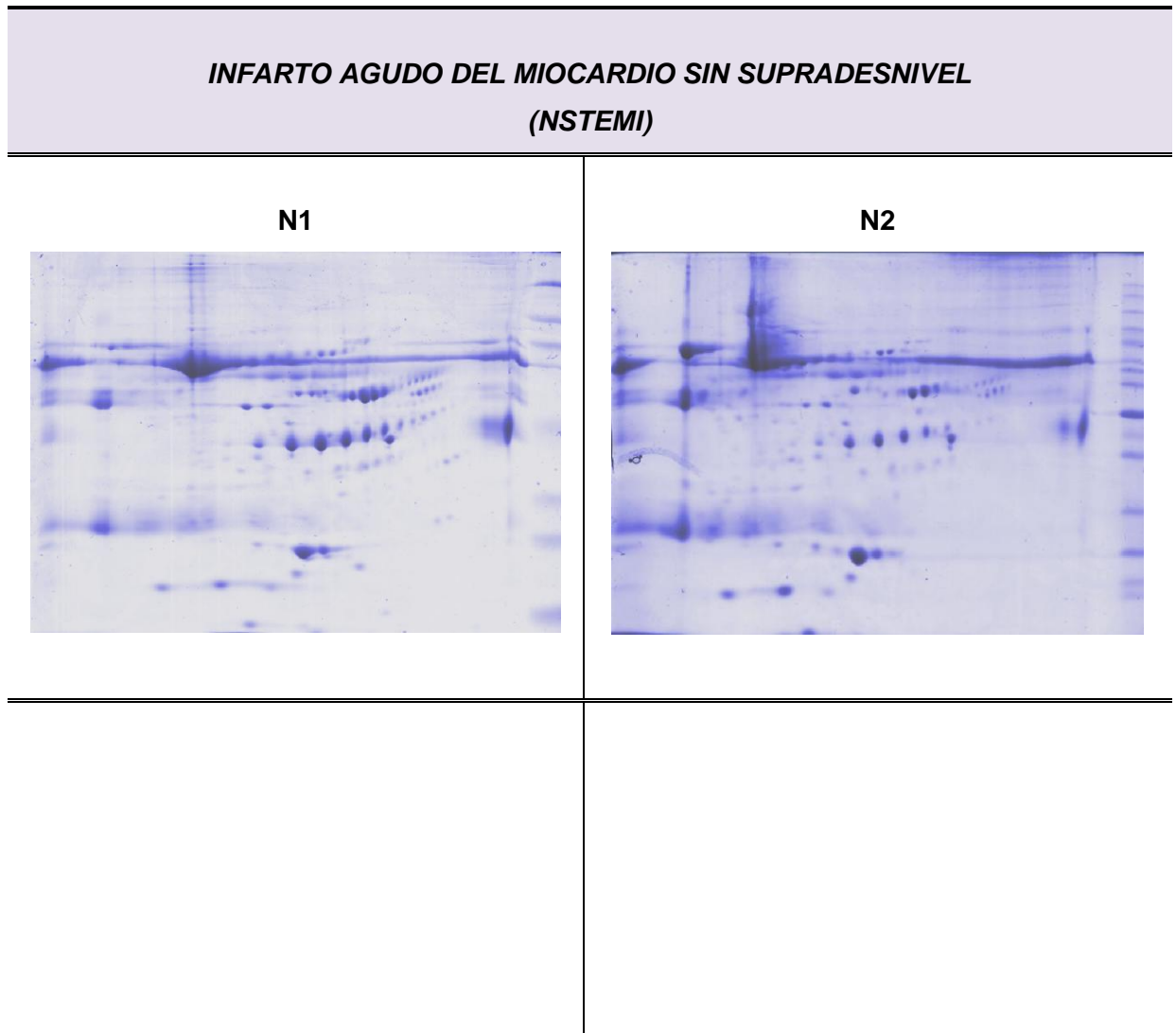
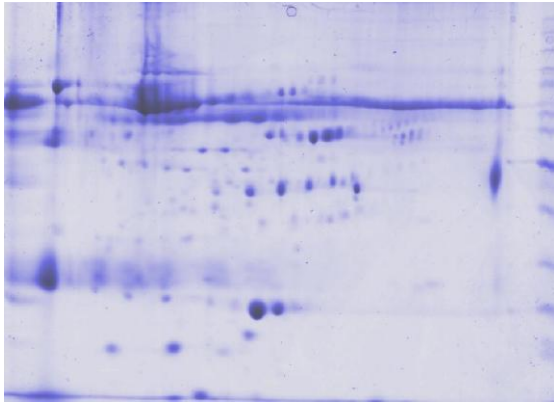


Figura 3.6 Gel 2D-PAGE del plasma humano con y sin tratamiento de precipitación. (A) Muestra de plasma sin tratamiento. (B) Muestra de plasma tratada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50% de saturación. (C) Muestra de plasma tratada con precipitación con acetona. (D) Muestra de plasma tratada con precipitación con acetona con los óvalos que muestran las diferencias. La separación bidimensional se realizó usando tiras de 7cm de rango de pH 4-7 en la primera dimensión y geles de poliacrilamida al 10% en la segunda dimensión. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie coloidal G-250.

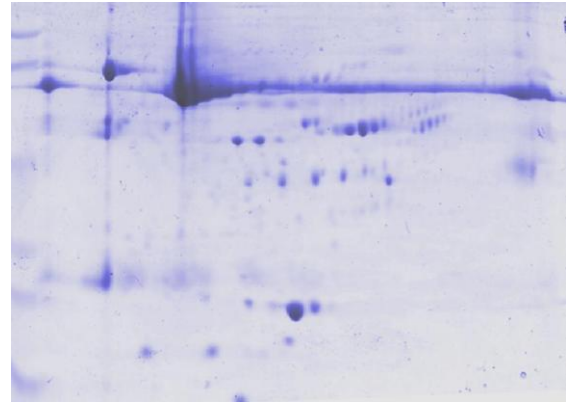
3.2.4 Electroforesis bidimensional SDS-2D-PAGE de los grupos de pacientes analizados. Al establecer las condiciones de separación de proteínas por SDS-2D-PAGE y el mejor método de preparación de las muestras de plasma, se realizaron los tratamientos y la separación de proteínas por SDS-2D-PAGE de las muestras de plasma de los pacientes que conforman cada grupo de análisis. A continuación, en las Figuras se exponen los geles bidimensionales obtenidos de los grupos de pacientes analizados:



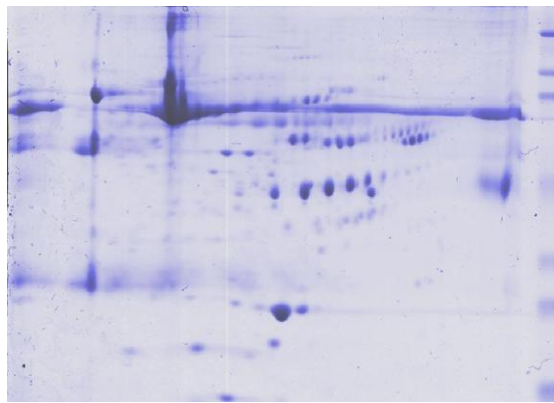
N3



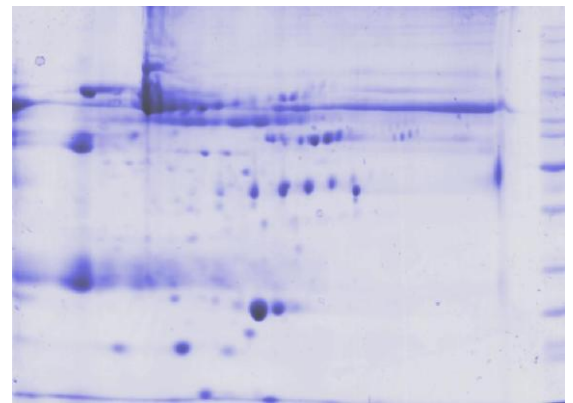
N4



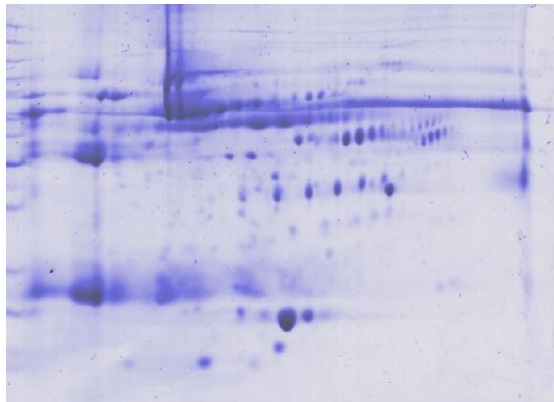
N5



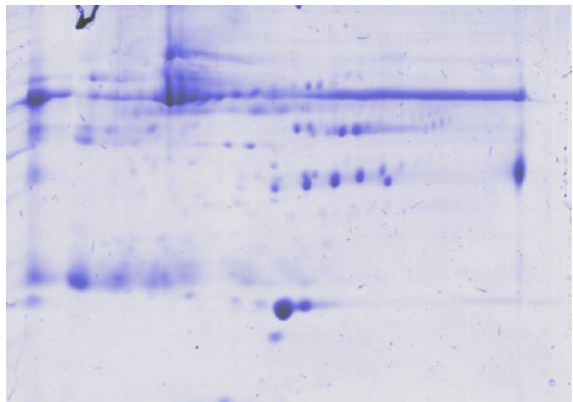
N6



N7



N8



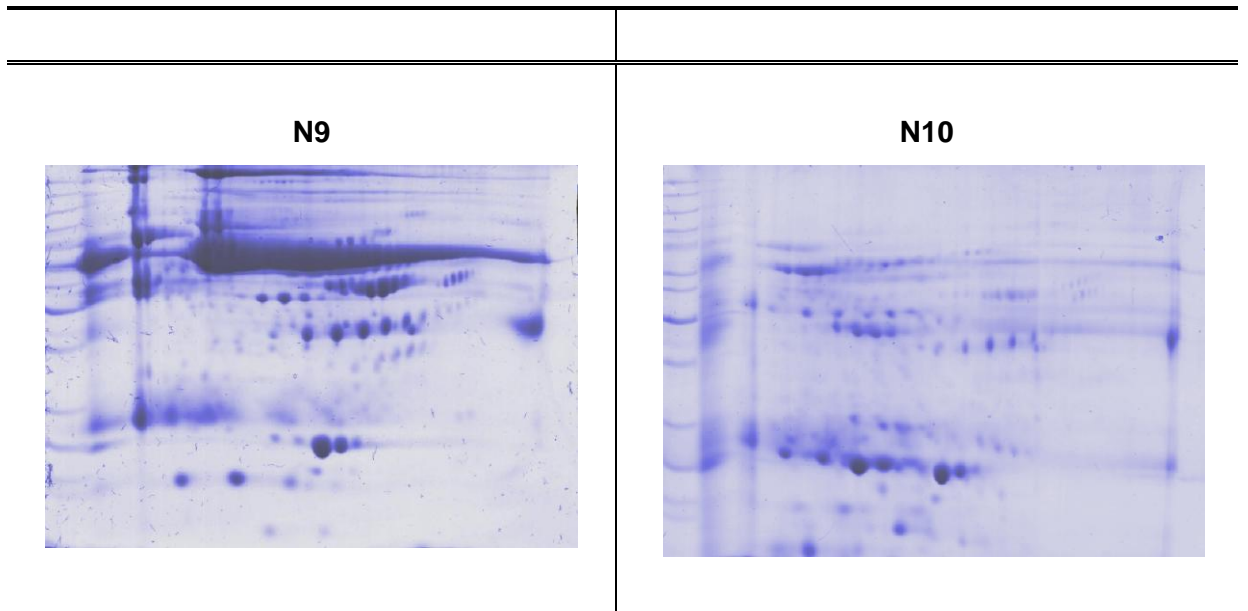
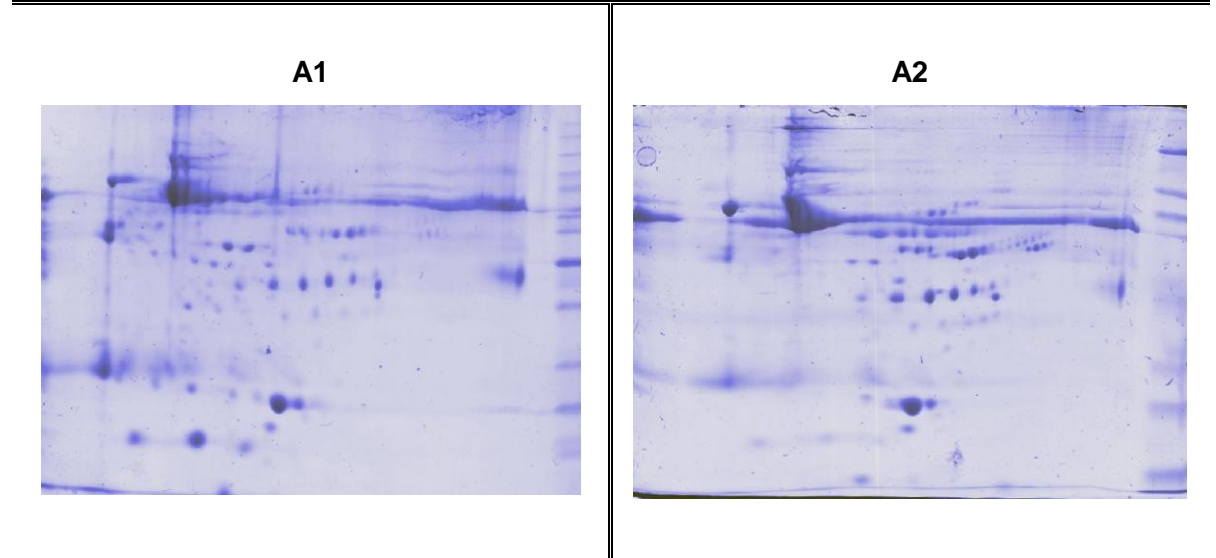
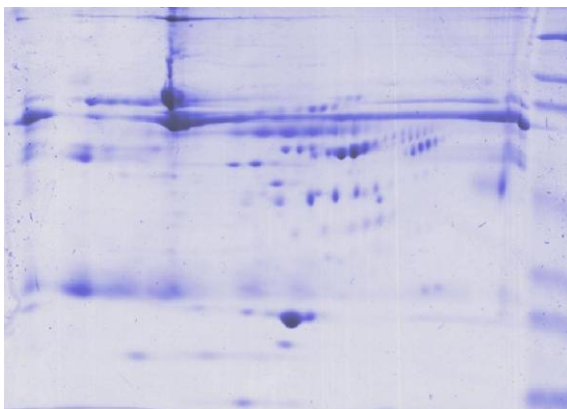


Figura 3.7. Geles bidimensionales 2D-PAGE de los plasmas de pacientes con NSTEMI (N1 a N10). Los geles fueron realizados usando tiras de 7cm de un rango de pH de 4-7, poliacrilamida al 10% y teñidos con azul de Coomassie coloidal G-250.

