

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**Efecto del alprostadil en los cultivos de músculo esquelético  
isquémico:**

**estudio proteómico comparativo frente a músculo sano**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA**

**PRESENTADA POR**

**Mercedes Guerra Requena**

**Directores**

Guillermo Moñux Ducajú  
Francisco Javier Serrano Hernando  
Antonio José López Farré

**Madrid, 2015**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**



**EFFECTO DEL ALPROSTADIL EN LOS  
CULTIVOS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO  
ISQUÉMICO. ESTUDIO PROTEÓMICO  
COMPARATIVO FRENTE A MÚSCULO  
SANO.**

**TESIS DOCTORAL**

***MERCEDES GUERRA REQUENA***

**MADRID 2015**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**



**EFFECTO DEL ALPROSTADIL EN LOS CULTIVOS DE MÚSCULO  
ESQUELÉTICO ISQUÉMICO. ESTUDIO PROTEÓMICO  
COMPARATIVO FRENTE A MÚSCULO SANO.**

**TESIS DOCTORAL**

*MERCEDES GUERRA REQUENA*

**DIRECTORES DE TESIS:**

*GUILLERMO MOÑUX DUCAJÚ*

*FRANCISCO JAVIER SERRANO HERNANDO*

*ANTONIO JOSÉ LÓPEZ FARRÉ*

***MADRID, 2015***



D. ANTONIO JOSÉ LÓPEZ FARRÉ, DOCTOR EN CIENCIAS Y PROFESOR  
CONTRATADO. DOCTOR DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICA:

Que Doña Mercedes Guerra Requena ha realizado bajo su dirección y supervisión la tesis titulada **“EFECTO DEL ALPROSTADIL EN LOS CULTIVOS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO ISQUÉMICO. ESTUDIO PROTEÓMICO COMPARATIVO FRENTE A MÚSCULO SANO”** con objeto de obtener el Grado de Doctor en Medicina.

El presente trabajo reúne las condiciones de rigor y originalidad científica para ser presentada como tesis doctoral.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo la presente certificación en  
Madrid a 10 de Marzo de 2015.

  
D. Antonio José López Farré



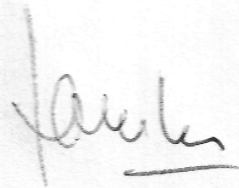
**D. FRANCISCO JAVIER SERRANO HERNANDO**, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA Y JEFE DE SERVICIO DE ANGIOLOGÍA Y CIRUGÍA VASCULAR DEL HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS DE MADRID

CERTIFICA:

Que Doña Mercedes Guerra Requena ha realizado bajo su dirección y supervisión la tesis titulada **“EFECTO DEL ALPROSTADIL EN LOS CULTIVOS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO ISQUÉMICO. ESTUDIO PROTEÓMICO COMPARATIVO FRENTE A MÚSCULO SANO”** con objeto de obtener el Grado de Doctor en Medicina.

El presente trabajo reúne las condiciones de rigor y originalidad científica para ser presentada como tesis doctoral.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo la presente certificación en Madrid a 10 de Marzo de 2015.



D. Francisco Javier Serrano Hernando



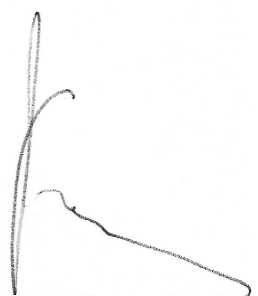
D. **GUILLERMO MOÑUX DUCAJÚ**, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA Y  
MÉDICO ADJUNTO DEL SERVICIO DE ANGIOLOGÍA Y CIRUGÍA VASCULAR  
DEL HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS DE MADRID

CERTIFICA:

Que Doña Mercedes Guerra Requena ha realizado bajo su dirección y supervisión la tesis titulada **“EFECTO DEL ALPROSTADIL EN LOS CULTIVOS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO ISQUÉMICO. ESTUDIO PROTEÓMICO COMPARATIVO FRENTE A MÚSCULO SANO”** con objeto de obtener el Grado de Doctor en Medicina.

El presente trabajo reúne las condiciones de rigor y originalidad científica para ser presentada como tesis doctoral.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo la presente certificación en Madrid a 10 de Marzo de 2015.



D. Guillermo Moñux Ducajú



Esta tesis doctoral ha sido dirigida por los doctores Antonio José López Farré, Francisco Javier Serrano Hernando y Guillermo Moñux Ducajú y financiada por una Beca de Investigación de la Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascular.



*A mi mejor amigo,  
compañero de viaje y esposo,  
a pesar de los momentos  
duros seguimos aquí.*

*A mi familia.*



*Agradecimientos*



*A tí por ser mi apoyo constante, mi crítico más sincero , mi Ángel y mi alma  
gemela.....*

*A mi familia Mamá, Papá, Laura , Víctor y mi alegría, mi pequeña Lucía,  
porque siempre me consideran la mejor en todo lo que hago cegados por su cariño.*

*A Angelillo y Alberto por formar parte de mi familia....*

*A mis amigas de siempre, mis hermanas, porque pase lo que pase siempre están  
en la distancia y sin embargo tan cerca.*

*A mi equipo de Guadalajara, Cari, Estrella, Miguel, Bea ,sin vosotros no  
estarían escritas estas líneas, por vuestro empuje y constancia, por vuestro trabajo  
desinteresado y lealtad.*

*A Willi por haberme metido en este lío del Ciclo de Krebs , a todo el  
departamento de Investigación por su inestimable ayuda, a tantos  
otros.....*

*Mil gracias .*



## ABREVIATURAS

- ADP: Adenosín Difosfato
- AC: Actina
- ATP: Adenosín Trifosfato
- Arg: arginina
- BCA: ácido bicinconínico
- Bcl-2 :B-cell Lymphoma 2
- BSA: albúmina del suero bovino
- CE: Célula embrionaria
- CHAPS: cholidopropil-2 hidroxil-1 propanosulfato
- CML: Célula madre linfocítica
- dl: decilitros
- $\Delta G^\circ$ : Variación de la energía libre de Gibbs estándar de formación
- DHAP: Dihidroxiacetona-fosfato
- EAP: Enfermedad arterial periférica
- EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
- ESI : del inglés, ElectroSpray Ionization
- FAD: Flavín adenina dinucleótido
- FADD : factor associated death domain
- F-6-P: Fructosa 6 fosfato
- Fig: Figura
- FT-MS : del inglés, Fourier Transform ion cyclotron
- G3P: Gliceraldehido 3 fosfato
- G6P: Gliceraldehido 6 fosfato

- HDL: Lipoproteína de alta densidad
- HEPES: ácido 4-(2-HidroxiEtil)-1-PiperacinaEtanosulfónico.
- ITB: Índice tobillo brazo
- IPG: del inglés Isoelectric Phocusing Gradient
- LDH: lactato deshidrogenasa
- LDL: Lipoproteína de baja densidad
- Lys: lisina
- MALDI : del ingles, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
- MDH: malato deshidrogenasa
- Mcl-1 : Mieloid cell leucemia-1
- mg: miligramos
- Mi: Miosina
- ml: mililitros
- mm: milímetros
- mmHg: milímetros de Mercurio
- mmol: milimol
- MS: espectrometría de masas
- NAD: Nicotinamida adenina dinucleotido
- nm: nanometros
- PaO2: presión parcial arterial de oxígeno
- PAS: Presión arterial sistólica
- PC: piruvato carboxilasa
- PCR: Proteína C reactiva
- PEP: fosfoenolpirúvico
- PGE1: Prostaglandina E1

- PGE2: Prostaglandina E2
- pg: picogramos
- PVDF :del inglés polyvinylidene difluoride
- SDS-PAGE :del inglés sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
- seg: segundos
- SFB: suero fetal bovino
- SNC: Sistema Nervioso Central
- TNF: Factor de necrosis tumoral
- TOF : del inglés, time of flight
- TPI: Triosafosfato isomerasa
- UAD: Unidades Arbitrarias Densitométricas
- µg: nanogramos
- 2-DE: del inglés 2-dimensional electrophoresis
- °C: grados Centígrados



# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	27
1.1. MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	27
1.1.1. Estructura.....	27
1.1.2. Tipos de fibra.....	32
1.1.3. Contractilidad muscular.....	34
1.1.3.1. Mecanismo general de la contractilidad muscular.....	34
1.1.3.2. Mecanismo molecular de la contracción muscular.....	36
1.1.3.3. Características moleculares de los filamentos contráctiles.....	37
1.2. METABOLISMO CELULAR DE LOS HIDRATOS DE CARBONO.....	46
1.2.1. Glucolisis.....	46
1.2.2. Ciclo de Krebs.....	49
1.2.3. Vía anaerobia. Formación de Lactato.....	54
1.3. ISQUEMIA CRÓNICA DE MIEMBROS INFERIORES.....	55
1.3.1. Epidemiología.....	55
1.3.2. Factores de riesgo cardiovascular y enfermedad arterial periférica.....	55
1.3.3. Fisiopatología.....	58
1.3.4. Enfermedad vascular coexistente con la enfermedad arterial periférica.....	62
1.3.5. Clasificación.....	63
1.4. ALPROSTADIL.....	66
1.4.1. Farmacología.....	66
1.4.1.1. Propiedades farmacocinéticas.....	66
1.4.2. Mecanismo de acción.....	68
1.4.2.1. Propiedades farmacodinámicas.....	68

1.5. PROTEÓMICA.....	70
1.5.1. Fundamentos de la técnica.....	75
1.5.1.1. Preparación de las muestras.....	77
1.5.1.2. Primera dimensión.....	78
1.5.1.3. Segunda dimensión.....	79
1.5.1.4. Detección de las proteínas.....	79
1.5.2. Análisis de la imagen.....	80
1.5.3. Espectrometría de masas.....	81
1.5.4. Futuro de la proteómica.....	84
1.5.5. La era proteómica en la investigación vascular.....	84
1.6. MARCADORES DE APOPTOSIS.....	87
1.6.1. Morfología.....	88
1.6.2. Mecanismo de Apoptosis.....	89
1.6.3. Bcl-2, Bax, índice Bax/Bcl-2.....	92
1.6.3.1. Bcl-2.....	92
1.6.3.2. Otros miembros de la familia Bcl-2.....	94
1.6.3.3. Bax.....	96
1.6.3.4. Índice Bax/Bcl-2.....	97
1.6.3.5. Bcl-x.....	97
1.6.3.6. Bak.....	97
1.6.3.7. Mcl-1.....	98
1.6.4. La apoptosis en el sistema cardiovascular.....	98
1.6.5. Apoptosis y Alprostadil.....	101
2. HIPÓTESIS.....	103
3. OBJETIVOS.....	105