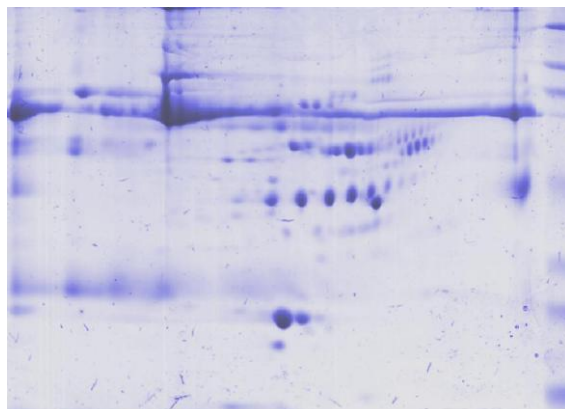
**ANGINAS INESTABLES
(AI)**



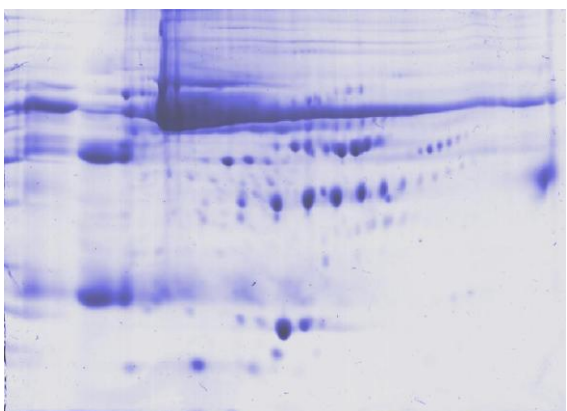
A3



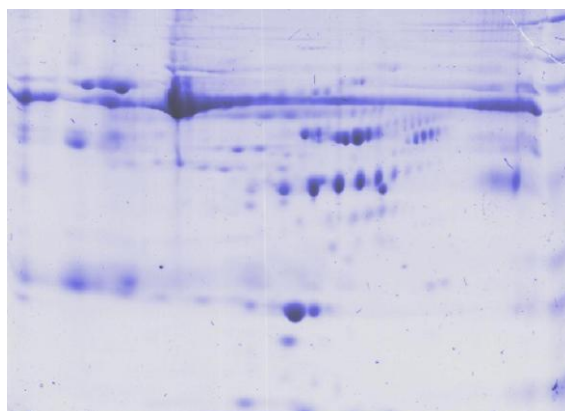
A4



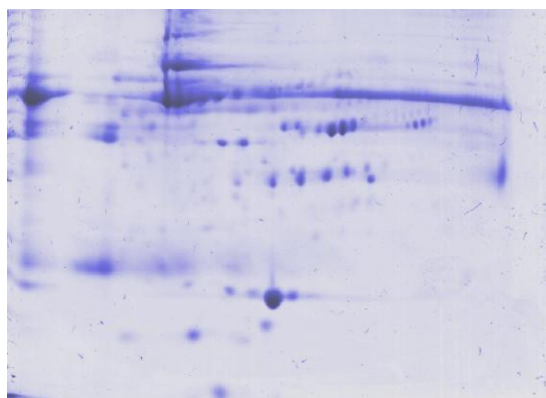
A5



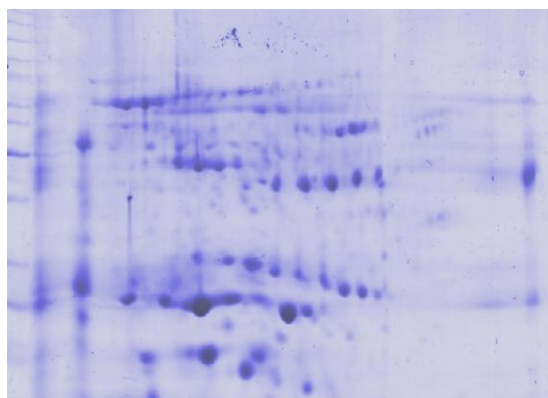
A6



A7



A8



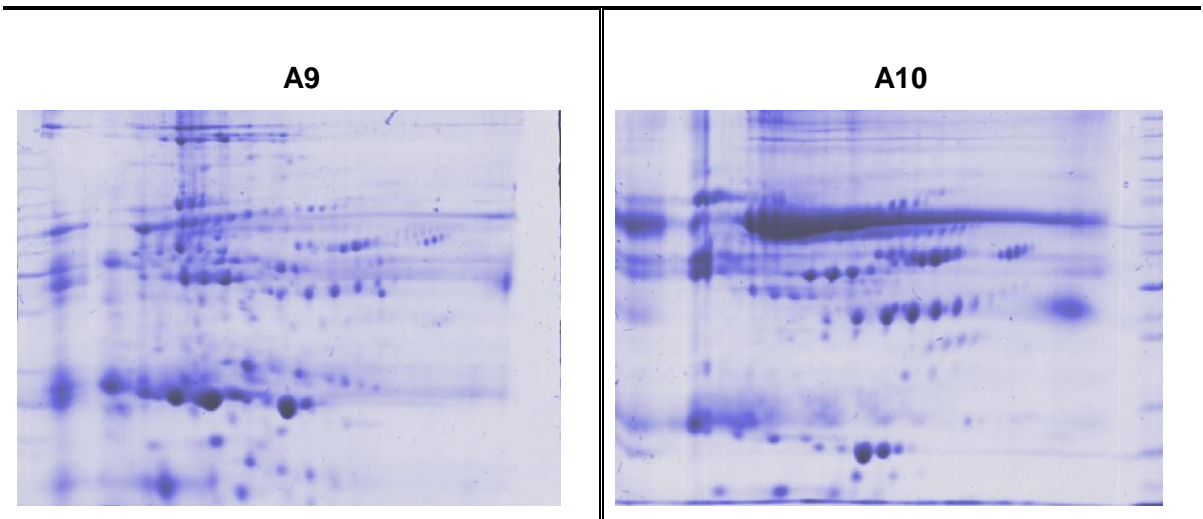
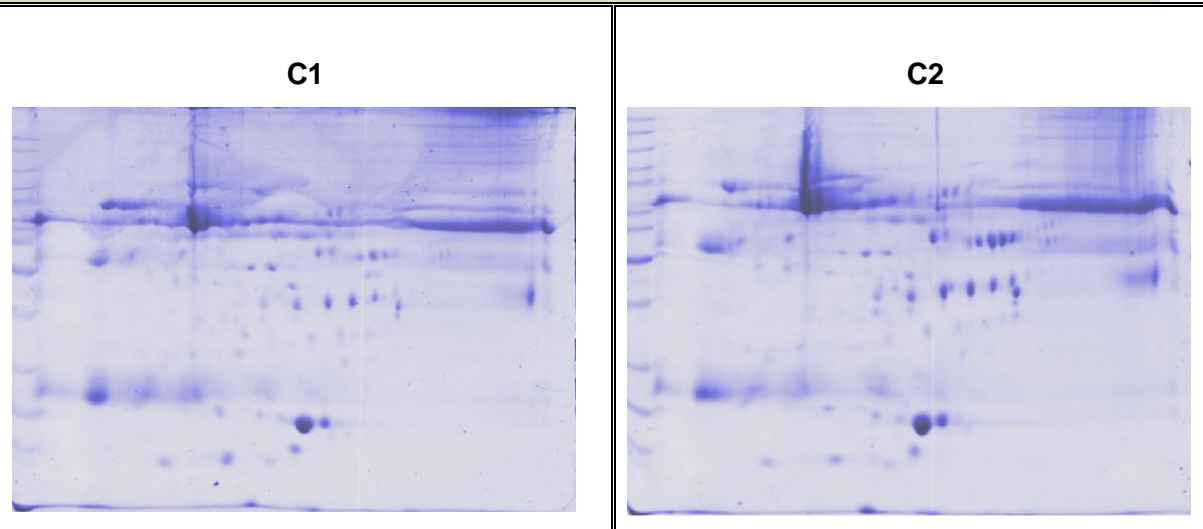
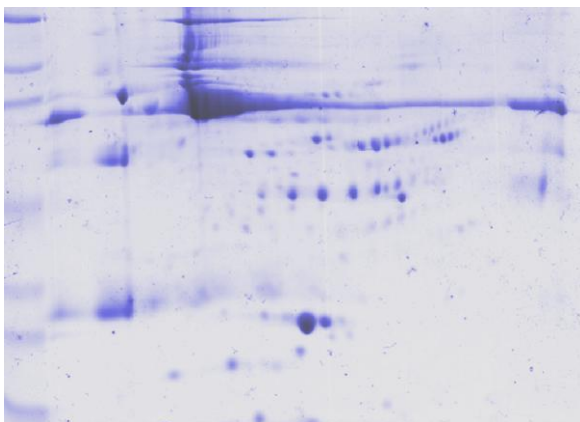


Figura 3.8. Geles bidimensionales 2D-PAGE de los plasmas de los pacientes con AI (A1a A10). Los geles fueron realizados usando tiras de 7cm de un rango de pH de 4-7, poliacrilamida al 10% y teñidos con azul de Coomassie coloidal G-250.

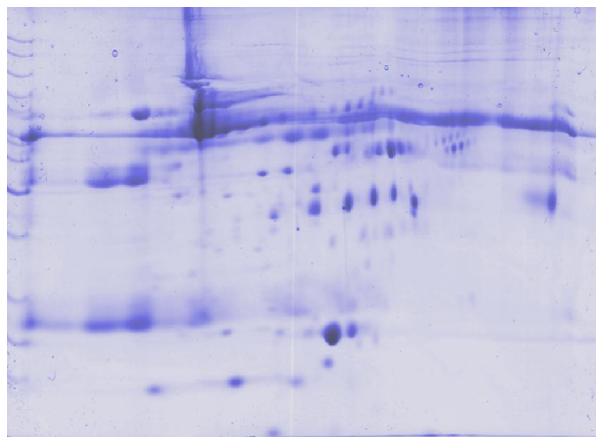
CONTROLES



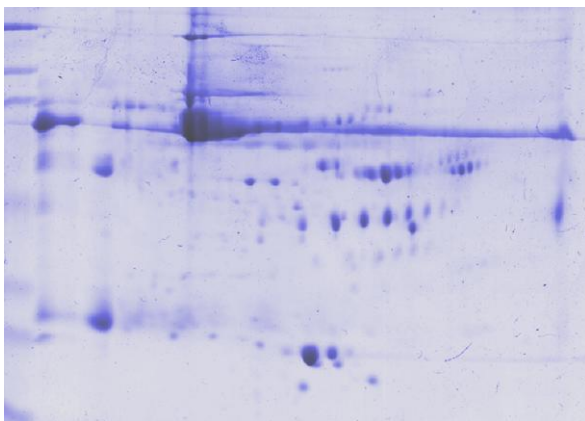
C3



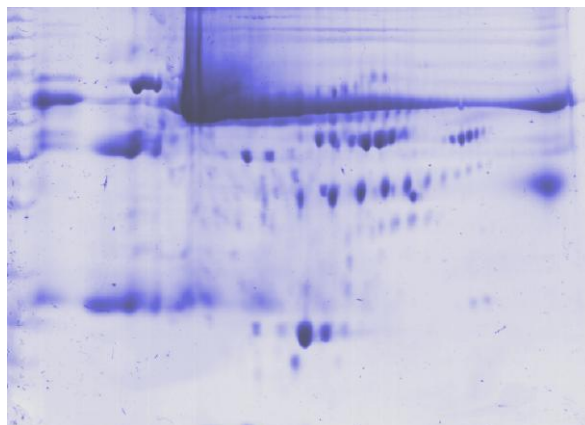
C4



C5



C6



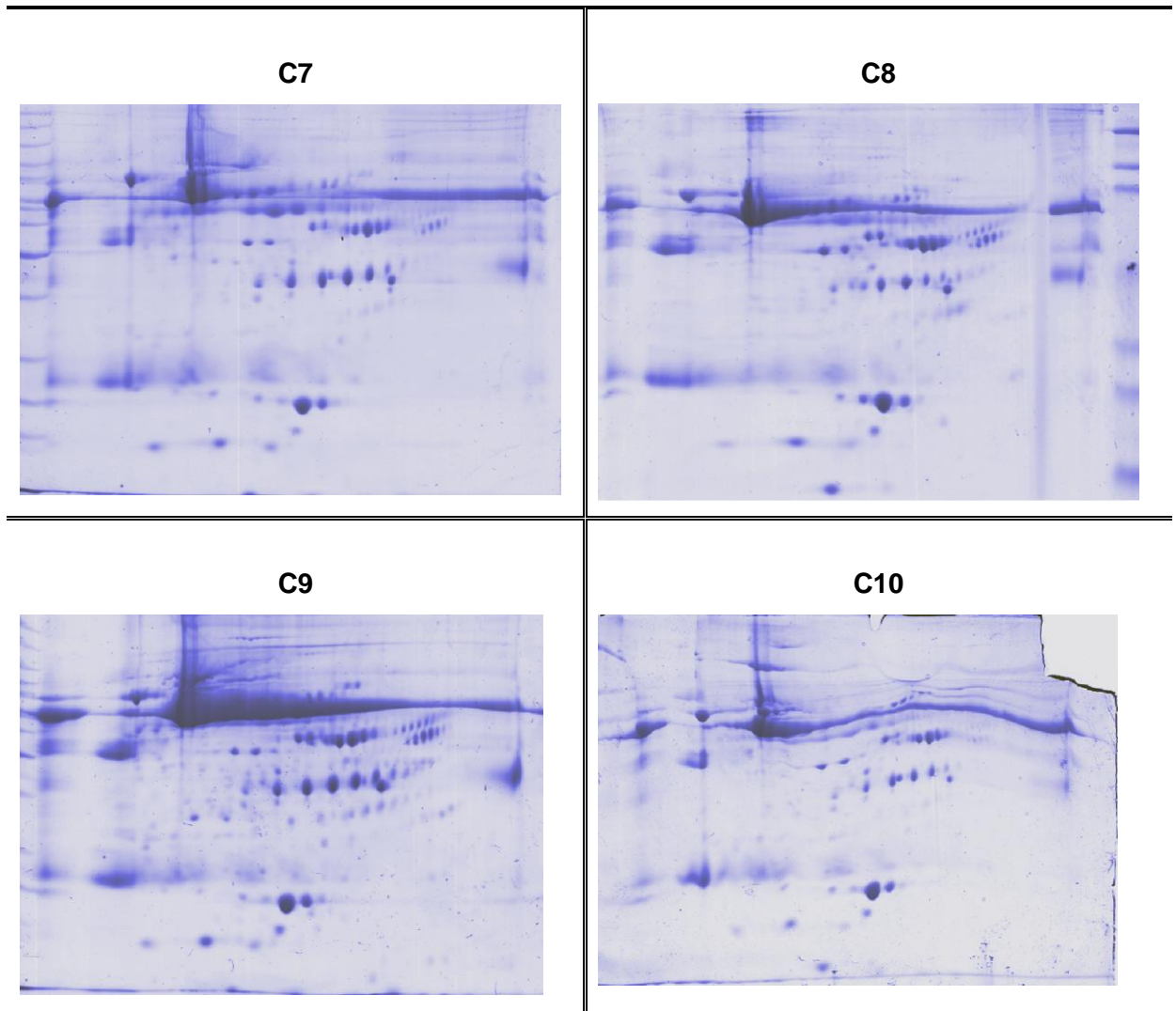


Figura 3.9. Geles bidimensionales 2D-PAGE de los plasmas de los pacientes sanos tomados como control (C1 a C10). Los geles fueron realizados usando tiras de 7cm de un rango de pH de 4-7, poliacrilamida al 10% y teñidos con azul de comassie coloidal G-250.

3.3ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2D)

Con el objetivo de identificar las proteínas que presentaban alteraciones significativas en sus niveles de expresión en los grupos de pacientes estudiados, se realizó el análisis de las imágenes SDS-2D-PAGE mediante el software PD-

QUEST. Mediante este software es posible comparar los niveles de intensidad de una mancha de proteína en cientos de geles simultáneamente, realizar análisis estadísticos, y crear bases de datos para facilitar la identificación de aquellas proteínas de interés.

3.3.1 Análisis de los tres grupos NSTEMI; AI y controles. Los mapas proteicos de los pacientes fueron agrupados y analizados mediante una revisión pormenorizada de las manchas identificadas en cada gel. Inicialmente, se realizó la comparación de las proteínas expresadas por los pacientes con SCA (NSTEMI, AI) con respecto a aquellas identificadas en los pacientes tomados como control. Posteriormente, se realizó el análisis comparativo entre los pacientes con NSTEMI y aquellos clasificados como AI. En cada análisis fueron identificadas aquellas manchas que presentaban niveles de expresión alterados en $\pm 30\%$, y posteriormente fueron seleccionadas aquellas manchas que presentaban diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), por medio de la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

El análisis de las proteínas expresadas por los pacientes analizados arrojó como resultado general la identificación de más de 350 manchas proteicas, de las cuales 29 presentaron niveles de expresión alterados en los pacientes con SCA con respecto a los controles. Estos resultados concuerdan con aquellos reportados por Mateos Et al (2004). Estos investigadores realizaron geles 2D-PAGE de muestras de plasma a 9 pacientes con AMI, 8 pacientes con AI y 9 controles; e identificaron alrededor de 400 manchas proteicas en los pacientes analizados. Asimismo, Dardé (2010) realizó geles 2D y DIGE a 40 pacientes con SCA sin elevación del segmento ST y 20 controles, encontrando 33 manchas proteicas que presentaban expresión diferencial en los pacientes con SCA con respecto a los controles.

Comparación de los pacientes con NSTEMI y el grupo control de voluntarios sanos

Se hallaron 26 manchas diferencialmente expresadas entre los grupos analizados. Se estableció que 20 de estas proteínas presentaban niveles de expresión aumentados en los pacientes con NSTEMI, y las restantes presentaron niveles de expresión bajos ($\pm 30\%$) con respecto al nivel de expresión encontrado en los pacientes control. Sin embargo, de estas manchas, sólo 4 presentaron diferencias estadísticamente significativas en sus niveles de expresión ($p < 0.05$).

Análisis entre los pacientes con AI y los controles:

Se identificaron 23 manchas que presentaban diferencias en los niveles de expresión entre los grupos analizados. Se estableció que 20 de estas proteínas presentaban niveles de expresión aumentados en los pacientes con AI, mientras que las restantes presentaron niveles de expresión bajos ($\pm 30\%$) con respecto al nivel de expresión encontrado en los pacientes control. Pese a esto, tan sólo 4 de estas manchas presentaron diferencias estadísticamente significativas en sus niveles de expresión ($p < 0.05$).

Análisis entre los pacientes con AI y los pacientes con NSTEMI:

En el análisis entre los pacientes con SCA, se encontraron 25 manchas que presentaban diferencias en los niveles de expresión. Se estableció que diez de estas proteínas presentaban niveles de expresión aumentados en los pacientes con NSTEMI, y las restantes presentaron niveles de expresión bajos ($\pm 30\%$), con respecto al nivel de expresión encontrado en los pacientes con AI. No obstante, sólo cinco de estas manchas presentaron diferencias estadísticamente significativas en sus niveles de expresión ($p < 0.05$).

La figura 3.10 muestra un gráfico de barras donde se presenta un paralelo del número de manchas que presentan diferencias en los niveles de expresión, en cada uno de los análisis realizados. En el análisis de los pacientes con SCA, con

respecto a los controles, se observa que alrededor del 80% de las proteínas presentan niveles de expresión aumentados con respecto a los pacientes sanos tomados como control. Mientras que al comparar los resultados obtenidos entre los pacientes con NSTEMI y los pacientes con AI, se observan similitudes entre la cantidad de proteínas que presentaron niveles de expresión aumentados, y aquellas en las cuales el nivel de expresión fue menor, con respecto a los pacientes con AI. Asimismo, el porcentaje de proteínas que presentan diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión fue aproximadamente del 18% en todos los análisis realizados.

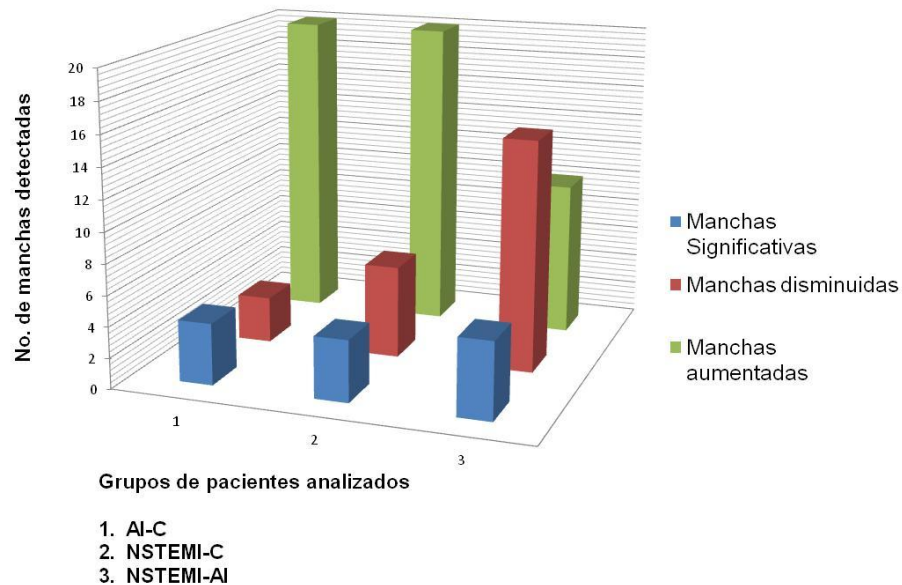


Figura 3.10 Resumen del análisis comparativo de las diferencias en niveles de expresión de proteínas en cada uno de los análisis realizados. MA. Corresponde a las manchas con niveles de expresión aumentados. MD representa las manchas con niveles de expresión disminuidos. MS. Corresponde a las manchas cuyas diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0.05$) de acuerdo a la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

3.3.2. Análisis multivariado. Los resultados obtenidos mediante el software de imágenes PD-QUEST version 8.0.1, fueron exportados al programa de procesamiento Excel. Con el objetivo de facilitar el manejo de los resultados y lograr una distribución normal; se aplicó logaritmo natural a los datos obtenidos y sólo fueron incluidas en el análisis aquellas proteínas que estaban presentes en por lo menos seis de los pacientes analizados en un grupo específico (NSTEMI, AI y/o controles). Posteriormente, haciendo uso del programa SPSS, se realizó un análisis discriminante que nos permitió establecer la existencia de diferencias significativas en los grupos de pacientes analizados con respecto a los niveles de expresión de las proteínas identificadas. El análisis discriminante revisa cada variable (nivel de expresión de la proteína (NEP)) con respecto a una prueba de tolerancia, que permite establecer aquellas variables que aportan información para la formación de los grupos; permitiendo así, conocer las proteínas que caracterizan los grupos de pacientes analizados. De esta manera, obtuvimos dos funciones discriminantes, producto de la combinación de aquellas variables (NEP) que permitieron la separación de los grupos. La figura 3.11 muestra la posición de cada uno de los centroides de los grupos analizados con respecto a las dos funciones discriminantes. La efectiva separación de los casos, confirma que los grupos analizados están bien diferenciados en cuanto a las funciones discriminantes establecidas. Finalmente, la tabla A2.1 presenta la matriz de estructura que contiene las 26 proteínas que presentaron diferencias significativas, apreciables para la separación de los grupos analizados (Ver anexo 2).

Seguidamente, se sometieron a la prueba de Levine los niveles de intensidad de las 26 proteínas consignadas en la tabla A2.1 para confirmar la homogeneidad en las varianzas. Posteriormente, se realizó la prueba de ANOVA seguida de la prueba de Dunnett, para identificar aquellas proteínas que presentaban $p < 0.05$ con respecto al grupo de pacientes tomados como control. Finalmente, se estableció que seis de las veintiséis proteínas analizadas presentaban $p < 0.05$. De

3.4 IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LAS PROTEÍNAS EXPRESADAS DIFERENCIALMENTE ($p < 0.05$).

A continuación se presentan las proteínas que presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$), en alguno de los análisis estadísticos realizados:

Tabla 3.5. Manchas identificadas en el estudio que presentaron diferencias estadísticamente significativas en sus niveles de expresión. Aζ proteínas con niveles de expresión aumentados con respecto a aquellos encontrados en los pacientes con AI y los controles. D* Proteínas con niveles de expresión disminuidos a aquellos encontrados en los pacientes tomados como control (Ver anexo 3).

PROTEÍNAS	KDa/pi	NSTEMI	AI	Controles
2105	Proteína no caracterizada	Aζ	-	-
2202	Haptoglobina	Aζ	-	-
6403	Antitrombina	Aζ		
8402	α 1-antiquimiotripsina	D*	D*	-
8501	α 1-antiquimiotripsina	D*	D*	

Estas proteínas fueron extraídas del gel de 2D-PAGE, digeridas con tripsina, analizadas por espectrometría de masas LC MS/MS y bioinformática para establecer su identidad inequívoca.

La haptoglobina

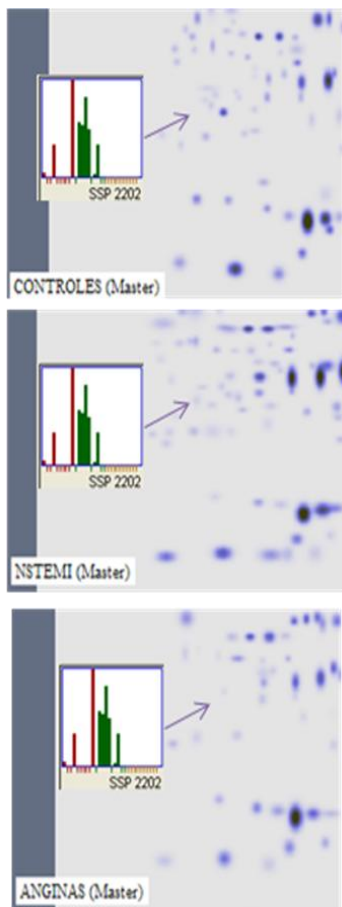


Figura 3.12 Histogramas de la expresión diferencial de la haptoglobina. Las barras verdes representan los niveles encontrados en los pacientes con NSTEMI. Las barras rojas, los niveles de los pacientes con AI.

La causa más frecuente de la trombosis coronaria es la ruptura de la placa de ateroma. (Gensini y col., 2002) Se ha establecido la existencia de placas vulnerables que están formadas por un gran núcleo lipídico, una capa fibrosa delgada, infiltración de factores inflamatorios y hemorragias intraplaca (Fuster y col., 2005; Kockx y col., 2003). La hemoglobina extracopular liberada de los globulos rojos después de la hemorragia intraplaca, es altamente tóxica debido a las propiedades oxidativas del grupo hemo, el cual participa de la reacción Fenton para producir especies reactivas de oxígeno que causan lesión del tejido (Watanabe y col., 2009) y además, representa un potente estimulador de la inflamación dentro de la placa. Un importante mecanismo para contrarrestar los efectos de las hemorragias intra-placas es mediada por la haptoglobina (Hp), una proteína abundante del plasma que actúa como un antioxidante al enlazarse a la hemoglobina (Hb), y de este modo previene el daño oxidativo del tejido y su potencial inflamatorio (Melamed y col., 2001).

Mediante el receptor de recolección CD613 presente en los macrófagos, los complejos Hp-Hb son endocitados y eliminados de los sitios de hemorragia en la placa aterosclerótica (Heilskov y col., 2001; Levy y col., 2007). En humanos, el locus del gen estructural de la haptoglobina es polimórfico y tiene dos alelos (Hp1 y Hp2), codificando para tres fenotipos (Hp1-1, Hp 2-1, Hp 2-2). Se han demostrado diferencias funcionales entre los tres fenotipos. La Hp 2-2 se caracteriza por su fuerte reactividad inmunológica, su baja habilidad para enlazarse a la Hb y por ello su pobre protección contra los efectos perjudiciales del daño oxidativo. Estas características ponen de manifiesto el posible rol de la Hp en la patogénesis de la arteroesclerosis (Braeckman y col., 1999). Pacientes hipertensos con Hp 2-2 son más propensos a desarrollar lesiones arteroescleróticas de las arterias coronarias. Esos pacientes presentan más infartos al miocardio, y están en alto riesgo de desarrollar hipertensión. Asimismo, se han asociado los niveles de Hp con los niveles en suero de triglicéridos y apolipoproteínas (Delanghe y col., 1997). Adicionalmente, La Hp 1-1 genera dímeros a partir de la interacción con otra Hp. Mientras que la Hp 2-2, interacciona con dos moléculas de Hp y forma estructuras cíclicas. Se ha determinado que el complejo Hb/Hp 1-1 es un mejor estimulador de los macrófagos para secretar citoquinas antiinflamatorias, comparado con el complejo formado por la Hp 2-2 (Levy y col., 2007).

El rol que desempeña la haptoglobina en la ruptura de la placa de ateroma y la asociación de la Hp con la progresión de la arteroesclerosis, evidencian los niveles aumentados de haptoglobina en los pacientes con NSTEMI analizados en nuestro estudio. La utilidad de esta proteína en el diagnóstico de los pacientes con SCA sin supradesnivel, estaría condicionado al tiempo de inicio de su elevación en el plasma y a la incidencia de las microhemorragias en las placas de ateroma. El trabajo realizado por Kockx et al. en el 2003, revela que las microhemorragias que se presentan en las placas arteroescleróticas activan los macrófagos, la formación

de células espumosas y eventualmente podrían promover la vulnerabilidad de la placa a la ruptura. Esto nos permite sugerir que los niveles de haptoglobina en el plasma pueden elevarse antes del evento cardíaco. Adicionalmente, se ha reportado que estas microhemorragias son subestimadas y que podrían ocurrir en más del 40% de los pacientes con placas ateroscleróticas avanzadas (Levy y col., 2007). Nuestros resultados muestran que los niveles de haptoglobina están aumentados en el 60% de los pacientes con NSTEMI, lo que insinuaría que estos pacientes presentaron microhemorragias en sus placas de ateroma. Estos resultados indicarían la prevalencia de los niveles aumentados en los pacientes con NSTEMI y la incidencia de las microhemorragias en las placas ateroscleróticas; lo cual pone de manifiesto que la haptoglobina podría convertirse en un potencial marcador de diagnóstico en pacientes con SCA sin supradesnivel.

A 1-Antiquimiotripsina

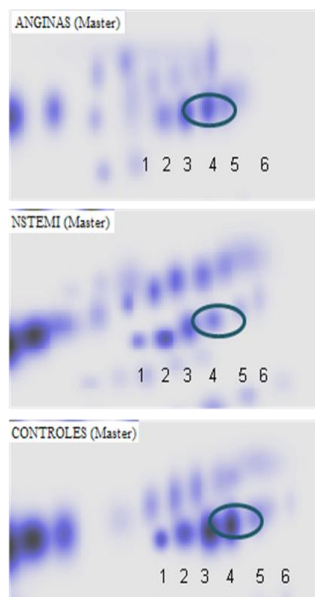


Figura 3.13 Patrón representativo de la α 1-antiquimiotripsina (AAT_HUMAN) en los pacientes con SCA sin supradesnivel y controles. Las imágenes fueron obtenidas de geles 2D-PAGE realizados usando tiras de 4-7 de pH.

El remodelamiento de los ventrículos desempeña un rol importante en la enfermedad coronaria. Normalmente, existe un balance entre las *metaloproteínas* de la matriz y los *inhibidores de metaloproteínas en los tejidos*. Un desbalance en este equilibrio está asociado con dilatación ventricular y deterioro de la función ventricular izquierda (Loftus y col., 2002).

La matrix extracelular (MEC) está compuesta por elastinas, colágeno y proteoglicanos que proveen resistencia, soporte y estructuran el tejido. Las enzimas proteolíticas, como las metaloproteinasas y las serin proteasas catepsina cisteína, pueden degradar la MEC y

contribuir a procesos fisiológicos como la aterosclerosis (Lutgens, 2007). La catepsina G es una serin proteasa que ha mostrado potentes propiedades pro-inflamatorias. Entre sus funciones más importantes, se destacan el papel que desempeña en la degradación de las citoquinas y componentes de la MEC, y también su potencial quimioatrayente de las células T. La catepsina G rompe los receptores acoplados a proteína G (GPCRs) como un mecanismo para modular la coagulación y el remodelamiento de los tejidos en los sitios de inflamación y lesión. Adicionalmente, también induce la activación de metaloproteinasas de matrix (Sharony y col., 2010). Un mecanismo para contrarrestar los efectos de las proteasas, lo representa la acción de la α 1-antiquimiotripsina (AACT), una serpina que inhibe la actividad de algunas proteasas, entre ellas la catepsina G (Kalsheker, 1996).

En el estudio proteómico, realizado a pacientes con SCA sin supradesnivel, se identificaron dos isoformas (tabla 3.6) de la AACT que presentan diferencias estadísticamente significativas en sus niveles de expresión. Las isoformas (3) y (4) presentaron niveles de expresión disminuidos en los pacientes con NSTEMI, comparados con el nivel de expresión observado en pacientes con AI y los controles. Estos resultados son consistentes con los reportados por Kaźmierczak et al. en cuyo trabajo evaluaron los niveles de proteínas de fase aguda, como proteína C reactiva y α 1-antiquimiotripsina, en pacientes con enfermedades coronarias. Los resultados revelan que los pacientes con angina inestable presentan mayores incrementos en los niveles de estas proteínas (Kaźmierczak y col., 1999). Adicionalmente, las isoformas (1) y (6) no se observaron en los pacientes con AI, mientras que en los pacientes con NSTEMI y controles los niveles de expresión detectados fueron similares. Estas observaciones indicarían que algunos genotipos de AACT podrían estar asociados con reducción del riesgo de isquemia en enfermedades cardiacas (Murohara y col., 1995). Adicionalmente, los niveles disminuidos de la isoforma (4) de la AACT podrían sugerir la

importancia de esta proteína como marcador de diagnóstico de los pacientes con SCA sin supradesnivel.

Tabla 3.6. Isoformas de la α 1-AACT identificadas en el plasma de pacientes con NSTEMI, AI y controles. Se presentan los niveles de expresión en unidades de intensidad, los datos se representan como la media \pm ESM. MP: peso molecular, pl exp: punto isoeléctrico experimental.