<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	107
4.1. Selección de pacientes.....	107
4.2. Obtención de las muestras y cultivo.....	108
4.3. Electroforesis bidimensional (2-DE).....	114
4.3.1. Cuantificación de proteínas.....	114
4.3.2. Primera dimensión.....	117
4.3.3. Segunda dimensión.....	119
4.3.4. Tinción.....	120
4.3.5. Adquisición de imágenes y análisis.....	121
4.4. Espectrometría de masas (EM).....	122
4.5. Determinación de Lactato y Piruvato.....	127
4.5.1. Determinación de Piruvato.....	128
4.5.2. Determinación de Lactato.....	130
4.6. Determinación de Bax y Bcl-2.....	132
4.7. Análisis estadístico.....	137
<b>5. RESULTADOS</b> .....	139
5.1. Características de los pacientes.....	139
5.2. Análisis enzimático.....	140
5.3. Contenido de Lactato y Piruvato.....	145
5.4. Determinación de marcadores de apoptosis.....	147
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	149
6.1. En relación a las proteínas del metabolismo energético.....	149
6.2. En relación a las proteínas de la apoptosis.....	154
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	159
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	161

9. RESÚMEN.....	183
10. SUMMARY.....	187

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. MÚSCULO ESQUELÉTICO

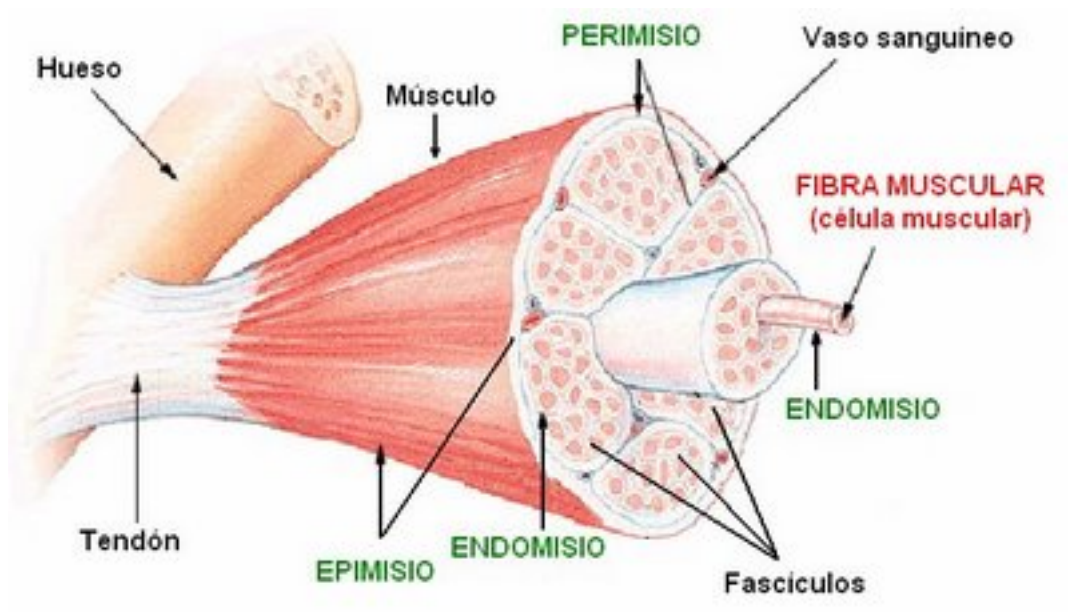
### 1.1.1. Estructura

El músculo esquelético está formado por fibras musculares estriadas, organizadas histológicamente en paquetes ( haz ) envueltos por un tejido conectivo llamado perimysio. El haz se va reuniendo en paquetes , hasta conformar finalmente una estructura que une a todas las fibras del músculo, envuelta por una capa de tejido conectivo llamada perimysio.

Cada haz está conformado por miles de fibras, perfectamente separables porque cada una está envuelta por su propia capa de tejido conjuntivo llamada endomysio. El total de fibras que finalmente tendrá el músculo queda establecido ya a los 4 ó 5 meses de vida fetal. El grosor, en cambio, es al nacer la quinta parte de lo que tendrá de adulto. En éste es muy variable, según el músculo de donde se saque la muestra ( a través de una biopsia). En general el grosor va de 10 milimicrones a 100 milimicrones (1 micrón es una parte de mil). Su longitud suele ir a lo largo de todo el recorrido del músculo, alcanzando hasta 30 centímetros en algunos casos.

En el interior de cada fibra se encuentran las miofibrillas segmentadas en una estructura histológica conocida como sarcómero. Estos sarcómeros, unidos en serie, se observan a todo lo largo de la fibra muscular, y son la unidad funcional en la contracción. Cada sarcómero está separada de su vecino por un disco, o banda, que se ha denominado Z, la cual “corta” la miofibrilla en unidades funcionales.

Cada sarcómero está envuelto por una membrana, con propiedades de transporte químico y eléctrico llamada sarcolema. En su interior los miofilamentos del sarcómero se encuentran inmersos en un medio acuoso, rico en glucógeno, proteínas, sales, lípidos, denominado sarcoplasma. *Fig 1.1*

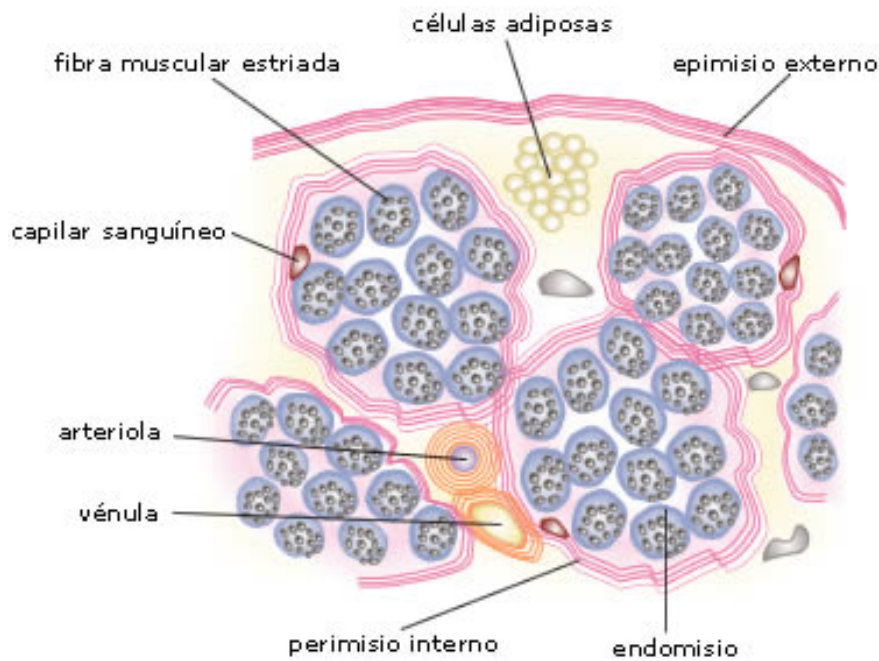
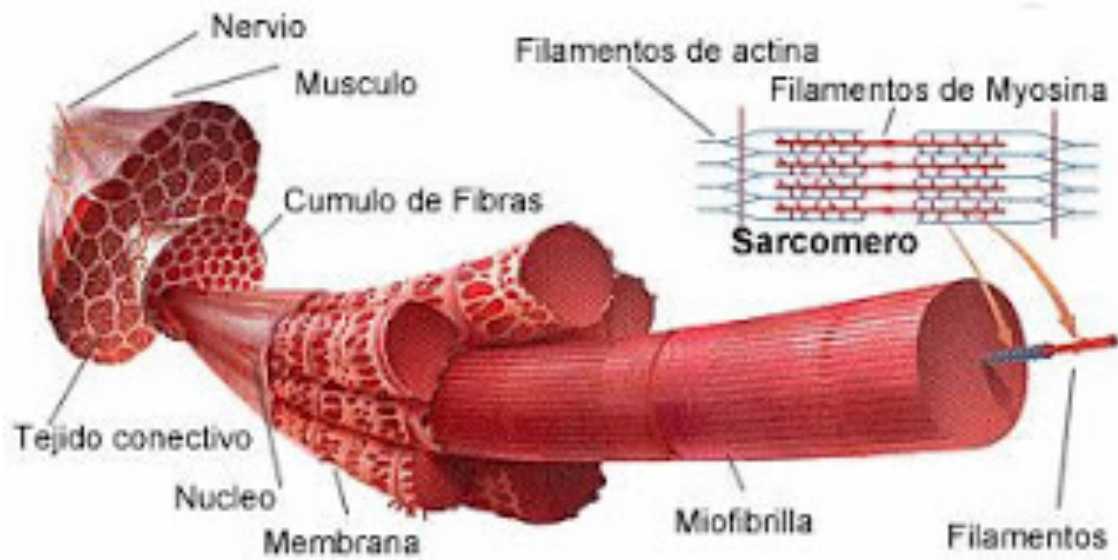