Proteína	MP/pl exp.	NSTEMI	AI	Controles
α 1-AACT (IS 1)	53.4/6.36	1.1 (0.13)	ND	0.98 (0.02)
α 1-AACT (IS 2)	53.9/6.41	1.70 (0.25)	1.9 (0.26)	1.63 (0.20)
α 1-AACT (IS 3)	55.2/6.46	2.30 (0.21)	2.62 (0.25)	2.79 (0.22)
α 1-AACT (IS 4)	56.6/6.50	1.80 (0.22)	2.10 (0.20)	2.43 (0.13)
α 1-AACT (IS 5)	58.0/6.55	1.23 (0.21)	1.60 (0.23)	1.21 (0.87)
α 1-AACT (IS 6)	58.5/6.61	1.40 (0.28)	ND	1.36 (0.17)

Antitrombina III

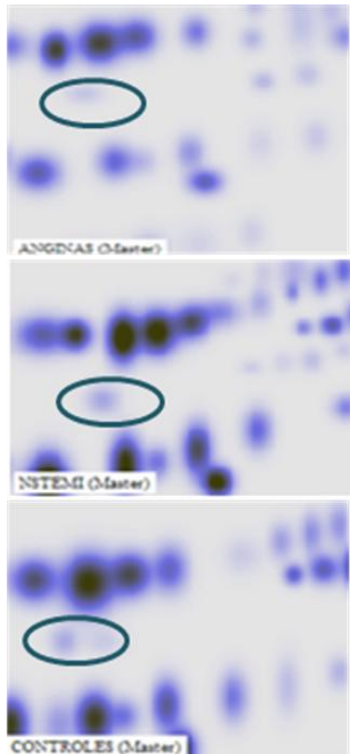


Figura 3.14 Patrón representativo de la antitrombina III (ANT3_HUMAN) en los pacientes con SCA sin supradesnivel y controles. Las imágenes fueron obtenidas de geles 2D-PAGE realizados usando tiras de 4-7 de pH.

La trombosis producto de la ruptura de la placa de ateroma constituye la principal causa de los SCA. Cuando se produce la ruptura, el contacto del tejido sanguíneo con el factor tisular presente en el núcleo lipídico de la placa, desencadena el proceso trombótico (Fuster y col., 2005). La trombina es la enzima clave en la coagulación sanguínea. Su principal función es la degradación del fibrinógeno a monómeros de fibrina, mediante la activación de las plaquetas y los factores de coagulación. La actividad de la trombina es regulada principalmente por dos mecanismos diferentes. Cuando la trombina se enlaza a la proteína de membrana trombosmodulina pierde todas sus propiedades procoagulantes. Otro mecanismo de regulación está dado por un grupo de inhibidores de la enzima. La antitrombina es el principal inhibidor plasmático de la trombina (Davie y col., 1991).

La antitrombina III, es una serpina que regula las serin proteinasas de la cascada de coagulación de la sangre. Está bien establecido que las deficiencias genéticas de esta serpina en humanos, está asociada con el incremento del riesgo de desarrollo anormal de trombos o procesos trombóticos (Olson y col., 2010; Kostka y col., 2005). El análisis de esta proteína en nuestro estudio revela niveles elevados en los pacientes con NSTEMI (Figura 3.14), comparados con los niveles observados en los pacientes con AI y controles. Estos resultados podrían evidenciar la naturaleza de la obstrucción del flujo coronario. Teniendo en cuenta

que la angina inestable es producto de trombos lábiles que se forman y se lisan; mientras que el infarto agudo del miocardio sin onda Q, se produce por la formación de trombos no oclusivos que se lisan espontáneamente o por agentes fibrinolíticos, en menos de seis horas (Zarco, 1996).

De acuerdo a estos resultados, la antitrombina III podría ser un indicador de la gravedad de la obstrucción presente en los pacientes con SCA sin supradesnivel. La aparente correlación positiva entre los niveles de antitrombina y la duración del trombo no oclusivo podría evidenciar la importancia de la antitrombina al discriminar la gravedad del evento coronario en los pacientes con SCA sin supradesnivel. Sin embargo, se debe tener en cuenta que correlaciones similares pueden presentarse en aquellos pacientes que han sido sometidos a terapia con anticoagulantes.

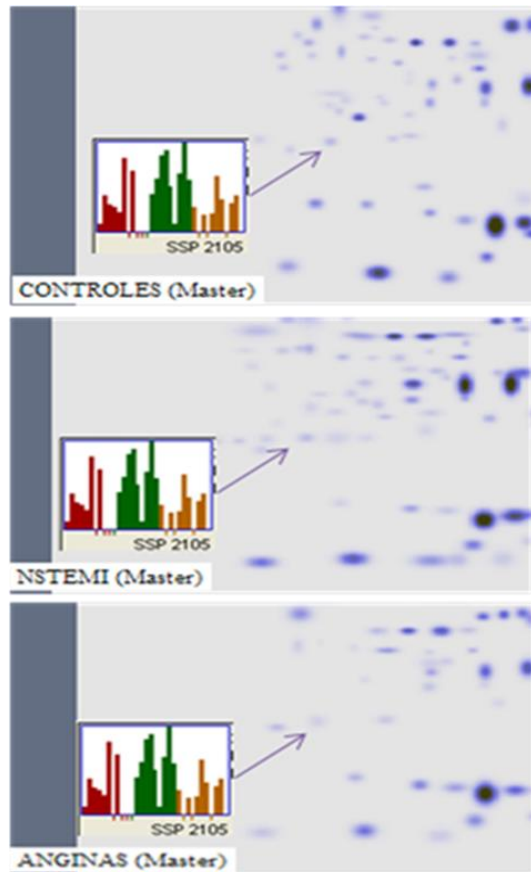
Proteína no caracterizada

Figura 3.15 Histograma de la expresión diferencial de la proteína no caracterizada. Las barras verdes representan los niveles encontrados en los pacientes con NSTEMI. Las barras rojas representan los niveles encontrados en los pacientes con AI. Las barras naranja representan los niveles encontrados en los pacientes control.

Fueron identificados niveles aumentados de esta *proteína no caracterizada* en los pacientes con NSTEMI, con respecto a los niveles observados en las AI y los controles. Esta proteína fue expresada en el 90% de los pacientes con NSTEMI, el 70% de los pacientes con AI y el 70% de los pacientes tomados como control. Adicionalmente, las diferencias entre los niveles observados en los pacientes con NSTEMI y las AI son estadísticamente significativas, tal como se muestra en la figura 3.15.

El posible rol que desempeña esta proteína en el desarrollo y progresión de los SCA; representaría un campo de investigación importante, teniendo en cuenta la elevación de sus niveles en los pacientes con NSTEMI y por ello la potencial utilidad de esta proteína en el

diagnóstico de los pacientes con SCA sin supradesnivel.

Definitivamente, la identificación de proteínas relacionadas con: la respuesta inflamatoria, la protección del daño producido por las proteasas en el tejido epitelial y la regulación de proteínas que participan en la cascada de coagulación desencadenada por la ruptura de las placas de ateroma; pone de manifiesto los múltiples factores que intervienen en el desarrollo de los SCA. Como se encuentra

reportado en la literatura, las proteínas identificadas en nuestro estudio no son exclusivas de las enfermedades coronarias y se han relacionado con diversas enfermedades como diabetes, alzheimer, cirrosis hepática, enfermedades pulmonares, entre otras (Awadallah y col., 2008; Ritchie y col.,2004; Thomas 2000, Faber y col.,1993). No obstante, estas proteínas podrían ser consideradas candidatos a marcadores de la enfermedad. El análisis de sus niveles, como una aproximación a la estrategia de multibiomarcadores (Morrow y col., 2003; Villarriño y col., 2004), apoyada por las herramientas de diagnóstico usadas actualmente en la práctica clínica; podrían representar una alternativa prometedora en el esfuerzo por establecer el diagnóstico adecuado de los pacientes con SCA sin supradesnivel. La identificación de estas proteínas que presentan alteraciones estadísticamente significativas en sus niveles de expresión, demuestran que el análisis proteómico del plasma es una herramienta útil para identificar posibles biomarcadores en el plasma de los pacientes con SCA sin supradesnivel.

3.5. IDENTIFICACIÓN POR ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS PROTEÍNAS EXPRESADAS DIFERENCIALMENTE.

Como una aproximación en el intento de conocer la identidad de las proteínas que presentaron niveles de expresión alterados, con $p > 0.05$; se organizó una base de datos que contenía la caracterización por masa molecular (PM) y punto isoeléctrico (pI) de aquellas proteínas plasmáticas relacionadas con enfermedades cardiovasculares. En el anexo A3.1 se reúnen las 177 proteínas incluidas y sus isoformas, para un total aproximado de 283 proteínas.

A continuación en la tabla 3.7 se presentan las proteínas que mostraron niveles de expresión alterados con respecto a alguno de los grupos de estudio:

Tabla 3.7. Manchas identificadas en el estudio que presentaron diferencias en sus niveles de expresión. Aζ proteínas con niveles de expresión aumentados con respecto a los niveles encontrados en los pacientes con AI y los controles. A≠ proteínas con niveles de expresión aumentados con respecto a los niveles encontrados en los pacientes con NSTEMI y controles. A£ proteínas con niveles de expresión aumentados con respecto a los niveles encontrados en los pacientes tomados como control. D£ proteínas con niveles de expresión disminuidos con respecto a los niveles encontrados en los pacientes tomados como control.

PROTEÍNAS	KDa/pl	NSTEMI	AI	Controles
2201	40.03/5.16		A≠	-
2305	43.41/4.91		A≠	-
3001	12.98/5.33	A£	-A£	-
3003	8.74/5.42	A£	A£	-
4101	26.5/5.87	Aζ	-	-
5101	25.6/5.70	Aζ	-	-
5003	12.43/5.86	A£	A£	
6102	28.0/6.13	A£	-A£	-
6401	52.8/6.11	D£	D£	

3.5.1 Identificación de las proteínas aumentadas en los pacientes con NSTEMI. Inicialmente, fueron identificadas las proteínas presentes en los pacientes con NSTEMI que alcanzaron niveles de expresión aumentados con respecto a los demás grupos estudiados. La tabla 3.8 presenta las proteínas reportadas en la literatura que presentaron mayor similitud en sus valores de PM y pl con respecto a aquellos observados en nuestro estudio.

Tabla 3.8. Proteínas identificadas por análisis bioinformático utilizando la base de datos SWISS 2D-PAGE (Instituto suizo de Bioinformática).

PM o	plo	PMt	plt	Código PDB	Proteína
26.5	5.87	26.5	5.46	Q15848	Adiponectina
25.6	5.70	25.9	5.66	P10909	Clusterina cadena Beta

PMo: peso molecular observado. plo: punto isoeléctrico observado. PMt: peso molecular teórico. plt: punto isoeléctrico teórico.

La adiponectina

La *adiponectina*, es una adipocitocina secretada por el tejido adiposo, y que se ha relacionado con desórdenes de obesidad. Es una proteína abundante en el plasma humano (3-30 µg/ml), que circula en éste con diferentes formas oligoméricas, tales como: trímeros, hexámeros y formas de alto peso molecular.

La adiponectina regula negativamente la acumulación de depósitos de grasa en el cuerpo y ha sido relacionada con diabetes tipo 2, enfermedades coronarias e hipertensión (Shibata y col., 2009). Se le ha vinculado con múltiples funciones fisiológicas como la modulación del metabolismo de la glucosa y la homeostasis

energética (Bik y col., 2009). Estudios epidemiológicos que relacionan los niveles plasmáticos de adiponectina con enfermedades coronarias han presentado resultados controversiales. Dos estudios prospectivos realizados a indios americanos y mujeres británicas, respectivamente, no hallaron asociación entre los niveles plasmáticos de adiponectina y la incidencia de enfermedades coronarias; pero un reciente estudio prospectivo y un meta-análisis reporta asociación entre ambas (Shibata y col., 2009). Sin embargo, estudios prospectivos sugieren que altos niveles de adiponectina podrían ser predictores de mortalidad en pacientes con falla cardiaca congestiva. Adicionalmente, se ha encontrado una fuerte correlación entre los niveles de BNP o NT-proBNP y la adiponectina (Haugen y col., 2008; Kistomp y col., 2005; McEntegart y col., 2007; Tamura y col., 2007; Tanaka y col., 2008; Wannamethee y col., 2007). Asimismo, se han asociado los niveles plasmáticos de adiponectina con los de TNF α y de lipoproteínas oxidadas de baja densidad (Shinmura, 2010).

Clusterina

La proteína *clusterina* (apo-lipoproteína J) es una proteína heterodimérica, que inicialmente fue hidrolizada entre los residuos 227/228 para remover el péptido señal y generar las cadenas alfa y beta. Estas cadenas son ensambladas para dar un molécula heterodimérica en la cual los residuos de cisteína se enlazan para formar cinco puentes disulfuro. La apoJ se ha encontrado en diversos fluidos fisiológicos como el plasma, la orina, la leche materna, el semen y el fluido cerebroespinal. Esta amplia distribución sugiere que la apoJ realiza funciones biológicas muy importantes, como el transporte de lípidos, la maduración de la esperma, regulación de la cascada del complemento, apoptosis y reciclamiento de la membrana (Miyata y col., 2010). Se ha reportado que la apoJ es liberada al plasma como respuesta a la lesión tisular en diversos tejidos. En experimentos de

micoarditis inmune, usados para estudiar los mecanismos autoinmunológicos en enfermedades inflamatorias (Wenrui y col., 2004), se ha encontrado que la apoJ se acumula en los miocitos en la interface entre el tejido miocárdico degenerado y los alrededores del tejido miocárdico sano (Swertfeger y col., 1996). Un estudio donde se pretendía conocer los mecanismos de re-estenosis después de una angioplastia coronaria, se encontró que la apoJ es inducida en la íntima y neoíntima del tejido epitelial. Adicionalmente, se estableció que la apoJ estimula la proliferación y migración de las células del músculo liso, ante lo cual, los autores sugieren que la apoJ contribuye a la re-estenosis después de la angioplastia (Miyata y col., 2010).

Los altos niveles de clusterina observados en los pacientes con NSTEMI analizados en nuestro estudio; pueden ser producto de la lesión del tejido cardiaco causada por la deficiencia de oxígeno. Por otro lado, no se ha confirmado el papel que desempeña la apoJ en los procedimientos de angioplastia, y puede deberse simplemente a que esta proteína está presente en los tejidos lesionados tal como ha sido reportado por Swertfeger (1996).

3.5.2 Identificación de las proteínas aumentadas en los pacientes con AI. A continuación, fueron identificadas las proteínas que alcanzaron niveles de expresión aumentados en los pacientes con Angina inestable con respecto a los niveles observados en los pacientes sanos tomados como controles. La tabla 3.9 presenta las proteínas reportadas en la literatura que presentaron mayor similitud en sus valores de PM y pI con respecto a aquellos observados en nuestro estudio.

Tabla 3.9. Proteínas identificadas por análisis bioinformático utilizando la base de datos SWISS 2D-PAGE (Instituto suizo de Bioinformática).

<i>PM o</i>	<i>pl</i>	<i>PMt</i>	<i>plt</i>	<i>Código PDB</i>	<i>Proteína</i>
43.41	4.91	43.4	5.05	P06727	Apolipoproteína
40.03	5.16	40.4	5.34	P22891	Proteína Z

PMo: peso molecular observado. plo: punto isoeléctrico observado. PMt: peso molecular teórico. plt: punto isoeléctrico teórico.

La apolipoproteína

La *apolipoproteína (Lp(a))* es una clase de lipoproteína que se sintetiza en el hígado y une a una molécula de LDL por medio de un enlace disulfuro. Sus funciones vasculares son desconocidas, pero presenta regiones homólogas al sitio activo del plasminógeno, lo cual sugiere que podría mejorar o inhibir la fibrinólisis (Danesh y col., 2000).

Un meta-análisis realizado con 27 estudios prospectivos reveló una asociación entre los niveles de Lpa y las enfermedades de las arterias coronarias (Danesh y col., 2000). Por otro lado, un estudio epidemiológico prospectivo realizado a 1777 japoneses americanos, mostró asociación entre niveles altos de Lp(a), niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad LDL y el padecimiento de enfermedades coronarias. Los autores sugieren que el conocimiento de las falencias del metabolismo de los lípidos en los individuos que padecen enfermedad coronaria, podría contribuir al manejo de esta enfermedad (Sharp y col., 2000). Los niveles aumentados de Lp(a) en los pacientes con AI son consistentes con los resultados encontrados por Dardé (2010), en cuyo estudio proteómico en pacientes con SCA, observó niveles alterados de Lp(a) con respecto a los niveles encontrados en los controles sanos. Del mismo modo, en el análisis de proteínas realizado por

Mateos-Cáceres en el 2004, se reportaron niveles aumentados de Lp(a) en los pacientes con AI con respecto al nivel de expresión observado en los pacientes con NSTEMI y los pacientes control.

Los niveles diferenciales de la Lp(a) en los pacientes con AI y NSTEMI, confirmados en otros estudios, pone de manifiesto la importancia de esta proteína como un marcador bioquímico útil en la discriminación de estas patologías. Las propiedades anti-inflamatorias reportadas para la Lp(a) (Dimayuga y col., 1999), pueden explicar el papel antagónico que desempeña esta proteína ante la reacción inflamatoria que genera el evento cardiaco (Mateos-Cáceres y col., 2004); y esta función que se ve reflejada en el aumento de sus niveles plasmáticos en aquellos pacientes que no presentaron complicaciones mayores.

La proteína Z

La **proteína Z (PZ)** es un miembro de los factores de coagulación plasmáticos dependientes de vitamina-K, entre los cuales se incluye las proteínas pro coagulantes como los factores II, VII, IX y X, así como también la proteína anticoagulante C. Aunque no se ha establecido su rol exacto en la coagulación, se le ha vinculado por un lado con la trombina para favorecer la coagulación, y por otro lado por ser un anticoagulante natural (Lichy y col., 2004).