*Fig 1.1 Histología músculo esquelético*

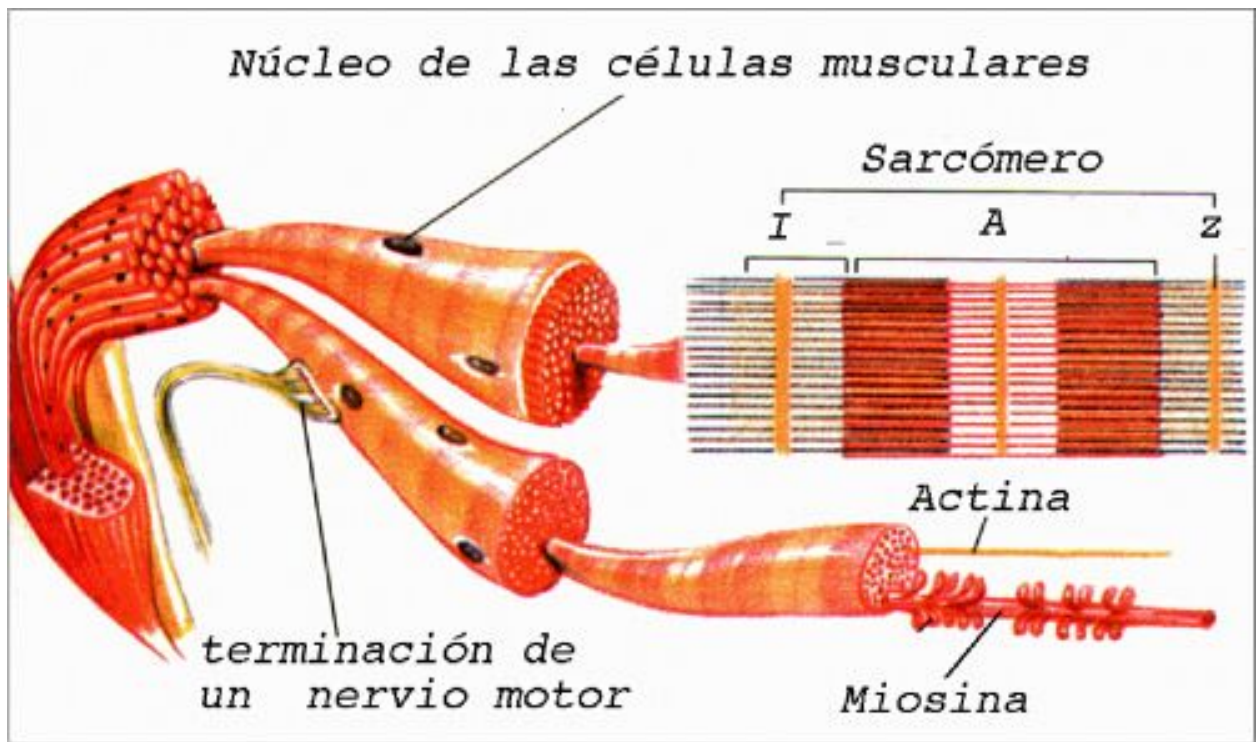
La miofibrilla tiene cuatro componentes básicos que en conjunto producen la contracción: La actina ( filamento delgado); la miosina ( gruesas en forma de palo de golf) ambas dispuestas en paralelo entre sí; la tropomiosina y la troponina, tienen una función reguladora en la formación de los contactos ( puentes) y su ruptura, en la contracción y relajación, respecto de la actina y la miosina.

Los filamentos de miosina y actina son rígidos, pero hay elementos elásticos intermedios que “puentean”. El rango total de movimiento puede ser de 10 a 12 nanómetros( nm). El número de puentes es variable según la velocidad de una contracción. En una activación máxima no alcanza al 50% el número de puentes efectivamente establecidos. Todavía no se sabe cuál estructura es el elemento elástico en el puente, qué clase de unión mantiene la cabeza de miosina con el filamento de actina, cómo actúa el ATP en la unión y desunión de la actina y la miosina. *Fig 1.2 y*

*Fig 1.3*



**Fig 1.2** 1. Miofibrillas distribuidas uniformemente dentro de una fibra muscular; 2. Vaso sanguíneo; 3. Endomisio, que amarra las fibras dentro de un haz primario; 4. Perimisio, empaqueta un haz primario (varios haces primarios forman un haz secundario y así sucesivamente); 5. Vasos sanguíneos que circulan por el perimisio.



*Fig 1.3 Diagrama que muestra la Disposición de los Miofilamentos de Actina y Miosina dentro de la Miofibrilla, en un Músculo Estriado: I. Banda en la que sólo hay actina; H. Banda en la que sólo hay miosina; A. Banda en la que hay actina y miosina; I. Cada miosina está "unida a las actinas vecinas" por finos filamentos (no dibujados en esta figura); Mi. Miosina; AC. Actina (50 A de grosor y 2 micrones de largo); Z. Línea que separa un sarcómero de otro.*

### 1.1.2. Tipos de fibra

Existen dos tipos básicos de fibras musculares:

a) Tipo1: De contracción lenta, tónicas, rojas y mayor resistencia a la fatiga, con una velocidad de contracción de 80 a 100 milisegundos, conectadas a motoneuronas pequeñas.

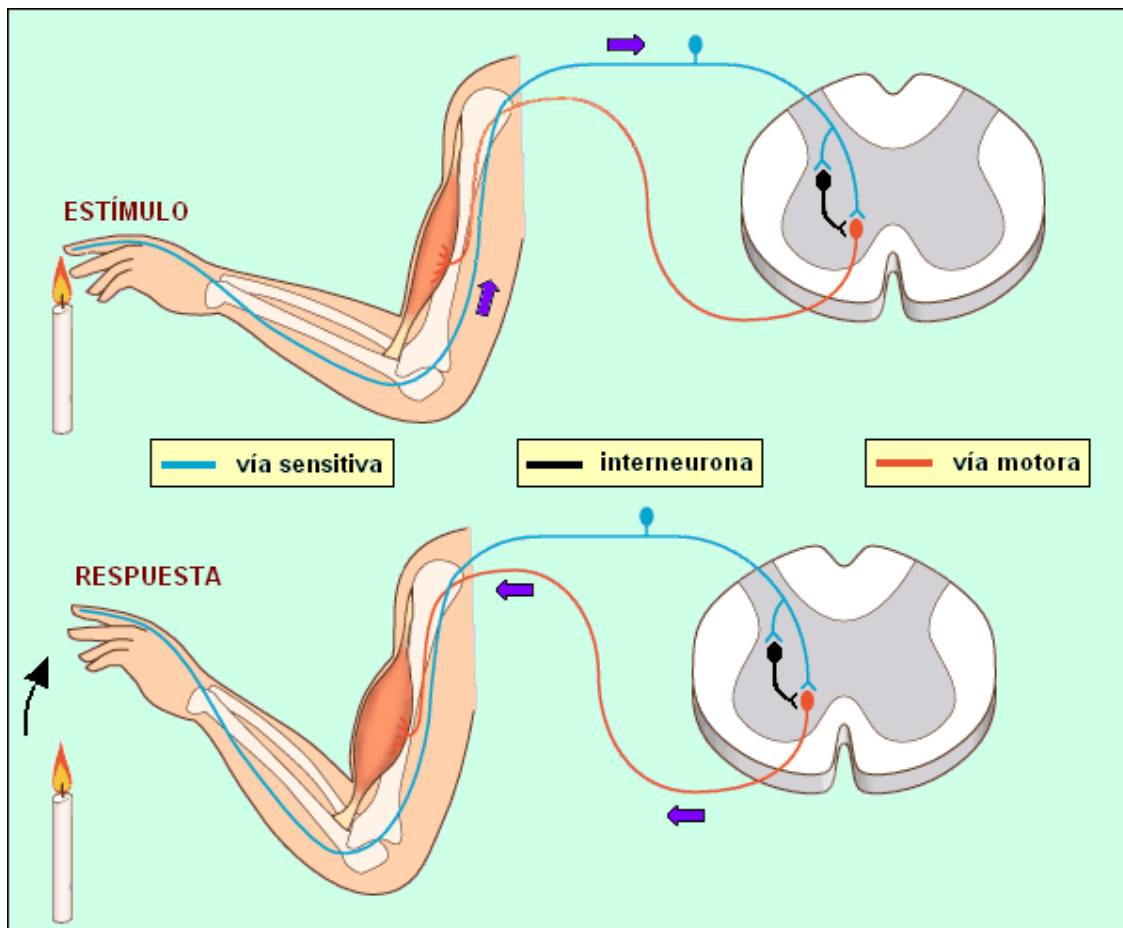
b) Tipo2: De sacudida rápida con velocidad de contracción de 40 milisegundos, fásicas, blancas y menor resistencia a la fatiga. A su vez estas fibras se subdividen en 3 subtipos: 2a,2b,2c, que tienen variaciones histoquímicas entre ellas, que redundan en diferencias contráctiles. Su proporción relativa varía según el tipo de entrenamiento. Están conectadas a motoneuronas de gran tamaño. En un músculo la proporción es alrededor de 50% pero con variaciones que van de 10% a 95% ( ejemplo 75% tipo1 en el sóleo)

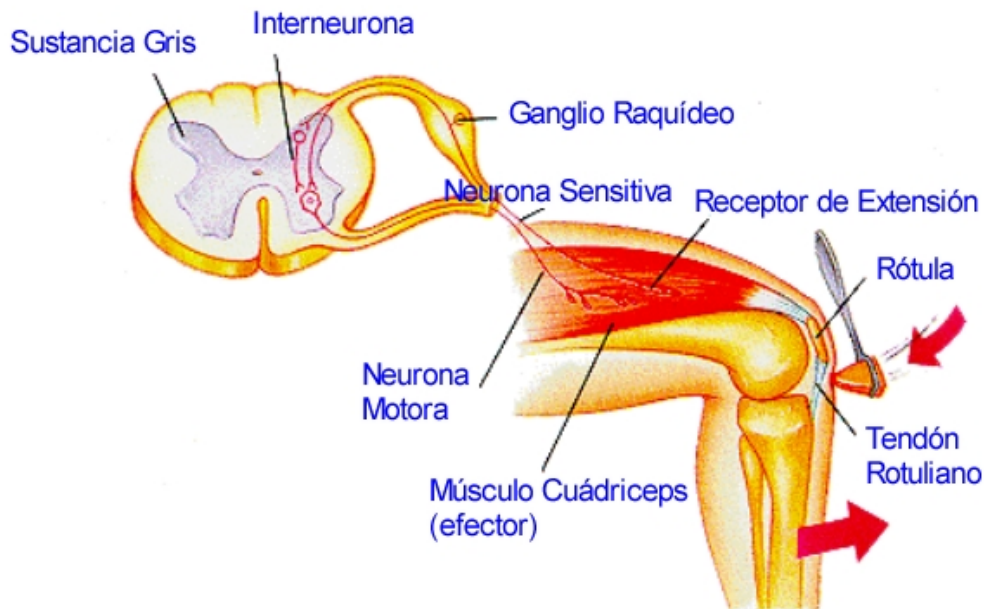
La proporción de fibras tipo 1 y 2 es condicionada por la genética, para cada músculo. Por otra parte, los diferentes músculos tienen proporciones distintas según su característica funcional; los antigravitatorios, por ejemplo, tienen más fibra tipo1 y los músculos de reacción rápida (flexores en general) tienen más fibras tipo2. A las 20 semanas ( 5 meses) de vida fetal ya empieza la diferenciación, la cual es casi completa al año de vida.