La ubicación de la PZ en las lesiones vasculares ateroscleróticas de pacientes diabéticos y no diabéticos, fue investigada y comparada con controles sanos. La PZ fue detectada en el endotelio microvascular y en depósitos extravasculares alrededor de las placas de los pacientes diabéticos y no diabéticos, y no fue detectado en el espacio subendotelial, ni en las células del endotelio microvascular de individuos sanos (Greten y col., 1998). Se han asociado los niveles plasmáticos

de la PZ con un estado protrombótico en el contexto de la isquemia cerebral en individuos jóvenes (Lichy y col., 2004).

Gris y colaboradores, sugirieron que la PZ desempeña un rol anticoagulante en el embarazo (Gris y col., 2002). Los niveles aumentados de esta proteína en pacientes con angina inestable, podrían estar relacionados con los resultados encontrados por Gris, y podrían representar una posible explicación de las diferencias en la severidad de los eventos cardiacos presentados por los pacientes con AI con respecto a aquellos que tuvieron un NSTEMI.

3.5.3 Identificación de las proteínas aumentadas en los pacientes con SCA.

En el análisis de imágenes se observaron proteínas que alcanzaron niveles de expresión aumentados en los pacientes con SCA (AI, NSTEMI), con respecto a aquellos encontrados en los controles. La tabla 3.10 presenta las proteínas reportadas en la literatura que presentaron mayor similitud en sus valores de PM y pl con respecto a aquellos observados en nuestro estudio.

La sangre contiene un sistema enzimático denominado sistema fibrinolítico encargado de disolver los coágulos de sangre. Este sistema está compuesto por una proenzima, el plasminógeno y activadores del plasminógeno. Estos últimos, son los encargados de convertir el plasminógeno en plasmina, que corresponde a la forma activa encargada de degradar las redes de fibrina formadas en el proceso de coagulación sanguínea.

El activador tisular del plasminógeno

El *activador tisular del plasminógeno (t-PA)* es una serina proteasa de 527 aminoácidos. Está formada por dos cadenas producto de la ruptura proteolítica del

enlace formado entre la Arg 275-Ile 276. La cadena A (cadena pesada) está presente en el extremo amino terminal de la proteína y la cadena B (cadena ligera) contiene el sitio activo de la enzima.

La cadena ligera es capaz de activar el plasminógeno, pero requiere de la cadena A para enlazarse a la fibrina. La presencia de la fibrina mejora notablemente la activación del plasminógeno porque incrementa la concentración local del plasminógeno al crear una interacción adicional entre la t-PA y el sustrato (Collen y col., 1991).

Tabla 3.10. Proteínas identificadas por análisis bioinformático utilizando la base de datos SWISS 2D-PAGE (Instituto suizo de Bioinformática).

<i>PMo</i>	<i>pl</i>	<i>PMt</i>	<i>plt</i>	Código PDB	Proteína
28.05	6.13	28.1	6.09	P00750	Activador tisular del plasminógeno
12.98	5.33	11.7	5.89	P02735	Proteína amiloide A del suero (SAA)
8.74	5.42	8.58	5.57	P02735	Proteína amiloide A
12.43	5.86	11.24	5.31	P02735	SSA (2-102)

.PMo: peso molecular observado. plo: punto isoeléctrico observado. PMt: peso molecular teórico. plt: punto isoeléctrico teórico.

Se realizó un estudio prospectivo que halló asociación entre el incremento de los niveles de t-PA con el riesgo de sufrir un infarto al miocardio (Ridker y col., 2003). Los niveles aumentados de la cadena A de la t-PA en los pacientes con NSTEMI y

Al, analizados en nuestro estudio, confirma la importancia del sistema fibrinolítico en el desarrollo y pronóstico de los SCA.

La proteína amiloide del suero

La *proteína amiloide del suero* (SSA) consiste en una familia de apolipoproteínas que se enlazan a lipoproteínas de alta densidad después de su síntesis y participan activamente en el metabolismo del colesterol durante los estados inflamatorios. Se ha reportado que la proteína SSA permite la adhesión y quimiotaxis de células fagocíticas y linfocitos y podría contribuir a la inflamación de arterias coronarias con arterioesclerosis por incremento en la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (Gabay y col., 1999).

Se ha asociado los niveles de proteína SAA y la proteína C reactiva (PCR) con eventos vasculares como el infarto al miocardio y la falla cardíaca congestiva. Por esta razón, se ha sugerido a la SAA como el marcador complementario para la PCR. Sin embargo, se ha sugerido a la SAA como un marcador promisorio en las enfermedades cardiovasculares, puesto que exhibe un rango dinámico más amplio y la elevación de sus niveles en el plasma es más rápido (Johnson y col., 2004). Al igual que la PCR, se ha señalado que la SAA promueve la respuesta inflamatoria durante el proceso arterioesclerótico. Por esta razón, se han establecido rangos de concentración de la proteína que sugieren que los niveles de SSA son proporcionales al grado de inflamación, y podrían ser usadas para establecer el riesgo relacionado a la reacción inflamatoria en un SCA (Wu y col., 2007).

Los niveles aumentados de la proteína SSA en los pacientes con SCA con respecto a los niveles encontrados en los controles sanos; concuerdan con los resultados reportados por Dardé en 2010 y confirman la influencia de la respuesta inflamatoria que caracteriza el desarrollo y progreso de la enfermedad coronaria.

3.5.4 Identificación de la proteína disminuida en los pacientes con SCA.

Finalmente, se estableció la identidad de una proteína que presentó niveles disminuidos en los pacientes con SCA (AI, NSTEMI) con respecto a los niveles encontrados en los pacientes control. En la tabla 3.11 se muestra la proteína reportadas en la literatura que presenta mayor similitud en sus valores de PM y pl con respecto a aquellos observados en nuestro estudio.

Tabla 3.11. Proteínas identificadas por análisis bioinformático utilizando la base de datos SWISS 2D-PAGE (Instituto suizo de Bioinformática).

<i>PMo</i>	<i>pl</i>	<i>PMt</i>	<i>plt</i>	<i>PDB</i>	<i>Proteína</i>
52.8	6.11	54.0	6.22	P05546	Cofactor de la heparina II

PMo: peso molecular observado. plo: punto isoeléctrico observado. PMt: peso molecular teórico. plt: punto isoeléctrico teórico.

El cofactor II de la heparina

El **cofactor II de la heparina (HCII)** es un factor de coagulación miembro de la superfamilia de las serpinas (inhibidores dserinoproteasas), que inhibe principalmente la trombina, y sirve de cofactor para la heparina y el dermatan sulfato (Kamp y col., 2001).

El cofactor II de la heparina inhibe específicamente la trombina y esta inhibición se incrementa dramáticamente en presencia del dermatan sulfato. Los estudios realizados con humanos sugieren que altos niveles plasmáticos del HCII protegen contra la re-estenosis en intervenciones coronarias percutáneas (Takamori y col., 2004). Los análisis realizados en ratones, mostraron que el HCII interactúa con el dermatan sulfato en la pared arterial después de las lesiones del endotelio, y por lo

tanto exhibe efecto antitrombótico. Además, la deficiencia de HCII promueve la aterogénesis en el epitelio del ratón (Leidenfrost y col., 2003).

Los niveles aumentados del cofactor II de la heparina en los pacientes tomados como control, son coherentes con el rol que desempeña esta proteína en el proceso trombolítico, y que se han dilucidado mediante los estudios realizados en animales y humanos.

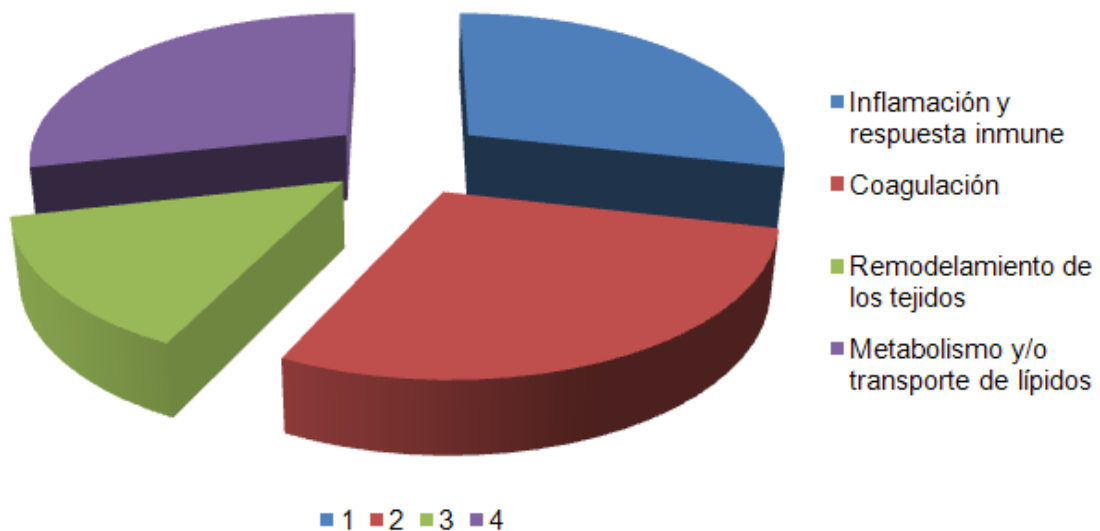


Figura 3.16. Diagrama circular que presenta la clasificación de las proteínas identificadas por el análisis bioinformático, en grupos funcionales asociados con la patología cardiovascular.

Finalmente, la figura 3.16 muestra un gráfico donde fueron clasificadas, las proteínas aparentemente identificadas, en los grupos funcionales que han sido asociados directamente con la patología cardiovascular: inflamación, coagulación, remodelamiento de los tejidos y metabolismo y/o transporte de lípidos (Dardé y col., 2010; Andersson, 2005; Ping y col., 2005; Berhane y col., 2005). De estas

proteínas, cuatro han sido relacionadas con enfermedades cardiovasculares y se han considerado como relevantes en los SCA. Sin embargo, las tres restantes (*adiponectina*, *clusterina* y *la proteína Z*) no habían sido relacionadas específicamente con enfermedades cardiovasculares o SCA. Estas proteínas en el futuro, podrían ser evaluadas como marcadores bioquímicos que podrían ser útiles en el diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad.

La concordancia entre la aparente identidad de las proteínas identificadas por bioinformática y los niveles aumentados o disminuidos en cada grupo de pacientes; fortalecen esta aproximación en la identificación de las proteínas diferencialmente expresadas ($p > 0.05$). Teniendo en cuenta que pueden presentarse dificultades asociadas a la separación de las proteínas en muestras complejas como el plasma; posible contaminación por otras proteínas, sumado a las bajas concentraciones de las proteínas de interés; lo cual dificultaría e incluso impediría la identificación inequívoca por espectrometría de masas de las proteínas con niveles de expresión alterados.

En definitiva, el presente trabajo muestra que la electroforesis bidimensional, la espectrometría de masas y el análisis bioinformático, son herramientas proteómicas útiles en el esfuerzo de identificar proteínas que presentan niveles de expresión alterados, asociados a esta patología y que podrían constituir futuros biomarcadores de la enfermedad. La ubicación de las proteínas, que presentan alteraciones en sus niveles de expresión, en los diferentes grupos funcionales asociados a la enfermedad; ponen de manifiesto, la importancia de la estrategia de multi-biomarcadores, propuesta por algunos autores (Morrow y col., 2003; Villariño y col., 2004) y que podría ser el camino a seguir en la búsqueda de mejores mecanismos que permitan apoyar el diagnóstico de los pacientes con SCA sin supradesnivel. Igualmente, estos resultados, serían el comienzo de futuros estudios encaminados a conocer el papel que desempeñan estas

proteínas en la fisiopatología de los SCA, o para evaluar su utilidad como biomarcadores de la enfermedad.

4. CONCLUSIONES

El tratamiento de precipitación con acetona permitió preparar las muestras de plasma de pacientes con SCA para llevar a cabo la separación de proteínas por SDS-2D-PAGE. Con este método de separación, se redujeron interferencias causadas por el exceso de albúmina y otras proteínas mayoritarias, permitiendo mejorar la resolución de proteínas menos abundantes y reduciendo las líneas horizontales y verticales en geles teñidos con azul de Coomassie coloidal.

La separación de proteínas por SDS-2D-PAGE y el análisis de imágenes mediante el software PD-QUEST permitieron obtener geles bidimensionales con alta resolución y reproducibilidad en la caracterización de proteínas de muestras de plasma de pacientes con SCA sin supradesnivel.

El análisis por LC MS/MS permitió la identificación de las proteínas que presentaron niveles alterados en los pacientes con SCA. Lo cual la convierte en una estrategia útil en la identificación de proteínas plasmáticas separadas por electroforesis 2D-PAGE.

El estudio comparativo de los proteomas de pacientes con NSTEMI, AI y controles sanos permitió identificar proteínas que presentaron diferencias en sus niveles de expresión, y que han sido relacionadas con enfermedades cardiovasculares. Adicionalmente, fue identificada una proteína que no ha sido caracterizada, y que podría ser objeto de estudios posteriores que permitan establecer el papel que desempeña en los SCA sin supradesnivel.

Los niveles alterados de la haptoglobina, la α 1-antiquimiotripsina y la antitrombina, sugieren la importancia de estas proteínas en el desarrollo de los

SCA; y el posible rol que podrían desempeñar al establecer el diagnóstico de estos pacientes.

La concordancia entre la aparente identidad de las proteínas identificadas por bioinformática y los niveles de expresión alterados en cada grupo de pacientes; fortalecen este esfuerzo en la identificación de proteínas, el cual sería útil en aquellos casos en los que la naturaleza de la muestra y las dificultades asociadas a su manipulación, impedirían su identificación por espectrometría de masas.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la importancia de las herramientas proteómicas en el estudio de las proteínas expresadas en el plasma de los pacientes con SCA; permitiendo la identificación de proteínas que podrían ser candidatos a marcadores de la enfermedad y que podrían ser útiles en el diagnóstico de los pacientes con SCA sin supradesnivel.

5. RECOMENDACIONES

Realizar un análisis proteómico dirigido a evaluar los péptidos y proteínas de bajo peso molecular que no pueden ser separados por SDS-2D-PAGE y que pueden contener información valiosa de los sistemas implicados en la patogénesis de los SCA.

Evaluar el uso de técnicas más sensibles para la identificación de proteínas en los geles como 2D-DIGE, que permitan identificar aquellas proteínas de baja concentración que podrían ser solapadas por las proteínas abundantes del plasma.

Generar anticuerpos específicos de las proteínas que presentaron niveles de expresión alterados en nuestro estudio, que permitan realizar estudios que involucren un número significativo de pacientes, donde se evalúe la presencia de estas proteínas y la relevancia de su uso en el diagnóstico y/o pronóstico de los SCA.

Realizar un estudio donde se analice el proteoma de los pacientes con SCA a diferentes tiempos con respecto al inicio de los síntomas del evento cardiaco; con el fin de identificar proteínas alteradas en los diferentes momentos en los que puede llegar un paciente con un posible SCA a un centro asistencial; y de esta manera proponer posibles marcadores de diagnóstico que estén acordes con las diferencias en el proteoma que se pueden presentar en las diferentes etapas del SCA.

6. ESTRATEGIAS DE PUBLICACIÓN

Los resultados preliminares de este trabajo fueron presentados en:

**I Congreso Iberoamericano de Química, Bioquímica e Ingeniería Química.
VII Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química.**

Realizado en La Habana, Cuba del 12 al 16 de octubre de 2009.

Con la participación de los siguientes trabajos:

“un método económico y efectivo para remover proteínas abundantes del plasma compatible con electroforesis bidimensional”

“Análisis proteómico del plasma en pacientes con síndrome coronario agudo”.

Se escribió una publicación titulada: ***“un procedimiento útil en la preparación de muestras de plasma de pacientes con síndrome coronario agudo previa separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional”***.

Actualmente, está siendo sometida a publicación en la Revista Biomédica.

7. BIBLIOGRAFÍA

Ala-Kopsala M, Magga J, Peuhkurinen, K., et al. Molecular Heterogeneity Has a Major Impact on the Measurement of Circulating N-Terminal Fragments of A- and B-Type Natriuretic Peptides. *Clin Chem* 2004; 50: 1-13.

Anderson L. Candidate-based proteomics in the search for biomarkers of cardiovascular disease. *J Physiol* 2005: 23-60.

Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1: 845-67.

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.

Arab S, Gramolini A, Ping P, Kislinger T, et al. Cardiovascular proteomics. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48 (9): 1734-1741.

Awadallah SM, Saleh SA, Abu QM. Association of haptoglobin phenotypes with markers of diabetic nephropathy in Type 2 diabetes mellitus. *J Diab Compl* 2008; 22 (6): 384-388.