La proporción de los diferentes tipos de fibras, si bien está condicionada por la genética, el tipo de entrenamiento físico es un factor fuertemente perturbador. Asimismo la influencia neurológica también es importante en las propiedades contráctiles. Existen numerosos experimentos que demuestran como el tipo de entrenamiento modifica a las fibras; como también experimentos con electroestimulación demuestran la plasticidad

de las fibras para transformarse. No obstante, en ambos casos el reposo prolongado, tiende a revertir tales modificaciones a la situación previa al experimento.

La unidad motora es una motoneurona ( alfa) con la fibras musculares que inerve, cuyo número es muy variable, según el requerimiento de fineza de coordinación a que esté sometido el músculo, a mayor fineza menor número de fibras por cada motoneurona ( por ejemplo un músculo del ojo, comparado con un extensor antigraavitatorio varía de 1 motoneurona por 5 fibras, hasta 1 motoneurona que se conecta a 2.000 fibras ) .Fig1.4





**Fig 1.4 Motoneurona**

Cada motoneurona se conecta con neuronas intercalares ( o internunciales) cuyo número puede variar entre 3.000 y 5.000 neuronas, antes de llegar al sector motor, lo que permite una gama extraordinaria de circuitos y conexiones, que puede derivar en eventos facilitadores o inhibidores, en sumaciones espaciales o temporales, en participación de varios centros a diferentes niveles del Sistema Nervioso Central ( SNC), etc. (1)

### 1.1.3 Contractilidad Muscular

#### 1.1.3.1. Mecanismo General de la Contracción Muscular

El comienzo y la ejecución de la contracción muscular se producen siguiendo las siguientes etapas:

Un potencial de acción viaja por un nervio motor hasta el final del mismo en las fibras musculares.

En cada extremo, el nervio segrega una pequeña cantidad de neurotransmisor: la acetilcolina.

La acetilcolina actúa localmente, en una zona de la membrana de la fibra muscular abriendo múltiples canales para iones sodio compuerta operada por acetilcolina.

La apertura de esos canales permite la entrada a la fibra muscular de grandes cantidades de iones sodio, en el punto correspondiente a la terminal nerviosa. De esta forma comienza un potencial de acción en la fibra muscular. Ese potencial de acción se desplaza a lo largo de la membrana de la fibra muscular, igual que sucede con los potenciales de acción en las membranas de los nervios.

El potencial de acción despolariza la membrana de la fibra muscular y también viaja a su interior. Aquí provoca la liberación, desde el retículo endoplásmico hacia las miofibrillas, de grandes cantidades de iones calcio que se hallaban almacenados en el retículo.

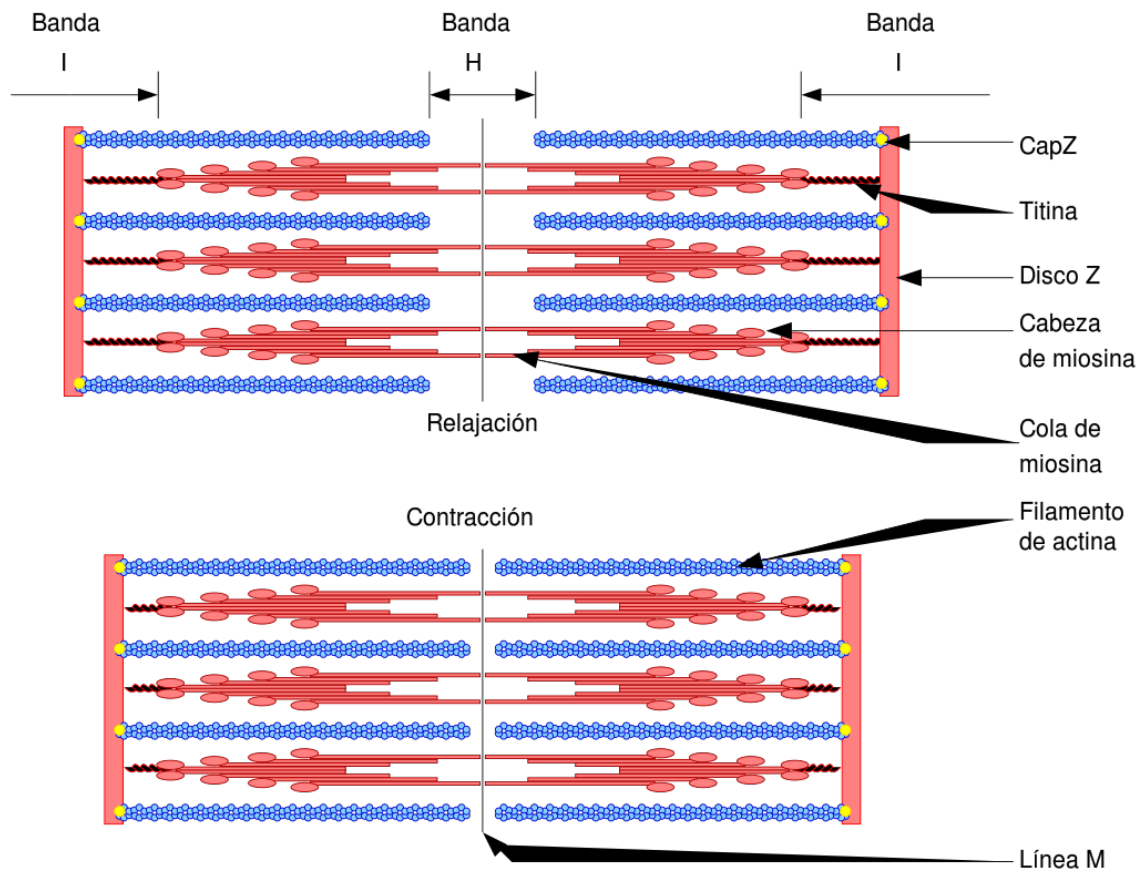
Los iones calcio inician fuerzas de atracción entre los filamentos de actina y miosina, haciendo que se deslicen juntos: éste es el proceso de contracción. (2-4)

Una fracción de segundo después, se bombean los iones calcio hacia el retículo sarcoplásmico, donde permanecen almacenados hasta que llegue un nuevo potencial de acción:

### 1.1.3.2 Mecanismo Molecular de la Contracción Muscular

La figura siguiente ( *Fig. 1.5*) ilustra el mecanismo básico de la contracción muscular.

Se observa una sarcómera en estado relajado (arriba) y en contracción (abajo):



*Fig 1.5 Sarcómera en relajación y contracción*

En estado relajado, los extremos de los filamentos de actina que derivan de dos discos Sucesivos apenas se solapan entre sí, mientras que sí se superponen completamente a los de miosina. Por otra parte, cuando están en contracción, los filamentos de actina se han desplazado entre los de miosina, de forma que ahora se solapan entre sí en mayor grado. Además, los filamentos de actina han tirado de los discos Z hacia los extremos de la miosina. De hecho, los filamentos de actina pueden ser atraídos juntos tan

intensamente que los extremos de los filamentos de miosina llegan a arquearse durante una contracción muy intensa. Así pues, la contracción muscular tiene lugar por un mecanismo de deslizamiento de filamentos. (5)

Pero, ¿qué es lo que hace que los filamentos de actina se deslicen hacia dentro entre los filamentos de miosina? La respuesta es que se trata de fuerzas mecánicas generadas por la interacción de los puentes cruzados entre los filamentos de actina y miosina. En condiciones de reposo, estas fuerzas se hallan inhibidas, pero cuando un potencial de acción viaja por la fibra muscular se produce la liberación de gran cantidad de iones calcio hacia el sarcoplasma que baña las miofibrillas. A su vez, los iones calcio activan las fuerzas entre los filamentos y la contracción comienza. También es preciso que exista energía para el proceso contráctil: se obtiene de los enlaces de alta energía del ATP, que se degrada a adenosina difosfato (ADP) para liberar la energía necesaria.

#### 1.1.3.3 Características moleculares de los filamentos contráctiles

##### -El Filamento de Miosina

El filamento de miosina está formado por múltiples moléculas de miosina, cada una con una masa molecular de 480000. En las figuras 1.2 y 1.3 se muestra una molécula aislada y también la organización de las moléculas para formar un filamento de miosina, así como su interacción con dos filamentos de actina.

La molécula de miosina está constituida por ocho cadenas polipeptídicas: dos de ellas son dos cadenas pesadas, cuya masa molecular es de 200000, que forman la llamada cola de la molécula formando una espiral doble entre ellas. Las otras cuatro cadenas son cadenas ligeras, de masa molecular 20000, que constituyen las dos cabezas de la molécula formando dos espirales dobles dos a dos. Esta disposición se ve claramente en la parte superior de la figura anterior.

El filamento de miosina está formado por 200 moléculas individuales de miosina, constituyéndose de la siguiente manera. Las colas de las moléculas de miosina se agrupan entre sí para formar el cuerpo de la molécula. De este cuerpo sobresale una parte pequeña de la cola y las dos cabezas de la molécula, formando lo que se denomina, en conjunto puente cruzado. Estos puentes son flexibles en dos puntos: el primero es el lugar donde deja de formar parte del cuerpo del filamento, brazo, y el segundo es donde se subdivide en las dos cabezas. Estos puntos articulados se conocen como bisagras, que permiten la aproximación o alejamiento de las cabezas del cuerpo de la molécula. Esta articulación incluso forma parte de la contracción.

Otro aspecto importante de la cabeza de miosina es que puede funcionar como enzima ATPasa, esta propiedad le permitirá desdoblar el ATP y emplear la energía derivada del fosfato de alta energía del mismo para su consumo en el proceso de contracción. (6)

#### -El Filamento de Actina

El filamento de actina también es complejo. Está constituido por tres componentes diferentes: actina, tropomiosina y troponina.

La columna vertebral del filamento de actina una molécula de proteína actina F de cadena doble, que corresponde a las dos tiras de tono claro de la figura anterior. Los filamentos están enrollados en una espiral, de igual forma que la molécula de miosina, pero con una revolución completa cada 70 nanómetros.

Cada banda de la hélice doble de actina F está formada por moléculas polimerizadas de actina G. Hay aproximadamente 13 de estas moléculas en cada revolución de cada banda de la hélice, y existe una molécula de ADP unida a cada una de estas moléculas de actina G. Estas moléculas son los sitios activos de los filamentos de actina, donde los

puentes cruzados de los filamentos de miosina intervienen para provocar la contracción muscular. Estas zonas activas son regulares, habiendo una cada 2.7 nanómetros.

Cada filamento de actina tiene una longitud de 2.7 micras. Las bases de estos filamentos de hallan fuertemente encajadas en los discos Z, mientras sus otros extremos se sitúan entre los filamentos de miosina, en los sarcómeros, como se veía en la anterior figura de varios sarcómeros. (7)

#### -Moléculas de Tropomiosina.

La tropomiosina es otra proteína constituyente del filamento de actina, cada una de estas moléculas tiene una masa molecular de 70000 y una longitud de 70 nanómetros. Estas moléculas se unen laxamente con las bandas de actina F, y se disponen en espiral a los lados de la hélice de actina F. En estado de reposo estas ocultan los sitios activos, de forma que no puedan reaccionar con los filamentos de miosina para desencadenar una contracción. Cada molécula de tropomiosina oculta unos siete de estos sitios activos.

#### -Troponina y su papel en la contracción muscular.

Unida a la vecindad en uno de los extremos de la molécula de tropomiosina se halla otra proteína, la troponina. Se trata, realmente, de un complejo de tres subunidades proteicas unidas laxamente que desempeñan, cada una de ellas, un papel específico en el control de la contracción muscular. Una de las subunidades (troponina I) presenta fuerte afinidad por la actina; otra (troponina T) por la tropomiosina; y la tercera (troponina C) por los iones calcio.

La fuerte afinidad de la troponina C por estos iones inicia el proceso de contracción, como veremos a continuación.

1-Interacción de Miosina, Filamentos de Actina e Iones Calcio para Producir la Contracción

2-Inhibición del filamento de actina por el complejo troponina-tropomiosina; activación por iones calcio.

Un filamento puro de actina, se une fuertemente a las moléculas de miosina en presencia de iones magnesio y ATP, que son abundantes en la miofibrilla. Sin embargo si añade complejo de troponina-tropomiosina, al filamento de actina, esa unión no tiene lugar. Por tanto, se cree que los sitios activos del filamento de actina son escondidos físicamente por dicho complejo. En consecuencia, si no se anula el efecto del complejo de troponina-tropomiosina, los filamentos de actina y miosina no se podrán unir, y, por consiguiente, tampoco podrá haber contracción muscular. (8-10)

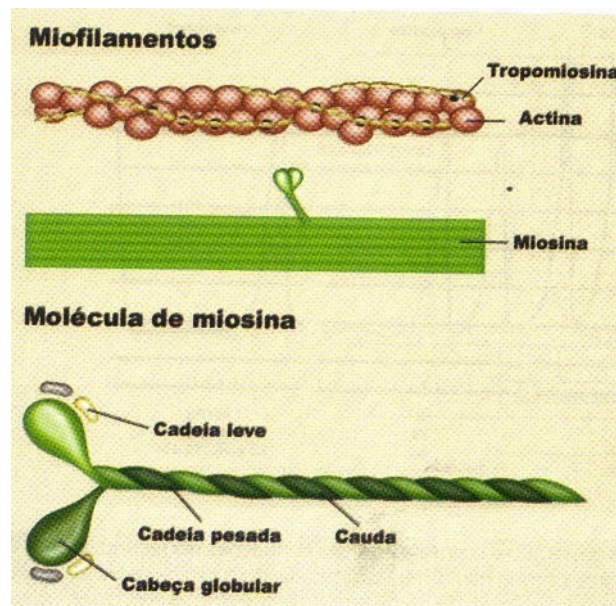
Es ahora cuando los iones calcio cobran su verdadera importancia. En su presencia, desaparece el efecto inhibitor del complejo de troponina-tropomiosina sobre los filamentos de actina. No hay una teoría segura sobre esto, pero se cree que puede ser algo como lo siguiente:

Cuando los iones calcio se combinan con troponina C (pueden juntarse hasta cuatro) se supone que el complejo de troponina sufre un cambio de conformación que de alguna, manera dobla la banda de tropomiosina y la desplaza a una región más profunda, al surco situado entre dos bandas de actina. De este modo deja al descubierto los sitios activos del filamento de actina, y por tanto se produce la contracción. Aunque tan sólo es una hipótesis, sí se sabe que la relación normal del filamento de actina con el complejo troponina-tropomiosina se altera debido a la acción de los iones calcio.

3-Interacción entre el filamento “activado” de actina y los puentes cruzados de miosina: la teoría de la “cremallera” de la contracción.

Tan pronto como sucede la activación del filamento de actina, por los iones calcio, las cabezas de los puentes de miosina son atraídas hacia los sitios activos del filamento de miosina, lo que provoca la contracción muscular. Aunque se desconoce de manera exacta la manera en que esta interacción produce la contracción, existe una hipótesis que tiene bastantes pruebas a favor, denominada teoría de la “cremallera” de la contracción.

La siguiente figura (*Fig 1.6*) ilustra el mecanismo enunciado por esta teoría:



*Fig.1.6. Molécula miosina*

Aquí se muestra las cabezas de dos puentes cruzados que se unen a, y se separan de, los sitios activos de un filamento de actina. Se ha postulado que la unión de la cabeza a un sitio activo causa simultáneamente cambios profundos en las fuerzas intramoleculares en la cabeza y el brazo del puente cruzado. La nueva alineación de las fuerzas

determinaría que la cabeza se inclinara hacia el brazo, arrastrando con ella al filamento de actina. Esta inclinación de la cabeza se denomina “impulso de fuerza”. A continuación, inmediatamente después de la inclinación, la cabeza se separaría automáticamente del sitio activo y regresaría a su dirección perpendicular normal. En esta posición se combinaría con un nuevo sitio de actina más alejado. Luego tendría lugar una nueva inclinación similar para producir otro impulso de fuerza y el filamento de actina se desplazaría una vez más. De esta forma los puentes cruzados irían tirando del filamento de actina hasta el centro del de miosina. (11-13)

Se piensa que cada puente cruzado actúa de una manera independiente y aleatoria pero continua. Así que, en teoría, a mayor número de puentes cruzados mayor es la fuerza de contracción.

4-ATP como fuente de energía para la contracción: acontecimientos químicos durante el movimiento de las cabezas de miosina.

Cuando un músculo se contrae contra una carga, se efectúa un trabajo y se necesita energía. Durante el proceso de contracción se utilizan grandes cantidades de ATP, que producen ADP. Además, a mayor trabajo realizado por el músculo, mayor cantidad de ATP usado (efecto Fenn). Este proceso se desconoce también exactamente, pero, de acuerdo con la teoría de la “cremallera” de la contracción, se ha sugerido el siguiente mecanismo para explicar el proceso:

Antes del comienzo de la contracción las cabezas de los puentes cruzados se unen con ATP, que se desdobra en ADP y Pi, que quedan unidos a la cabeza. En este estado la cabeza se extiende totalmente formando un ángulo de 90 grados con respecto al filamento de actina, pero sin tocarlo.

Cuando los iones calcio anulan el efecto del complejo troponina-tropomiosina, dejando al descubierto los sitios activos del filamento de actina estos se unen con las cabezas de los puentes cruzados.

Esta unión produce un cambio de conformación en la cabeza del puente cruzado inclinándola hacia atrás en dirección al brazo. Esto da el impulso necesario para tirar del filamento de actina. La energía que activa este proceso estaba ya almacenada en la cabeza del puente cruzado, puesto que al desdoblar la molécula de ATP la cabeza sufrió un cambio de conformación.

Una vez se inclina la cabeza del puente cruzado, se liberan las moléculas de ADP y Pi. Esta liberación hace que una molécula de ATP se vuelva a unir a la cabeza del puente cruzado, lo que hace que se suelte del sitio activo del filamento de actina.

Cuando se desprende de la actina, la molécula de ATP se vuelve a desdoblar de nuevo, haciendo que la cabeza se vuelva a enderezar, quedando dispuesta para un nuevo impulso de fuerza.

A continuación se une a un nuevo sitio de actina y se vuelve a “desenderezar”, proporcionando un nuevo impulso de fuerza.

Este proceso se repetirá hasta que el filamento de actina tire de la membrana Z hasta los extremos del filamento de miosina o la carga del músculo sea demasiado grande para poder tirar más. (14)

#### 5-Grado de Solapamiento de los Filamentos de Actina y Miosina: Efecto sobre la Tensión Desarrollada por el Músculo en Contracción

El efecto de la longitud de la sarcómera y del solapamiento de los filamentos de actina y miosina sobre la tensión activa desarrollada por una fibra muscular en contracción.

En el punto D, el filamento de actina ha ejercido toda la tracción hasta el final del filamento de miosina, sin superposición alguna. En este caso la tensión desarrollada por el músculo activado es nula. Cuando la sarcómera se acorta y el filamento de actina se superpone cada vez más al de miosina, la tensión aumenta progresivamente, hasta que la longitud de la sarcómera disminuye a unas 2'2 micras. En este momento, el filamento de actina está superpuesto ya a todos los puentes cruzados del filamento de miosina, pero todavía no ha alcanzado el centro de éste. Cuando aumenta el acortamiento, la sarcómera conserva plena tensión hasta punto B, siendo entonces su longitud de 2'0 micras. Ahora es cuando los extremos de los dos filamentos de actina comienzan a superponerse. En el momento en que la longitud de la sarcómera se reduce hasta aproximadamente 1'65 micras, la fuerza de contracción disminuye. Es en este punto donde las dos membranas Z de la sarcómera tocan los extremos de los filamentos de miosina. Después, cuando la contracción acorta todavía más las sarcómeras, los extremos de los filamentos de miosina se encogen, pero también disminuye gradualmente la tensión.