Bardaji A. El papel de las troponinas en el diagnóstico y el pronóstico de los síndromes coronarios agudos. *Rev Esp Cardiol* 2005; 5.

Bauriedel G, Hutter R, Welsch U, Bach R, Sievert H, Lüderitz B. Role of smooth muscle cell death in advanced coronary primary lesions: Implications for plaque instability. *Cardiovascular Research* 1999; 41 (2): 480-488.

Beltrán J, Beltrán R, Caicedo V, García M, García E, Gómez E, Hernández E. Guías colombianas de cardiología Síndrome coronario agudo sin elevación del ST. *Rev Colom Cardiol* 2008; 15: suplemento 3.

Berhane B, Zong Ch, Liem D, et al. Cardiovascular-related proteins identified in human plasma by the HUPO plasma proteome Project pilot phase. *Proteomics* 2005; 5: 3520-3530.

Berry C, Hare J. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: Molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Phys* 2004; 555(3): 589-606.

Bik W, Baranowska B. Adiponectin - A predictor of higher mortality in cardiovascular disease or a factor contributing to longer life? *Neuroendocrinology Letters* 2009; 30(2): 180-184.

Bodi V, Sanchis J, Llácer A. Risk stratification in non-ST elevation acute coronary síndromes Predictive power of troponin I, C-reactive protein, fibrinogen and homocysteine. *Int J Cardiol* 2005; 98: 277– 283.

Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-354.

Braeckman L, De Bacquer D, Delanghe J, Claeys L, De Backer G. Associations between haptoglobin polymorphism, lipids, lipoproteins and inflammatory variables. *Atherosclerosis* 1999; 143(2): 383-8.

Braunwald, E. Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med* 2008; 358: 2148-59.

Buja M. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovascular Pathology*. 2005; 14: 170– 175.

Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri G.M, Carnemolla B. et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 2004; 25: 1327-1333

Chen Y, Lin S, Yeh Y, Hsiao H, Wu Y. A modified protein precipitation procedure for efficient removal of albumin from serum. *Electrophoresis* 2005; 26: 2117-2127.

Clerico A, Del Ry S, Giannessi D. Measurement of cardiac natriuretic hormones (atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and related peptides) in general practice: the need for a new generation of immunoassay method. *Clin Chem* 2000; 46: 1529-34.

Collen D, Lijnen R. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 1991; 78(12): 3114-3124.

Collinson P.O, Barnes S.C, Gaze D.C, Galasko G, Lahiri A, Senior R. Analytical performance of the N terminal pro B type natriuretic peptide (NT-proBNP) assay on the Elecsys 1010 and 2010 analysers. *Eur J Heart Fail* 2004; 6(3):365-8.

Crosley L, Duthie S. J, Polley A. C, Bouwman F. G, Heim C, Mulholland, F., et al. Variation in protein levels obtained from human blood cells and biofluids for

platelet, peripheral blood mononuclear cell, plasma, urine and saliva proteomics. *Genes and Nutrition* 2009; 1-8.

Curry S, Mandelkow H, Brick P, Franks N. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nature structural Biology* 1998; 5 (9): 827-835.

Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Liyama M, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001; 107: 1255-62.

Danesh J, Collins R, Peto R. Lipoprotein(a) and coronary heart disease: Meta-analysis of prospective studies. *Circulation* 2000; 102(10): 1082-1085.

Dardé V, Cuesta F, Gil F, Alvarez-Llamas G, Barderas M, Vivanco F. Analysis of the Plasma Proteome Associated with Acute Coronary Syndrome: Does a Permanent Protein Signature Exist in the Plasma of ACS Patients?. *J Proteome Res* 2010; 9: 4420–4432.

Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade. Initiation, maintenance and regulation. *Biochem Am Chem Soc.* 1991; 43: 10363-10370.

De Lemos JA, Morrow DA, Bentley JH, et al. The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2001; 345: 1014–1021.

Delanghe J, Cambier B, Langlois M, De Buyzere M, Neels H, De Bacquer D, Van Cauwelaert P. Haptoglobin polymorphism, a genetic risk factor in coronary artery bypass surgery. *Atherosclerosis* 1997;132:215–9.

Dimayuga P, Zhu J, Oguchi S, et al. Reconstituted HDL containing human Apolipoprotein A-I reduces VCAM-1 expression and neointima formation following periaortitis-induced carotid injury in Apo E null mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 264:465–8.

Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis N. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative responses following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 48: 504–511.

Falk E, Shah P.K, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation*. 1995; 92 (3): 657-671.

Fuster V, Fayad ZA, Moreno PR, Poon M, Corti R, Badimon JJ. Athero-thrombosis and the high-risk plaque. Part II. *J Am Coll Card*. 2005; 46: 1209–1218.

Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and the high-risk plaque. Part I. *J Am Coll Card*. 2005; 46: 937–944.

Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J.J., Chesebro, J.H. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (Second of two parts). *N Engl J Med*. 1992; 326 (5): 310-318.

Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999; 340(6): 448-454.

Gensini G, Dilaghi B. The unstable plaque. *European Heart Journal Supplements*. 2002; 4 (Supplement B): B22–B27.

Georgiou J, Har J; Gregory J, Mark J. Proteomic analysis of human plasma: failure of centrifugal ultrafiltration to remove albumin and other high molecular weight proteins. *Proteomics* 2001; 1503-1506

González R, Cañizares M. Estudio espacial del segmento ST. *BFMC* 2004; 5(3): 23-29.

Göran K. Hansson. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685-95.

Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 2004; 4(12): 3665-85.

Greening D, Simpson R. A centrifugal ultrafiltration strategy for isolating the low-molecular weight (=25 K) component of human plasma proteome. *J Proteom* 2010; 73: 637 – 648.

Greten J, Kreis I, Liliensiek B, Allenberg J, Amiral J, Ziegler R., et al. Localisation of protein Z in vascular lesions of patients with atherosclerosis. *Vasa - J Vas Dis* 1998; 27(3): 144-148.

Gris JC, Quere I, Dechaud H, Mercier E, Pincon C, Hoffet M, Vasse M, Mares P. High frequency of protein Z deficiency in patients with unex-plained early fetal loss. *Blood* 2002; 99: 2606–2608.

Han X, Aslanian A, Yates J. Mass spectrometry for proteomics. *Current opinion in Chemical Biology* 2008; 12 (5): 483-490.

Hansson, G.K. Mechanisms of disease: Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005; 352 (16): 1685-1695.

Hartford M, Wiklund O, Hultén L, Persson A, Karlsson T, Herlitz J, et al. Interleukin-18 as a predictor of future events in patients with acute coronary syndromes. *Arter Thromb Vasc Biol* 2010; 30(10).

Haugen E, Furukawa Y, Isic A et al. Increased adiponectin level in parallel with increased NT-pro BNP in patients with severe heart failure in the elderly: a hospital cohort study. *Int J Cardiol* 2008; 125: 216–219.

Heilskov J, Madsen M, Moestrup S. CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin–hemoglobin complexes from plasma. 2002. *Inter J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 309-314.

Howea J, Keen J, Findlay J, Carter a. The application of proteomics technology to thrombosis research: the identification of potential therapeutic targets in cardiovascular disease. *Prespectives* 2008; 5 (3): 205-212.

Issaq H, Veenstra T. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): Advances and perspectives. *BioTechniques* 2008; 44(5): 697-700.

Faber J, Poller W, Olek K, Baumann U, Carlson J, Lindmark B, Eriksson S. The molecular basis of α_1 - antichymotrypsin deficiency in a heterozygote with liver and lung disease. *Journal of Hepatology* 1993; 18 (3): 313-321.

James SK, Lindahl B, Siegbahn A, et al. N-terminal pro-brain natriuretic peptide and other risk markers for the separate prediction of mortality and subsequent myocardial infarction in patients with unstable coronary artery disease: a Global Utilization of Strategies To open occluded arteries (GUSTO)-IV substudy. *Circulation* 2003; 108: 275–281.

Jernberg T, Stridsberg M, Venge P, et al. N-terminal pro brain natriuretic peptide on admission for early risk stratification of patients with chest pain and no ST-segment elevation. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 437–445.

Jiang L, He L, Fountoulakis M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *J Chrom* 2004; 1023: 317-320.

Johnson BD, Kip KE, Marroquin OC, et al. Serum amyloid A as a predictor of coronary artery disease and cardiovascular outcome in women: the National Heart, Lung, and Blood Institute-Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE). *Circulation* 2004; 109: 726–32.

Kalsheker N. Alpha 1-antichymotrypsin. *J Biochem Cell Biol* 1996;. 28 (9): 961–4.

Kamp P, Strathmann A, Ragg H. Heparin cofactor II, antithrombin-beta and their complexes with thrombin in human tissues. *Thromb Res* 2001; 101: 483-491.

Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 1988; 60: 2299-301.

Kaski J, Fernández D, Consuegra L, Fernández J, García X, Mostaza J. A comparative study of biomarkers for risk prediction in acute coronary syndrome-

Results of the SIESTA (Systemic Inflammation Evaluation in non-ST-elevation Acute coronary syndrome) study. *Atherosclerosis* 2010; 1243-1247.

Kaźmierczak, E., Sobieska, M., Kaźmierczak, M., Mrozikiewicz, A., & Wiktorowicz, K. Intense acute phase response in ischemic patients. *Inter J Cardiol* 1999; 68(1): 69-73.

Kim H, Januzzi J. L. Biomarkers in the management of heart failure. *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine* 2010; 1-13.

Kim M, Kim C. Human blood plasma preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *J Chrom* 2007; 849: 203-210.

Kim X, Bailey K, Klee G, Ellington A, et al. Sex and ethnic differences in 47 candidate proteomic markers of cardiovascular disease: the mayo clinic proteomic markers of arteriosclerosis study.

Kistorp C, Faber J, Galatius S et al. Plasma adiponectin, body mass index, and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2005; 112: 1756–1762.

Kockx MM, Cromheeke KM, Knaapen MWM, Bosmans JM, De Meyer GRY, Herman AG, Bult H. Phagocytosis and macrophage activation associated with hemorrhagic microvessels in human atherosclerosis. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 440–446.

Kostka B, Para J, Drygas W, Kostka T. Antithrombin III activity in the elderly--association with cardiovascular disease risk factors. *Przegląd Lekarski* 2005; 62 Suppl 3:35-8.

Kullolli M, Hancock W, Hincapie M. Automated platform for fractionation of human plasma glycoproteome in clinical proteomics. *Analytical Chemistry* 2010; 82(1): 115-120.

Kumar A, Yu I, Mattiasson B. Precipitation of proteins: nonspecific and specific. 2003. Marcel Dekker. Lund Sweden.

Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.

Langen H, Röder D, Juranville J.-F, Fountoulakis M. Effect of protein application mode and acrylamide concentration on the resolution of protein spots separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1997; 18 (11): 2085-2090.

Laterza O, Cameron S, Chappell D. Evaluation of pregnancy-associated plasma protein A as a prognostic indicator in acute coronary syndrome patients. *Clinica Chimica Acta* 2004; 348: 163–169.

Latini R, Masson S. Valor pronóstico de las troponinas circulantes en la insuficiencia cardíaca. *Rev Esp Cardiol* 2008; 61(7): 667-9

Leidenfrost JE, Khan MF, Boc KP, Villa BR, Collins ET, Parks WC, Abendschein DR, Choi ET. A model of primary atherosclerosis and post-angioplasty restenosis in mice. *Am J Pathol* 2003; 163: 773-778.

Leth-Larsen R, Lund R, Ditzel H. Plasma membrane proteomics and its application in clinical cancer biomarker discovery. *Mol Cell Prot* 2010; 9(7): 1369-1382.

Levy AP, Levy JE, Kalet-Litman S, Miller-Lotan R, Levy NS, Asaf R, et al. Haptoglobin genotype is a determinant of iron, lipid peroxidation, and macrophage accumulation in the atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27 (1): 134-40.

Lichy C, Kropp S, Dong-Si T, Genius J, Dolan T, Hampe T, et al. A common polymorphism of the protein Z gene is associated with protein Z plasma levels and with risk of cerebral ischemia in the young. *Stroke* 2004; 35(1): 40-45.

Loftus I, Thompson M. The role of matrix metalloproteinases in vascular disease IM Loftus and MM Thompson. *Vasc Med* 2002; 7: 117–133.

Lugo J, Bravo V, Torres W. 2002. Utilidad del puntaje de riesgo TIMI (TIMIRISK SCORE) en la valoración de pacientes que presentaron cuadro de angina inestable sin elevación del segmento ST. Unidad de Cuidados Coronarios, Hospital “Manuel Núñez”. Venezuela. [Web en línea]. Disponible en: [www.svcardiologia.org /PDF/AC % 2022%20\(Supl\)](http://www.svcardiologia.org/PDF/AC%2022%20(Supl)). Con acceso el 5 de marzo de 2009.

Lutgens SPM, Cleutjens KBJM, Daemen MJAP, Heeneman S. Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease. *FASEB Journal* 2007; 21(12): 3029-41.

Mateos, P., García, A., López, A. Proteomic Analysis of Plasma From Patients During an Acute Coronary Syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 1578-1583.

McEntegart MB, Awede B, Petrie MC et al. Increase in serum adiponectin concentration in patients with heart failure and cachexia: relationship with leptin, other cytokines, and B-type natriuretic peptide. *Eur Heart J* 2007; 28: 829–835

Melamed-Frank M, Lache O, Enav BI, Szafranek T, Levy NS, Ricklis RM, et al. Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. *Blood*. 2001; 98(13): 3693-8.

Miyata M, Biro S, Kaieda H, Eto H, Orihara K, Kihara T, et al. Apolipoprotein J/clusterin is induced in vascular smooth muscle cells after vascular injury. *Circulation* 2001; 104(12): 1407-1412.

Moreno, P.R., Falk, E., Palacios, I.F., Newell, J.B., Fuster, V., Fallon, J.T. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes: Implications for plaque rupture. *Circulation*. 1994; 90 (2): 775-778.

Morrow DA, de Lemos JA, Sabatine MS, et al. Evaluation of B-type natriuretic peptide for risk assessment in unstable angina/non-ST elevation MI: BNP and prognosis in TACTICS-TIMI 18. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1264–1272.

Murohara T, Guo J-, Lefer AM. Cardioprotection by a novel recombinant serine protease inhibitor in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995; 274(3): 1246-53.

Navarro J, Guzmán L, Gabay J. La proteína C reactiva no predice hallazgos coronarios de alto riesgo en los síndromes coronarios agudos sin elevación del ST. *Rev Arg Cardiol* 2004; 72: mayo-junio.

Niño, R. Expresión diferencial de proteínas de *trypanosoma cruzi* obtenido de paciente con cardiomiopatía chagásica e individuo asintomático. Tesis de maestría en Ciencias Básicas, especialidad Bioquímica. Universidad Industrial de Santander. 2009.

Olson ST, Richard B, Izaguirre G, Schedin-Weiss S, Gettins PGW. Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases. A paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitors. *Biochimie*. 2010; 92(11): 1587-96.

Omland T, De Lemos JA, Morrow DA, et al. Prognostic value of N-terminal pro-atrial and pro-brain natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes. *Am J Cardiol* 2002; 89: 463–465.

Ping P, Vondriska T, Creighton C, Gandhi T, Yang Z, Menon R. A functional annotation of subproteomes in human plasma. *Proteomics* 2005; 5: 3506-3519.

Pusch W, Flocco M, Leung S, Thiele H, Kostrzewa, M. Mass spectrometry-based clinical proteomics. *Pharmacogenomics* 2003; 4(4): 463-476.

Raczyński L, Rubel T, Zaremba K. Proteins and peptides identification from MS/MS data in proteomics. *Biocybernetics and Biomedical Engineering* 2010; 30(3): 35-47.

Ramachandran S. Biomarkers of Cardiovascular Disease: Molecular Basis and Practical Considerations. *Circulation* 2006; 113: 2335-2362.

Rebecca M. Thomas RM, Schiano TD, Kueppers F, Black M. Alpha – antichymotrypsin globules within hepatocytes in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *Human Pathology* 2000; 31 (5): 575-577.

Rebhi L, Omezzine A. Belhadjmbarek I, Rejeb J, Bouchhima M, Amri W., et al. B-type natriuretic peptide is a prognostic marker after myocardial infarction: Two-years survival study of 86 patients. *Immuno-Analyse Et Biologie Specialisee*. 2010.

Redfield MM, Rodeheffer RJ, Jacobsen SJ., et al. Plasma brain natriuretic peptide concentration: impact of age and gender. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 976-82.

Ridker P. M, Vaughan D. E, Stampfer M. J, Manson J. E, Hennekens C. H. Endogenous tissue-type plasminogen activator and risk of myocardial infarction. *Lancet* 1993; 341(8854): 1165-1168.