Este esquema demuestra que la contracción máxima sucede cuando hay máxima superposición entre los sitios activos del filamento de actina y los puentes cruzados del filamento de miosina. Esto confirma la idea de que a cuando mayor sea el número de puentes cruzados mayor será la fuerza de la contracción (15,16)

#### 6-Relación entre Velocidad de Contracción y Carga

Un músculo contrae con mucha rapidez cuando la carga es nula, estando en promedio en 0,1 segundos. No obstante cuando se aplican cargas la velocidad de contracción disminuye, siendo cada vez más lenta cuanto más grande sea la carga. Cuando la carga

se iguala a la tensión que el músculo puede soportar, la velocidad se hace cero, esto quiere decir que, a pesar de estar el músculo activado, no hay contracción.

### 7-Energética de la Contracción Muscular

Como ya hemos dicho, la contracción muscular depende de la energía suministrada por el ATP. La mayor parte de esta energía se destina al efecto cremallera, pero también se necesitan pequeñas cantidades para:

Bombear calcio desde el sarcoplasma hacia el retículo sarcoplásmico cuando la contracción finaliza.

Bombear iones de sodio y potasio a través de la membrana de la fibra muscular, manteniendo el ambiente iónico adecuado para la propagación de los potenciales de acción.

Todo este proceso, hace que las necesidades de energía del músculo sean muy elevadas. La concentración de ATP presente en una fibra muscular sólo mantiene a un músculo funcionando 1 ó 2 segundos solamente. Este problema se soluciona refosforilando el ADP y convirtiéndolo de nuevo en ATP. Existen tres métodos para solucionar este problema:

La Fosfocreatina: Esta contiene un enlace fosfato de alta energía similar al del ATP. La fosfocreatina se desdobra instantáneamente y la energía liberada se usa para unir un fosfato al ADP, reconstruyendo el ATP. Este método no puede mantener la contracción más allá de 7 u 8 segundos.

El Glucógeno: Este está almacenado en las células musculares. Se degrada rápidamente y libera energía, que se puede usar directamente en la contracción muscular o para reconstituir fosfocreatina. Dos características de este método son que no requiere

oxígeno y su gran velocidad. La acumulación de residuos no permite que el uso de esta forma de energía se extienda más de un minuto.

El metabolismo oxidativo: en este método se combinan varios substratos alimenticios para liberar ATP. El 95% de la energía en procesos largos proviene de esta fuente, que puede llegar a mantenerlos durante varias horas utilizando glúcidos ,proteínas y, principalmente, lípidos. (17)

En el siguiente punto desarrollaremos más ampliamente el metabolismo oxidativo de los hidratos de carbono.

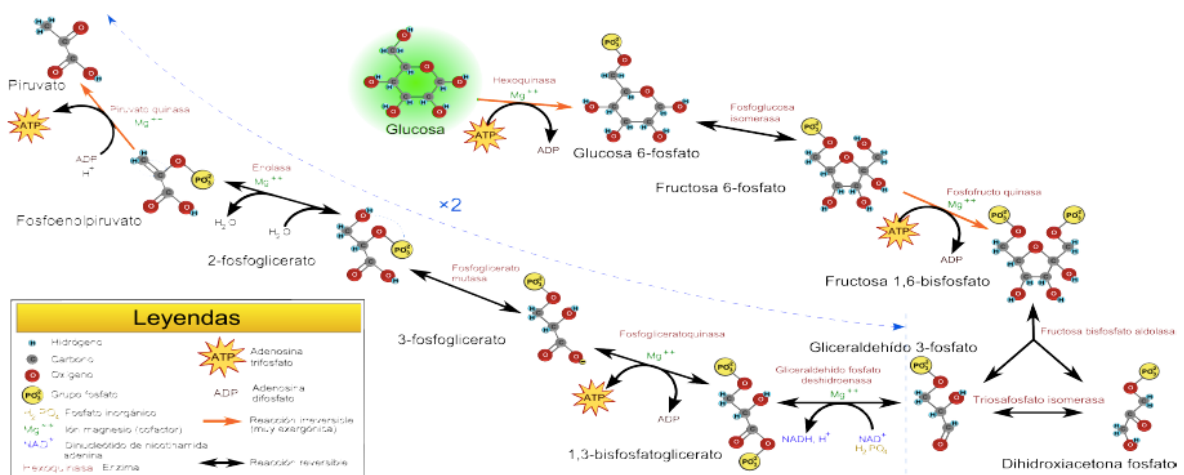
## 1.2. METABOLISMO CELULAR DE LOS HIDRATOS DE CARBONO

El metabolismo energético está constituido por un conjunto de reacciones bioquímicas y procesos fisicoquímicos que ocurren en la célula.

### 1.2.1. Glucolisis

Entre estos complejos procesos interrelacionados, la glucolisis constituye la principal fuente de energía celular a través de la oxidación de la glucosa en el citosol (*Fig. 1.7*).

Esta ruta universal consta de diez reacciones agrupadas en dos fases(18):



**Figura 1.7.** Esquema de las diez reacciones que constituyen la vía glucolítica, con los sustratos, productos y enzimas catalizadoras. Fuente: [www.wikipedia.es](http://www.wikipedia.es).

1. Fase de gasto o aporte energético

- **Reacción 1. Fosforilación de la glucosa.** El primer paso de la glucólisis consiste en la activación de la glucosa mediante la transferencia de un grupo fosfato del ATP por la enzima hexoquinasa. Como consecuencia se forma la glucosa-6-fosfato (G6P).
- **Reacción 2. Isomerización de la glucosa-6-fosfato.** En esta fase la G6P se isomeriza a fructosa-6-fosfato (F6P) mediante una reacción de cuatro pasos, que implica la apertura del anillo de la G6P y posterior ciclado en la forma furanosa (F6P).
- **Reacción 3. Fosforilación de la fructosa-6-fosfato.** La fosfofructoquinasa-1 fosforila el carbono 1 de la F6P (obteniendo la fructosa 1,6-bifosfato), constituyendo éste el principal punto de control de la glucólisis debido a su irreversibilidad.

• **Reacción 4. Fragmentación de la fructosa 1,6-bifosfato.** Una enzima clave en la vía glucolítica es la fructosa 1,6-bifosfato aldolasa, que escinde la fructosa 1,6-bifosfato en dos triosas fosfato: la dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) y el gliceraldehído-3-fosfato (G3P).

• **Reacción 5. Isomerización de la dihidroxiacetona-fosfato.** Otra enzima fundamental en el proceso de la glucólisis es la implicada en esta reacción: la triosa fosfato isomerasa (TPI). La TPI representa un importante papel en la producción de energía por la célula. Su función es isomerizar la DHAP en otra molécula de G3P.

## 2. Fase de obtención de energía

• **Reacción 6. Oxidación y fosforilación del D-gliceraldehído-3-fosfato.** Esta reacción es catalizada por la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, oxidando el G3P mediante la utilización de NAD<sup>+</sup> para añadir un ion fosfato a la molécula y obteniendo el 1,3-bifosfoglicerato.

• **Reacción 7. Cesión de un grupo fosfato del 1,3-bifosfoglicerato al ADP.** En este paso la enzima fosfoglicerato quinasa transfiere el grupo fosfato del 1,3-bifosfoglicerato a una molécula de ADP, generando así la primera molécula de ATP de la vía (y el 3-fosfoglicerato).

• **Reacción 8. Isomerización del 3-fosfoglicerato.** La enzima fosfoglicerato mutasa isomeriza el 3-fosfoglicerato procedente de la reacción anterior, dando el 2-fosfoglicerato.

• **Reacción 9. Deshidratación del 2-fosfoglicerato.** En este paso se produce una pérdida de una molécula de agua del 2-fosfoglicerato para dar lugar al ácido fosfoenolpirúvico (PEP). La enzima encargada de catalizar esta reacción es la enolasa.

• **Reacción 10. Cesión de un grupo fosfato al ADP.** La última reacción de la glucólisis es catalizada por la piruvato quinasa y da lugar al piruvato por la cesión de un grupo fosfato del PEP al ADP.

El anión piruvato es un compuesto orgánico clave en el metabolismo energético y puede seguir dos caminos: 1, si hay suficiente suministro de oxígeno, el ácido pirúvico es descarboxilado en la matriz de la mitocondria por el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa rindiendo CO<sub>2</sub> y acetil coenzima A, que es el inicio del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa; 2, si no hay suficiente cantidad de oxígeno disponible, el piruvato sigue una ruta anaeróbica, la fermentación, que culmina en la producción de ácido láctico.

En el proceso metabólico de obtención de energía mediante la fosforilación oxidativa adquiere gran importancia el complejo ATP sintasa, situado en la cara interna de la membrana interna de las mitocondrias. Su función fundamental es la de sintetizar ATP a partir del ADP y un grupo fosfato y de la energía suministrada por un flujo de protones (H<sup>+</sup>). Esta enzima está formada por dos principales complejos, el F<sub>0</sub> y el F<sub>1</sub>. A su vez, el complejo F<sub>1</sub> está formado por tres dímeros  $\alpha\beta$ . La mayor parte del sitio catalítico reside en la cadena  $\beta$ 31.

### 1.2.2 Ciclo de Krebs

En las células aerobias distintas vías catabólicas convergen en el ciclo de Krebs

El ciclo de Krebs (de los ácidos tricarbónicos o del ácido cítrico) es una vía metabólica presente en todas las células aerobias, es decir, las que utilizan oxígeno como aceptor final de electrones en la respiración celular. En los organismos aerobios las rutas

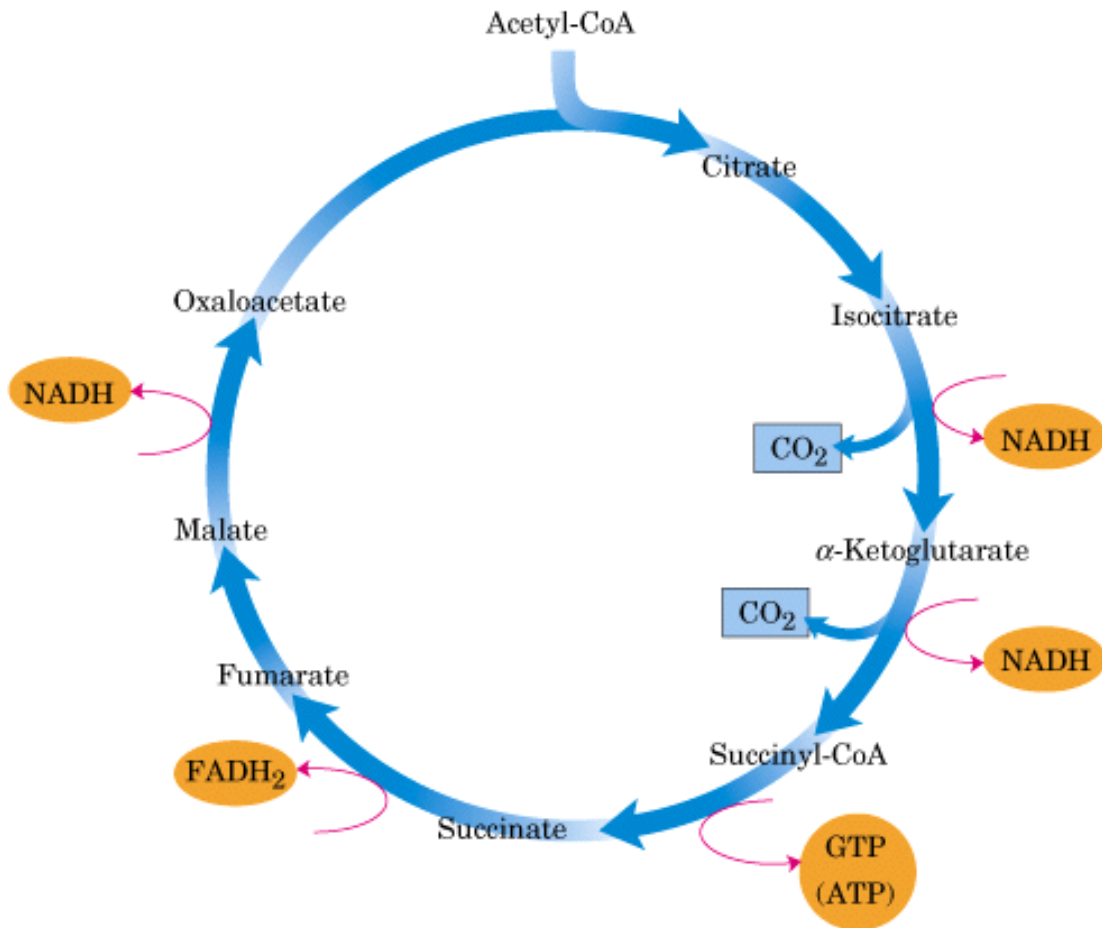
metabólicas responsables de la degradación de los glúcidos, ácidos grasos y aminoácidos convergen en el ciclo de Krebs, que a su vez aporta poder reductor a la cadena respiratoria y libera CO<sub>2</sub> .

El catabolismo oxidativo de glúcidos, ácidos grasos y aminoácidos puede dividirse en tres etapas, de las cuales el ciclo de Krebs es la segunda.

En la primera etapa, que incluye a las vías catabólicas de ácidos grasos y a la glucólisis se genera acetil-CoA (2C). Los aminoácidos pueden dar indirectamente acetil CoA , o directamente intermediarios del ciclo de Krebs.

En la tercera etapa el poder reductor aportado por el ciclo de Krebs es drenado hasta el oxígeno a través de los transportadores de cadena respiratoria (NADH.H, FADH<sub>2</sub>, CoQ y citocromos) y parte de la energía liberada se emplea en la síntesis de ATP por fosforilación oxidativa.

El ciclo de Krebs es una ruta anfibólica: participa en procesos catabólicos y anabólicos. El ciclo proporciona  $\alpha$ -cetoglutarato y oxalacetato para la síntesis de glutamato y aspartato respectivamente, entre otras moléculas fundamentales para la célula. (*Fig1.8.*)



**Fig1.8.** Resumen del ciclo de Krebs. Cortesía M. Delgado.

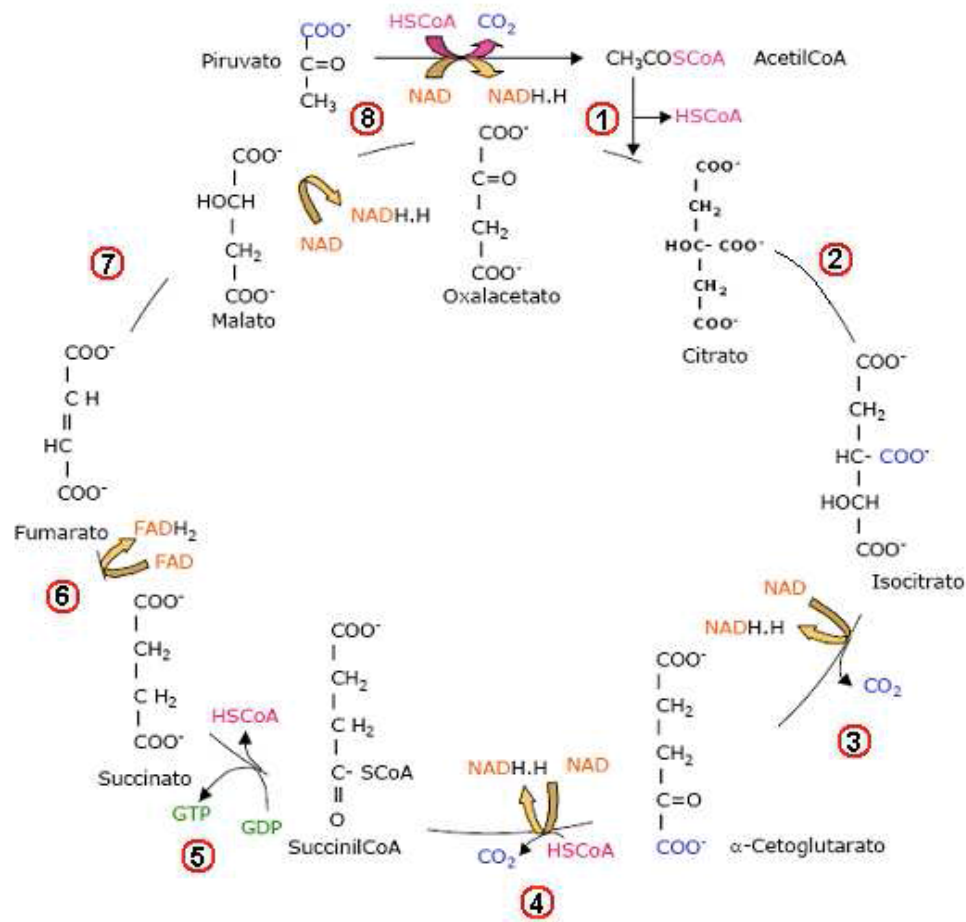
La acetil-CoA generada por los diferentes catabolismos se condensa con el oxalacetato y genera citrato. A través de 7 reacciones de oxidación y descarboxilación sucesivas se regenera oxalacetato, capaz de iniciar un nuevo ciclo.

- **Reacción 1: condensación del oxalacetato con la acetil CoA.** La enzima citrato sintasa condensa a la acetil-CoA (2C) con el oxalacetato (4C) para dar una molécula de citrato (6C). Como consecuencia de esta condensación se libera la coenzima A (HSCoA). La reacción es fuertemente exergónica: es irreversible.
- **Reacción 2: isomerización del citrato a isocitrato.** La isomerización del citrato en isocitrato ocurre por dos reacciones, que se resumen en una.

- **Reacción 3: oxidación y decarboxilación del isocitrato.** El isocitrato es sustrato de la isocitrato deshidrogenasa, enzima que tiene como cofactor un NAD, que forma parte de la cadena respiratoria. En la reacción 3 se resumen dos reacciones a partir de las cuales el isocitrato forma  $\alpha$ -cetoglutarato (5C). Para lograr ese producto ocurre una decarboxilación, es decir la liberación de una molécula de CO<sub>2</sub>, y la reducción de un NAD que permite la formación de 3 ATP.
- **Reacción 4: el  $\alpha$ -cetoglutarato se transforma en succinil-CoA.** Este paso implica la segunda decarboxilación oxidativa, catalizada por la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, que lleva a la formación de succinil-CoA (4C). El NAD es la coenzima de la deshidrogenasa, de manera que se formarán 3 ATP como consecuencia de la actividad de cadena respiratoria.
- **Reacción 5: la succinil-CoA rinde succinato y GTP.** La succinil-CoA, es un tioéster de alta energía con un  $\Delta G^\circ$  de hidrólisis de -33.5 KJ.mol<sup>-1</sup> aproximadamente. La energía liberada por la ruptura de ese enlace se utiliza para generar un enlace fosfoanhidro entre un fosfato y un GDP para dar 1GTP por fosforilación a nivel de sustrato. En la reacción se libera HSCoA.
- **Reacción 6: el succinato se transforma en fumarato.** El succinato es oxidado a fumarato por la succinato deshidrogenasa, enzima que tiene como cofactor al FAD: se producen 2ATP en la cadena respiratoria. La enzima usa FAD porque la energía asociada a la reacción no es suficiente para reducir al NAD.
- **Reacción 7: el fumarato se hidrata y genera malato.** La fumarasa cataliza la adición de agua, es decir la hidratación del fumarato. El producto de la reacción es el malato.