Ritchie A, Morgan K, Kalsheker N. Allele-specific overexpression in astrocytes of an Alzheimer's disease associated alpha-1- antichymotrypsin promoter polymorphism. *Molecular Brain Research* 2004; 131 (1-2): 88-92.

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].

Sanchís J, Bodí V, Llácer A. Relationship of C-Reactive Protein Levels With Angiographic Findings and Markers of Necrosis in Non-ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndrome. *Rev. Esp. Cardiol* 2004; 57(5): 382-7.

Sharony R, Yu P-, Park J, Galloway AC, Mignatti P, Pintucci G. Protein targets of inflammatory serine proteases and cardiovascular disease. *J Inflamm* 2010; 7.

Sharp D, Burchfiel M, Rodriguez L, Sharrett A, Sorlie P, Marcovina S. M. Apolipoprotein A-1 predicts coronary heart disease only at low concentrations of high-density lipoprotein cholesterol: An epidemiological study of japanese-americans. *Inter J Clin Lab Res* 2000; 30(1): 39-48.

Shibata R, Ouchi N, Murohara T. Adiponectin and cardiovascular disease. *J Circulation* 2009; 73(4): 608-614.

Shinmura K. Is adiponectin a bystander or a mediator in heart failure? the tangled thread of a good-natured adipokine in aging and cardiovascular disease. *Heart Failure Reviews* 2010; 15(5): 457-466

Soler, J. 2007. Marcadores sericos bioquimicos cardiacos. Creatinfosfoquinasa serica total (CPK, creatinquinasa (CK) total). Lactodeshidrogenasa (LDH). Glutamico oxalacetico transaminasa (GOT, AST). [Web en línea]. Disponible en internet en <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/715/1/Marcadores-sericos-bioquimicos-cardiacos-Creatinfosfoquinasa-serica-total-CPK-creatinquinasa-CK-total-Lactodeshidrogenasa-LDH-Glutamico-oxalacetico-transaminasa-GOT-AST.html>. [Con acceso el 23 de febrero de 2009.

Stempfer R, Kubicek M, Lang I, Christa N, Christopher g. Quantitative assessment of human serum high abundance protein depletion. *Electrophoresis* 2008; 29: 4316-4323.

Swertfeger DK, Witte DP, Stuart DS, et al. Apolipoprotein J/clusterin induction in myocarditis: a localized response gene to myocardial injury. *Am J Pathol.* 1996; 148: 1971–1983.

Takamori N, Azuma H, Kato M, Hashizume S, Aihara K, Akaike M, Tamura K, Matsumoto T. High plasma heparin cofactor II activity is associated with reduced incidence of in-stent restenosis after percutaneous coronary intervention. *Circulation* 2004; 109: 481-486.

Tamura T, Furukawa Y, Taniguchi R et al. Serum adipo-nectin level as an independent predictor of mortality in patients with congestive heart failure. *Circ J* 2007; 71: 623–630.

Tanaka T, Tsutamoto T, Nishiyama K et al. Impact of oxidative stress on plasma adiponectin in patients with chronic heart failure. *Circ J* 2008; 72: 563–568.

Tateyama H, Hino J, Minamino N, et al. Concentrations and molecular forms of human brain natriuretic peptide in plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 185: 760-7.

Throughton R, Frampton C, Yandle T, Espiner E, Nicholls G. Treatment of heart failure by plasma aminoterminal brain natriuretic peptide (N-BNP) concentrations. *Lancet* 2000; 355: 1126-30.

Tu C, Rudnick P. A, Martinez M. Y, Cheek K, Stein S, Slebos R. J. C., et al. Depletion of abundant plasma proteins and limitations of plasma proteomics. *J Prot Res* 2010; 9(10): 4982-4991.

Vilariño J, Esper R, Badimón J. Fisiopatología de los síndromes coronaries agudos. Tres paradigmas para un nuevo dogma. *Rev Esp Cardiol* 2004; 4(Supl G): 13-24.

Vivanco F, Martín-Ventura J, Durán M.C, Barderas M.G, Blanco-Colio L, Dardé V.M. Quest of novel cardiovascular biomarkers by proteomic analysis. *J Prot Res* 2005; 4 (4).

Wannamethee S.G, Welsh P, Whincup P.H, Sawar N, Thomas M.C, Gudnarsson V., et al. High adiponectin and increased risk of cardiovascular disease and mortality in asymptomatic older men: Does NT-proBNP help to explain this

association?. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation* 2010; 203-212.

Watanabe J, Grijalva V, Hama S, Barbour K, Berger FG, Navab M, et al. Hemoglobin and its scavenger protein haptoglobin associate with ApoA-1-containing particles and influence the inflammatory properties and function of high density lipoprotein. *J Biol Chem* 2009; 284(27): 18292-301.

Weiss N, Keller C, Hoffmann U, Loscalzo J. Endothelial dysfunction and atherothrombosis in mild hyperhomocysteinemia. *Vasc Med* 2002; 7: 227-39.

Wenrui L, Nakamura H, Shioji K, Tanito M, et al. Thioredoxin-1 ameliorates myosin induced autoimmune myocarditis by suppressing chemokine expressions and leukocyte chemotaxis in mice. *Circulation* 2004; 110: 1276-1283.

Weseler A, Bast A. Oxidative stress and vascular function: Implications for pharmacologic treatments. *Cur Hypert Rep* 2010; 12(3): 154-161.

Wetterö J, Nilsson L, Jonasson L. Reduced serum levels of autoantibodies against monomeric C-reactive protein (CRP) in patients with acute coronary syndrome. *Clinica Chimica Acta* 2009; 400: 128–131.

Wu T, I Chen Tsai, Chang P, Tsao K, Sun C, Wu L. L., et al. Establishment of an in-house ELISA and the reference range for serum amyloid A (SAA). complementarity between SAA and C-reactive protein as markers of inflammation. *Clinica Chimica Acta* 2007; 376(1-2): 72-76.

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

weighth BNP as a major plasma component in heart failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 832-8.

Zarco, P. Bases moleculares de la Cardiología clínica. Editorial médica Panamericana S:A. 1996. Madrid. 128p.

Zolla L. Proteomics studies reveal important information on small molecule therapeutics: A case study on plasma proteins. *Drug Discovery Today* 2008; 13(23-24):1042-1051.

ANEXOS 1

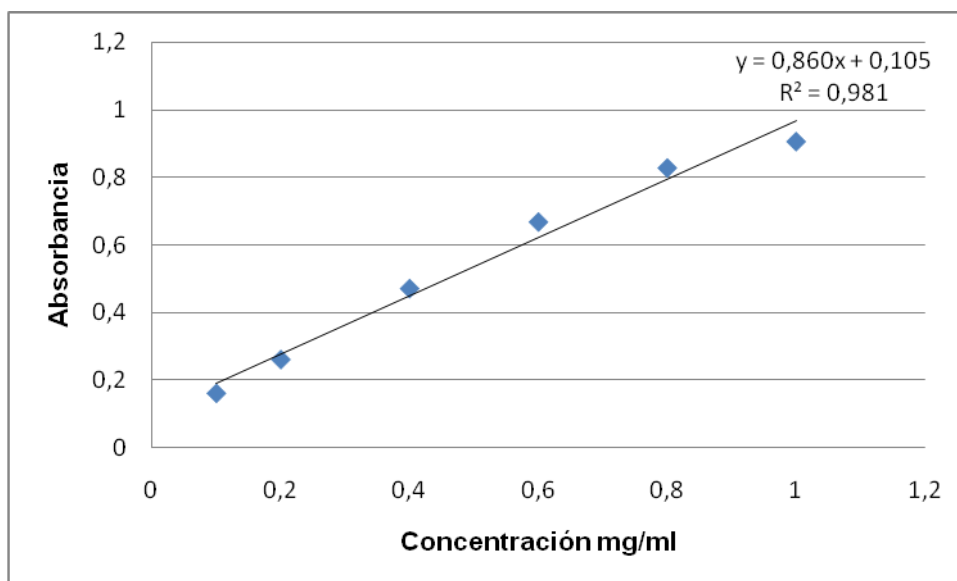
**CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE LA
CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS UTILIZANDO EL MÉTODO DE
BRADFORD.**

Figura A.1.1 curva de calibración de la concentración de proteínas, usando el método de Bradford y patrones de albumina.

ANEXO 2

MATRIZ DE ESTRUCTURA DEL ANÁLISIS DISCRIMINANTE

Proteína	Función 1	Función 2	Proteína	Función 1	Función 2
2001	- 0,033681421	-0,02127778	1406	- 0,008839853	0,08002594
3002	- 0,029272718	0,015844535	2104	- 0,010166954	0,078606248
3001	- 0,019259227	0,016822202	1302	-0,00397004	0,077125101
2202	- 0,004297238	0,003894166	2105	- 0,072816296	-0,07487805
1103	- 0,058816262	0,270654836	3102	- 0,012466072	-0,07443461
2201	0,003289338	0,207861584	1105	- 0,016201859	0,074270536
1404	0,003404865	0,197919943	2102	- 0,024647695	0,072508102
1403	0,008116658	0,17951716	3101	- 0,024433951	0,067113423
1001	- 0,038361353	0,120968272	2303	- 0,006394194	0,054254388
2702	0,019151717	0,103088832	2108	- 0,006543925	0,037682576
2302	0,007872524	0,093925492	3003	- 0,016859121	-0,02976831
2002	- 0,002121391	0,092480273	2305	- 0,022316961	-0,02711343

2304	- 0,007637863	0,08320243	2109	0,006689447	0,01647373
-------------	------------------	------------	------	-------------	------------

Tabla A.2.1. Matriz de estructura del análisis discriminante. Las proteínas están identificadas mediante códigos asignados previamente por el programa PD-QUEST. Los datos que aparecen en las columnas corresponden a los coeficientes de correlación que presenta cada proteína con respecto a las funciones establecidas.

ANEXO 3

Análisis por LC-MS/MS de la proteína marcada como 2105, y búsqueda en bases de datos utilizando el motor de búsqueda Phenyx (tabla de excel con los resultados obtenidos)

Q6GMV8	14,10	3	3	234	24,9	6,67	8,39	Putative uncharacterized protein OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [Q6GMV8_HUMAN]							
Confidence	Score	Sequence	tein Access#	Protein#	Protein Group	Activation Type	Modification	Probability	XCorr	Δ Score	Rank	Charge	m/z [Da]	MH+ [Da]	ΔM [ppm]
High		AGVETITPSK	Q6GMV8	5	1	CID		12,34	3,07	0,35	1	2	495,78296	990,55864	48,84
High		SYSQVTHEGST	Q6GMV8	5	1	CID	C4(Carban	35,60	3,00	0,39	1	2	856,35999	1711,71270	-27,18
High		LTVLSQPK	Q6GMV8	5	1	CID		1,15	2,33	0,24	1	2	443,36000	885,71272	194,52

Análisis por LC-MS/MS de la proteína marcada como 2202, y búsqueda en bases de datos utilizando el motor de búsqueda Phenyx (tabla de excel con los resultados obtenidos)

B3KP77	9,21	2	2	228	25,5	6,71	5,67	cDNA FLJ31310 fs, clone LIVER1000165, highly similar to Haptoglobin OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B3KP77_HUMAN]								
Confidence	Score	Sequence	tein Access#	Protein#	Protein Group	Activation Type	Modification	Probability	XCorr	Δ Score	Rank	Charge	m/z [Da]	MH+ [Da]	ΔM [ppm]	RT [min]
High		ScVAEYGVVYK	B3KP77	5	1	CID	C2(Carban	30,73	3,22	0,43	1	2	673,75999	1346,51271	643,89	40,39
High		VGIVSGWGR	B3KP77	5	1	CID		9,57	2,45	0,39	1	2	490,16000	979,31272	-1207,13	37,66

Análisis por LC-MS/MS de la proteína marcada como 6403, y búsqueda en bases de datos utilizando el motor de búsqueda Phenyx (tabla de excel con los resultados obtenidos)

Accession	Coverage	# PSMs	# Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score	Description						
P01008	4,74	3	2	464	52,6	6,71	9,62	Antithrombin-III OS=Homo sapiens GN=SERPINC1 PE=1 SV=1 - [ANT3_HUMAN]						
Confidence	Score	Sequence	tein Access#	Protein#	Protein Group	Activation Type	Modification	Probability	XCorr	Δ Score	Rank	Charge	m/z [Da]	MH+ [Da]
High		FATTFYQHLADS	P01008	1	1	CID		36,47	3,16	0,20	1	2	765,01971	1529,03215
High		LPGIVAEGR	P01008	1	1	CID		19,25	2,28	0,38	1	2	456,40000	911,79272
Medium		FATTFYQHLADS	P01008	1	1	CID		27,09	2,20	0,21	1	3	510,36000	1529,06544

Análisis por LC-MS/MS de la proteína marcada como 8402, y búsqueda en bases de datos utilizando el motor de búsqueda Phenyx (tabla de excel con los resultados obtenidos)

P01011	5,20	2	2	423	47,6	5,52	7,84	Alpha-1-antichymotrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA3 PE=1 SV=2 - [AACT_HUMAN]							
Confidence	Score	Sequence	tein Accessi	Protein	Protein Group	activation Typ	Modification	Probability	XCorr	Δ Score	Rank	Charge	m/z [Da]	MH+ [Da]	ΔM [ppm]
High		DEELSGTGWELK	P01011	2	1	CID	C6(Carban	5,29	3,06	0,13	1	2	711,79999	1422,59271	639,54
High		ADLSGITGAR	P01011	2	1	CID		39,20	2,81	0,36	1	2	480,98825	960,96923	476,90

Análisis por LC-MS/MS de la proteína marcada como 8501, y búsqueda en bases de datos utilizando el motor de búsqueda Phenyx (tabla de excel con los resultados obtenidos)

P01011	15,37	10	5	423	47,6	5,52	34,82	Alpha-1-antichymotrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA3 PE=1 SV=2 - [AACT_HUMAN]							
Confidence	Score	Sequence	tein Accessi	Protein	Protein Group	activation Typ	Modification	Probability	XCorr	Δ Score	Rank	Charge	m/z [Da]	MH+ [Da]	ΔM [ppm]
High		AVLDVFEEGTEA	P01011	2	1	CID		60,32	4,60	0,62	1	2	954,51999	1908,03270	
High		ADLSGITGAR	P01011	2	1	CID		23,44	3,60	0,41	1	2	480,93799	960,86870	
High		LYGSEAFATDFQ	P01011	2	1	CID		63,02	3,19	0,56	1	2	946,66492	1892,32257	
High		ADLSGITGAR	P01011	2	1	CID		39,92	2,94	0,29	1	2	480,21311	959,41894	
High		NLAVSQVVK	P01011	2	1	CID		19,69	2,81	0,24	1	2	547,82613	1094,64498	
High		ADLSGITGAR	P01011	2	1	CID		10,41	2,70	0,40	1	2	480,88083	960,75438	
High		NLAVSQVVK	P01011	2	1	CID		1,00	2,55	0,28	1	2	547,26311	1093,51895	
High		NLAVSQVVK	P01011	2	1	CID		1,00	2,48	0,15	1	2	548,30891	1095,61055	
High		ADLSGITGAR	P01011	2	1	CID		1,00	2,43	0,26	1	2	480,79692	960,58657	
High		KLINDYVK	P01011	2	1	CID		1,13	2,30	0,14	1	2	497,29968	993,59208	

ANEXO 4

**Lista de proteínas plasmáticas relacionadas con enfermedades
cardiovasculares**

PROTEÍNA	CÓDIGO PDB	PM	pl
Activin A	P08476	7,07	12975,84
Adiponectin	Q15848	5,46	24544,3
Albúmina	P02768	5,67	66472,21
Aldolase C	P09972	6,46	39324,67
Alpha 2 antiplasmin (alpha 2 AP)	P08697	5,87	50450,85
Alpha 2 macroglobulin (alpha 2M)	P01023	5,98	160809,88
Alpha 2 macroglobulin (alpha 2M)	P01011	5,32	45265,82
Alpha (1)- anti- chymotrypsin (ACT)	P01011	5,26	45031,57
Alpha 1 acid- glycoprotein (AAG)	P02763	5	21560,12
Alpha 1-antitrypsin (AAT)	P01009	5,37	44324,55
Alpha 1-antitrypsin (AA)	P01009	9,4	5068,14
Angiotensin- converting enzyme (ACE)	P12821	5,89	146829,26

Angiotensin-converting enzyme (ACE)	P12821	5,76	138664,93
angiotensinogen	P01019	5,6	49761,11
angiotensinogen	P01019	6,92	1296,49
Angiotensinogen	P01019	6,74	1046,19
Angiotensinogen	P01019	8,75	931,11
Antithrombin III (AT III)	P01008	5,95	49039,14
Apolipoprotein A-I	P02647	5,27	28078,62
Apolipoprotein A-I	P02647	5,27	27950,49
Apolipoprotein A-II	P02652	5,05	8707,91
Apolipoprotein A-II	P02652	5,05	8579,78
Apolipoprotein A-IV	P06727	5,18	43402,53
Apolipoprotein B	P04114	6,57	512858,25
Apolipoprotein B	P04114	7,99	240835,61
Apolipoprotein C-I	P02654	7,93	6630,58
Apolipoprotein C-I	P02654	8,24	6432,35
Apolipoprotein C-II	P02655	4,66	8914,92
Apolipoprotein C-III	P02656	4,72	8764,67
Apolipoprotein D	P05090	5,2	19303,08
Apolipoprotein E	P02649	5,52	34236,68
Apolipoprotein L1	O14791	5,49	41128,68
aspartate aminotransferase, mitochondrial (m-type)	P00505	8,98	44737,36
Basic fibroblast growth factor (bFGF)	P09038	9,59	16407,81
Beta (2)-glycoprotein I, nicked	P02749	8,37	36254,6
B-type neurotrophic growth factor (BNGF)	P01138	9	13494,38
Cathepsin B	P07858	5,23	27814,98

Cathepsin B	P07858	4,95	5208,85
Cathepsin B	P07858	5,19	22415,93
CD 105	P17813	6,15	68095,09
CD40 ligand, soluble	P29965	8,53	29273,53
CD40 ligand, soluble	P29965	9,27	16184,37
Ceruloplasmin	P00450	5,41	120085,49
Chitotriosidase	Q13231	6,29	49376,48
Cholesteryl ester transfer protein	P11597	5,64	53094,19
Chromogranin A	P10645	4,57	48918,26
Chromogranin A	P10645	4,81	12702,32
Chromogranin A	P10645	5,59	8555,86
Chromogranin A	P10645	4,12	9730,18
Chromogranin A	P10645	3,5	3633,7
Chromogranin A	P10645	4,2	5080,4
Chromogranin A	P10645	3,99	2180,22
Chromogranin A	P10645	4,94	1649,88
Chromogranin A	P10645	5,84	978,13
Chromogranin A	P10645	4	2243,34
Chromogranin A	P10645	8,79	1162,31
Chromogranin A	P10645	4,68	2097,32
Chromogranin A	P10645	4,72	5064,51
Chromogranin A	P10645	4,6	4232,59
Clusterin	P10909	5,89	50062,56
Clusterin	P10909	6,27	24197,38
Clusterin	P10909	5,66	25883,19
Coagulation factor IX	P00740	5,2	46578,23
Coagulation factor IX	P00740	4,65	16488,24
Coagulation factor IX	P00740	7,22	26156,83
Coagulation factor V	P12259	5,68	248686,9
Coagulation factor V	P12259	5,78	81173,52
Coagulation factor V	P12259	8,47	75187,14
Coagulation factor VII	P08709	5,03	17025,93

Coagulation factor VII	P08709	7,73	28071,27
Coagulation factor VII-activiting protease	Q14520	5,2	32904,47
Coagulation factor VII-activiting protease	Q14520	5,2	32557,06
Coagulation factor VII-activiting protease	Q14520	7,67	27325,18
Coagulation factor VII-activiting protease	Q14520	7,12	26659,39
Coagulation factor VIII	P00451	6,97	264725,58
Coagulation factor VIII	P00451	6,3	148451,51
Coagulation factor VIII	P00451	5,74	84675,04
Coagulation factor VIII	P00451	8,73	63794,48
Coagulation factor VIII	P00451	7,46	78989,79
Coagulation factor X	P00742	5,38	50336,41
Coagulation factor X	P00742	4,59	15725,35
Coagulation factor X	P00742	6,12	34188,53
Coagulation factor X	P00742	8,51	28509,54
Coagulation factor XI	P03951	8,47	41207,07
Coagulation factor XI	P03951	8,33	26836,55
Coagulation factor XII	P00748	9	39673,15
Coagulation factor XII	P00748	8,25	931,03
Coagulation factor XII	P00748	5,06	26104,45
Coagulation factor XII	P00748	5,06	26104,45
Coagulation factor XIII	P00488	5,81	79244,88
Complement C1 inactivator	P05155	5,97	52843,36
Complement C3	P01024	6	184951,34

Complement C3	P01024	6,82	71316,61
Complement C3	P01024	5,55	113028
Complement C3	P01024	9,69	9094,65
Complement C3	P01024	5,18	103951,36
Complement C3	P01024	6,89	23590,25
Complement C3	P01024	5	38905,4
Complement C3	P01024	3,98	5136,63
Complement C3	P01024	5,89	33786,78
Complement C3	P01024	10,83	2021,31
Complement C3	P01024	4,79	39488,45
C-reactive protein (CRP)	P02741	5,28	23047,14
C-reactive protein (CRP)	P02741	5,28	22950,02
Endotelial cell protein C receptor (EPCR)	Q9UNN8	6,69	24797,07
Endotelial leucocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1)	P16581	5,19	64467,46
Endothelin-1, Big	P05305	5,31	4286,94
Endothelin-1, Big	P05305	4,54	2495,94
Enolase, beta, skeletal muscle	P13929	7,73	46800,61
Enolase, gamma, neurone-specific	P09104	4,91	47137,39
Erythropoietin	P01588	8,75	18396,14
E-selectin, soluble	P16581	5,19	64467,46
	P02776	8,8	7769,18
	P02776	10,03	6033,28
	Q13093	6,99	47792,5
Fas, soluble	P25445		
Platelet derived growth factor (PDGF)	P04085	9,57	14305,59

Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A)	Q13219	5,44	172290,43
Prorenin	P00797	5,28	37236,17
Protein C	P04070	5,6	47332,75
Protein C	P04070	5,33	17583,91
Protein C	P04070	5,57	29482,49
Protein C	P04070	3,66	1446,4
Protein C inhibitor (PCI)	P05154	9,35	43660,12
Protein C, activated (APC)	P04070	5,6	47332,75
Protein C, activated (APC)	P04070	5,33	17583,91
Protein C, activated (APC)	P04070	5,57	29482,49
Protein C, activated (APC)	P04070	3,66	1446,4
Protein S	P07225	5,17	70645,14
Protein Z	P22891	5,34	40364,56
Prothrombin	P00734	5,24	65308,2
Prothrombin	P00734	5,01	17376,2
Prothrombin	P00734	4,25	14157,32
Prothrombin	P00734	4,65	4090,53
Prothrombin	P00734	8,88	29738,19
P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)	Q14242	4,3	38608
P-selectin, soluble (GMP-140)	P16109	6,1	86233,45
Resistin	Q9HD89	5,72	9553,89
S-100beta	P04271	4,57	10581,84
Serum amyloid A protein (SAA)	P02735	5,89	11682,7

Serum amyloid A protein (SAA)	P02735	5,57	8575,31
Serum amyloid A protein (SAA)	P02735	5,53	11526,51
Serum amyloid A protein (SAA)	P02735	5,53	11363,34
Serum amyloid A protein (SAA)	P02735	5,31	11235,16
Serum amyloid A protein (SAA)	P02735	5,54	11439,43
Serum amyloid A protein (SAA)	P02735	5,52	10871,79
Serum placenta growth factor	P49763	8,38	22786,08
Sex hormone-binding globulin (SHBG)	P04271	4,57	10581,84
Smooth muscle myosin heavy chain	P35749	5,42	227339,24
Tau protein	P10636	6,26	78746,36
Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)	Q96IY4	8,11	35788,48
Thrombomodulin, soluble (sTM)	P07204	4,78	58635,23
Thrombospondin-1	P07996	4,7	127495,32
Tissue factor (TF)	P13726	6,01	29593,43
Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)	P10646	8,47	31950,3
Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1)	P01033	8,47	20708,83
Tissue inhibitor of metalloproteinases-1	P16035	6,48	21755

(TIMP-1)			
Tissue plasminogen inhibitor (t-PA)	P00750	7,61	59042,38
Tissue plasminogen inhibitor (t-PA)	P00750	8,45	30938,54
Tissue plasminogen inhibitor (t-PA)	P00750	6,06	28121,85
Transforming growth factor-beta	P01137	8,44	28490,45
Transforming growth factor-beta	P01137	8,59	12794,81
Tropomyosin 1 alpha chain	P09493	4,69	32708,57
Troponin I, cardiac	P19429	9,87	23876,35
Troponin T, cardiac	P45379	4,94	35792,31
Tumor necrosis factor receptor I	P19438	6,59	48307,12
Tumor necrosis factor receptor I	P19438	7,74	27904,88
Tumor necrosis factor receptor II	P20333	5,95	46090,7
Tumor necrosis factor receptor II	P20333	5,95	45681,22
Tumor necrosis factor-alpha	P01375	6,44	25644,42
Tumor necrosis factor-alpha	P01375	7	17352,72
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	P15692	9,16	23894,62
Vitronectin	P04004	5,47	52277,96
Vitronectin	P04004	5,54	43029,61
Vitronectin	P04004	4,51	5011,54
Vitronectin	P04004	5,08	9266,37
Von Willebrand factor	P04275	5,06	81349,7

Fas soluble	P25445	8,02	35079,97
Fatty acid-binding protein, heart-type	P05413	6,34	14726,84
Ferritin	P02792	5,51	19888,48
Fibrinogen	P02671	3,92	1536,57
Fibrinogen	P02671	5,79	91358,87
Fibrinopeptide B	P02675	4,14	1569,61
Fibrinopeptide B	P02675	7,95	50762,93
Fibronectin	P02751	5,4	259562,86
Fibronectin	P02751	9,9	8752,94
Fibronectin	P02751	3,89	20462,29
Fibronectin	P02751	3,84	19622,39
Fibronectin	P02751	5,05	181874,61
Follistatin	P19883	5,31	34754,26
Gamma-glutamyltransferase (GGT)	P19440	7,65	41430,72
Gamma-glutamyltransferase (GGT)	P19440	5,9	19997,52
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	P14136	5,42	49880,21
Glycogen phosphorylase BB, cardiac	P11216	6,41	96564,76
GMP-140 (soluble P-selectin)	P16109	6,1	86233,45
Gp 130, soluble	P40189	5,67	101040,64
GP1Ib/IIIa, soluble	P08514	5,2	110006,69
GP1Ib/IIIa, soluble	P08514	5,27	92662,47
GP1Ib/IIIa, soluble	P08514	4,76	16934,77
GP1Ib/IIIa, soluble	P08514	4,81	15512,16
Growth hormone (GH)	P01241	5,27	22129,05

	P00738	6,13	43349,01
	P00738	5,57	15945,77
	P00738	6,32	27265,07
Haemopexin	P02790	6,43	49295,43
Heparin cofactor II (HCII)	P05546	6,26	54060,02
Hepatocyte growth factor /HGF)	P14210	7,69	53684,21
Hepatocyte growth factor /HGF)	P14210	8,76	25995,14
Hexosaminidase A	P06865	4,83	50565,43
Hydroxybutyrate dehydrogenase (HBDH)	Q02338	8,16	33075,14
Insulin	P01308	6,9	3429,96
Insulin	P01308	3,79	2383,71
Insulin-like growth factor binding protein-1	P08833	5,09	25270,44
Insulin-like growth factor 1	P01343	7,76	7654,74
Interceular adhesión molecule1	P05362	8,15	55215,07
Interleukin-1 beta (IL-1 beta)	P01584	5,91	17376,87
Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra)	P18510	5,46	17126,43
Interleukin-1 receptor family member,ST2	Q01638	8,64	61360,41
Interleukin-10 (IL-10)	P22301	7,63	18647,43
Interleukin-18 (IL-18)	Q14116	5,04	18216,72
Interleukin-2 (IL-2)	P60568	7,05	15418,01
Interleukin-6 (IL-6)	P05231	6,21	20812,77
Interleukin-6 receptor	P08887	8,61	49868,41

(sIL-6R)			
Interleukin-8 (IL-8)	P10145	9,03	9108,62
Interleukin-8 (IL-8)	P10145	9,24	8922,45
Interleukin-8 (IL-8)	P10145	9,24	8541,96
Interleukin-8 (IL-8)	P10145	9,02	8385,77
Interleukin-8 (IL-8)	P10145	9,03	8298,7
Interleukin-8 (IL-8)	P10145	9,03	8227,62
Interleukin-8 (IL-8)	P10145	8,8	8099,44
Leptin	P41159	5,71	16026,45
Leptin receptor	P48357	6,07	129954,63
Lipoprotein lipase (LPL)	P06858	8,23	50394,19
Lipoprotein receptor-related protein 1	Q07954	5,16	502633,78
Lipoprotein receptor-related protein 1	Q07954	5,04	436867,08
Lipoprotein receptor-related protein 1	Q07954	6,81	65784,71
Lipoprotein receptor-related protein 1	Q07954	5,04	11488,74
Lipoprotein-associated phospholipase A2	P04054	7,95	14138,99
Macrophage colony-stimulating factor (MCSF)	P09603	5,07	56926,52
Macrophage colony-stimulating factor (MCSF)	P09603	5,07	56926,52
Matrix	P03956	6,17	42634,71
Matrix	P03956	4,85	18992,77
Matrix	P03956	9,25	23659,96
Matrix	P08253	5,02	62059,41

matalloproteinase-2 (MMP-2)			
Matrix matalloproteinase-2 (MMP-2)	P08253	5,96	24389,88
Matrix matalloproteinase-2 (MMP-2)	P08254	5,34	42837,21
Matrix matalloproteinase-9 (MMP-9)	P14780	10,26	1457,73
Matrix matalloproteinase-9 (MMP-9)	P14780	5,44	66609,35
Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)	P13500	9,39	8685,03
Myelin basic protein (MBP)	P02686	9,79	33117,1
Myeloperoxidase (MPO)	P05164	9,31	78938,62
Myeloperoxidase (MPO)	P05164	9,11	67074,87
Myeloperoxidase (MPO)	P05164	9,22	66106,87
Myeloperoxidase (MPO)	P05164	5,77	12881,51
Myeloperoxidase (MPO)	P05164	9,43	53243,37
Myoglobin, cardiac	P02144	7,29	17052,61
Myosin heavy chain, cardiac	P13533	5,6	223733,72
Myosin light chain I, cardiac	P08590	5,03	21800,87

Myosin light chain II, cardiac	P10916	4,92	18658,1
Natriuretic peptide, atrial (ANP)	P01160	4,26	3507,95
Natriuretic peptide, atrial (ANP)	P01160	10,66	3082,48
Natriuretic peptide brain (BNP)	P16860	10,12	11905,55
Natriuretic peptide brain (NT-proBNP)	P16860	10,95	3466,08
Natriuretic peptide brain (NT-proBNP)	P16860	10,32	3172,75
Natriuretic peptide brain (NT-proBNP)	P16860	9,85	3016,56
Natriuretic peptide brain (NT-proBNP)	P16860	9,85	2903,4
Natriuretic peptide brain (NT-proBNP)	P16860	10,95	3241,86
Natriuretic peptide brain (NT-proBNP)	P16860	10,95	3281,88
Natriuretic peptide brain (NT-proBNP)	P16860	10,32	2988,55
Natriuretic peptide brain (NT-proBNP)	P16860	9,85	2832,37
Natriuretic peptide brain (NT-proBNP)	P16860	10,86	3153,71
Natriuretic peptide brain (NT-proBNP)	P16860	10,86	3016,57
Natriuretic peptide brain (NT-proBNP)	P16860	10,1	2860,38
Natriuretic peptide brain (NT-proBNP)	P16860	9,5	2704,19
Natriuretic peptide brain (NT-proBNP)	P16860	9,5	2491,9

Natriuretic peptide brain (NT-proBNP)	P16860	10,86	3022,51
Natriuretic peptide brain (NT-proBNP)	P16860	10,86	2885,37
Natriuretic peptide brain (NT-proBNP)	P16860	9,5	2573
Neurone-specific enolase (NSE)	P09104	4,91	47137,39
Neutral endopeptidase (NEP)	P08473	5,54	85382,74
Neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL)	P80188	9,02	20547,53
Neutrophil protease-4 (NP4)	P24158	7,79	24246,81
Osteoprotegerin	O00300	8,71	43617,1
Paraoxonase	P27169	5,08	39600,12
Phosphoglycerate mutase (P	P18669	6,75	28672,74
Plasminogen	P00747	7,08	88432,36
Plasminogen	P00747	6,79	63245,4
Plasminogen	P00747	5,11	8922,12
Plasminogen	P00747	8,3	44053,02
Plasminogen	P00747	7,44	54341,29
Plasminogen	P00747	7,67	25204,98
Plasminogen activator inhibitor (PAI)-1- antigen	P05121	6,97	42769,2
Platelet endothelial cell adhesion molecule-1, soluble (sPECAM-1)	P16284	6,57	79578,65

Tabla A.3.1 lista de PM y pI de las proteínas identificadas en el plasma que han sido relacionadas con enfermedades cardiovasculares.