- **Reacción 8: el malato se oxida a oxalacetato.** Dada la naturaleza cíclica de la vía, las reacciones en su conjunto conducen a la regeneración del oxalacetato. La malato deshidrogenasa cataliza la oxidación del malato a oxalacetato, con la reducción de un NAD: se forman 3 ATP en la cadena respiratoria. (*Fig 1.9*)

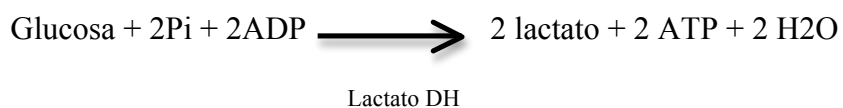
La regulación del ciclo hace posible la producción de moléculas de acuerdo a las necesidades celulares, y asegura que no ocurra sobre o sub producción en un momento dado. La regulación del ciclo se da en diferentes puntos, porque puede alimentarse o ser abastecido a través de cualquiera de sus intermediarios. La regulación es compleja en comparación con la de vías catabólicas como la glucólisis, y se considerarán situaciones de regulación relacionadas al estado energético celular. La regulación de las enzimas es por modulación alostérica, por modificación covalente y por acumulación de productos. La “lógica” de la regulación se rige principalmente por la relación ATP/ADP y NADH.H/NAD, así como por las concentraciones de algunos intermediarios del ciclo. Las relaciones entre ATP/ADP y NADH.H/NAD están relacionadas entre sí a través de la fosforilación oxidativa que ocurre en la cadena respiratoria y ambas son señales del estado energético de la célula.



**Fig.1.9** Resumen reacciones Ciclo de Krebs

### 1.2.3 Vía anaerobia. Formación de Lactato.

Cuando la cantidad de oxígeno disponible para la célula es limitada, como ocurre en el músculo durante la actividad intensa, el NADH generado durante la glucólisis no puede reoxidarse a tasas comparables en las mitocondrias y con la finalidad de mantener la homeostasis, el piruvato es entonces reducido por el NADH para formar lactato, reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa. Esta desviación metabólica del piruvato mantiene a la glucólisis operativa bajo condiciones anaeróbicas. La reacción global de la conversión de glucosa a lactato es:



### 1.3. ISQUEMIA CRÓNICA DE MIEMBROS INFERIORES

#### 1.3.1 Epidemiología

La enfermedad arterial periférica (EAP) afecta a un 15-20% de los sujetos mayores de 70 años(19-21), si bien es probable que su prevalencia sea aún mayor si analizamos a los sujetos asintomáticos. La prueba diagnóstica realizada en mayor medida para analizar a la población asintomática es el índice tobillo-brazo (ITB). En sujetos sintomáticos, el ITB  $< 0,9$  tiene una sensibilidad  $> 95\%$  y una especificidad próxima al 100% en comparación con la arteriografía(22) Cuando se compara a enfermos con EAP con controles de igual edad, la incidencia de mortalidad cardiovascular es del 0,5% en controles y del 2,5% en los pacientes con EAP. Además, en los pacientes con enfermedad coronaria conocida, la presencia de EAP eleva el riesgo de muerte un 25% con respecto a los controles. Por todo esto es importante la búsqueda de la EAP incluso en pacientes asintomáticos, para controlar precozmente los factores de riesgo y reducir la mortalidad(23).

#### 1.3.2 Factores de riesgo cardiovascular y enfermedad arterial periférica

Los denominados factores de riesgo mayores son los que han sido determinados a partir de grandes estudios epidemiológicos y son concordantes con los factores de riesgo para enfermedad cerebrovascular y cardiopatía isquémica. Algunos estudios han confirmado que los factores de riesgo mayores (diabetes, hipertensión, tabaquismo e hiperlipemia) están implicados en un 80-90% de las enfermedades cardiovasculares(23,24)

### Sexo

La prevalencia de la EAP, tanto sintomática como asintomática, es mayor en varones que en mujeres, sobre todo en la población más joven, ya que en edades muy avanzadas prácticamente no se alcanzan diferencias entre ambos grupos. Además, la prevalencia en los varones es mayor en los grados de afectación más severa (isquemia crítica).

### Edad

Es el principal marcador de riesgo de EAP. Se estima que la prevalencia de claudicación intermitente en el grupo de 60-65 años es del 35%. Sin embargo, en la población 10 años mayor (70-75 años), la prevalencia se incrementa hasta alcanzar un 70%.

### Tabaco

En algunos estudios se ha encontrado una asociación más fuerte entre el abuso de tabaco y la EAP que entre el abuso de tabaco y la cardiopatía isquémica. Además, los fumadores más severos no sólo tienen un mayor riesgo de EAP, sino que presentan las formas más graves que ocasionan isquemia crítica(25-27). El abandono del tabaco se ha acompañado de una reducción en el riesgo de EAP(28) y se ha comprobado que, aunque el riesgo de experimentar EAP en ex fumadores es 7 veces mayor que en no fumadores, en los fumadores activos es 16 veces más elevado(28). Por otra parte, la permeabilidad tanto de los injertos de derivación aortocoronaria venosos como de los protésicos se reduce en pacientes fumadores. La tasa de amputaciones y la mortalidad también son mayores en sujetos fumadores(25).

### Diabetes

La diabetes es un factor de riesgo no sólo cualitativo, sino cuantitativo, ya que por cada aumento del 1% de la hemoglobina glucosilada se produce un incremento del 25% en el riesgo de EAP(29). La afectación de vasos distales de las extremidades es típica y, junto con la microangiopatía y la neuropatía, que implican una mala respuesta a la infección y un trastorno específico de la cicatrización, condicionan un riesgo de amputación hasta 10 veces superior al de los pacientes no diabéticos. Cabe destacar que en los pacientes diabéticos pueden obtenerse valores anormalmente altos de presión en el tobillo y, por tanto, falsos negativos en la valoración del ITB.

### Hipertensión

Su importancia como factor de riesgo es inferior a la diabetes o el tabaquismo. No obstante, se considera que el riesgo de EAP es el doble en los pacientes hipertensos que en los controles.

### Dislipemia

En varios estudios epidemiológicos se ha demostrado que la elevación del colesterol total y el colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL) y el descenso del colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL) se asocian con una mayor mortalidad cardiovascular. Factores de riesgo independientes para el desarrollo de EAP son el colesterol total, el cLDL, los triglicéridos y la lipoproteína (a). En el estudio de Framingham se comprobó que el cociente colesterol total/cHDL fue el mejor predictor de EAP. Se ha comprobado que el tratamiento de la hiperlipemia reduce la progresión de la EAP y el desarrollo de isquemia crítica.

### Hiperhomocisteinemia

Las alteraciones en el metabolismo de la homocisteína constituyen un importante riesgo de arterosclerosis y, en especial, de EAP(30). Hasta un 30% de los pacientes jóvenes con EAP presenta hiperhomocisteinemia. El mecanismo de acción podría ser doble: por una parte, promover la oxidación del cLDL y, por otra, inhibir la síntesis de óxido nítrico.

### Marcadores inflamatorios

Los valores de proteína C reactiva (PCR) en los pacientes con EAP establecida se han mostrado como un marcador de riesgo de futuros eventos cardiovasculares. El riesgo de infarto de miocardio durante el seguimiento de los pacientes con EAP avanzada susceptibles de tratamiento quirúrgico parece estar condicionado por los valores elevados de PCR prequirúrgicos, con independencia de la presencia de los factores clásicamente considerados de riesgo cardiovascular o del antecedente clínico de cardiopatía isquémica(31). Los valores de fibrinógeno y las alteraciones en las propiedades hemorreológicas de la sangre también se han asociado con una mayor prevalencia de arteriopatía periférica. Algunos estudios han mostrado que las concentraciones elevadas de fibrinógeno condicionan una alteración de la microcirculación que se asocia con una clínica más acusada de claudicación intermitente.

### 1.3.3 Fisiopatología

Se entiende como isquemia arterial periférica al conjunto de cuadros sindrómicos, agudos o crónicos, generalmente derivados de la presencia de una enfermedad arterial oclusiva, que condiciona un insuficiente flujo sanguíneo a las extremidades. En la gran

mayoría de las ocasiones, el proceso patológico subyacente es la enfermedad arteriosclerótica, y afecta preferentemente a la vascularización de las extremidades inferiores, por lo que nos referiremos a esta localización.

Desde el punto de vista fisiopatológico, la isquemia de los miembros inferiores puede clasificarse en funcional y crítica. La isquemia funcional ocurre cuando el flujo sanguíneo es normal en reposo pero insuficiente durante el ejercicio, manifestándose clínicamente como claudicación intermitente. La isquemia crítica se produce cuando la reducción del flujo sanguíneo ocasiona un déficit de perfusión en reposo y se define por la presencia de dolor en reposo o lesiones tróficas en la extremidad. En estas circunstancias, el diagnóstico preciso es fundamental, ya que hay un claro riesgo de pérdida de extremidad si no se restablece un flujo sanguíneo adecuado, mediante cirugía o tratamiento endovascular. Diferenciar ambos conceptos es importante para establecer la indicación terapéutica y el pronóstico de los pacientes con EAP.

El grado de afectación clínica dependerá de dos factores: la evolución cronológica del proceso (agudo o crónico) y la localización y la extensión de la enfermedad (afectación de uno o varios sectores).

### *Evolución cronológica*

El mecanismo fisiopatológico por el que se desarrolla la isquemia arterial se basa en la presencia de estenosis arteriales que progresan en su historia natural hasta provocar una oclusión arterial completa. Ello se traduce en un mayor o menor grado de desarrollo de las vías colaterales de suplencia. Cuando el desajuste entre las necesidades de los tejidos periféricos y el aporte de sangre se produce de manera más o menos abrupta (placa de alto riesgo), estaremos ante un cuadro de isquemia aguda de origen trombótico. Se han podido detectar diferencias en el comportamiento de la placa ateromatosa en relación

con la localización anatómica. Las placas de alto riesgo de las arterias de las extremidades inferiores son muy estenóticas y fibrosas(32). Dicha estenosis, asociada con un estado de hipercoagulabilidad, contribuye de manera decisiva al desarrollo de eventos agudos. Este tipo de placas contrasta claramente con las lesiones presentes en las arterias coronarias, que con frecuencia están compuestas por un gran núcleo lipídico extracelular y un gran número de células espumosas, recubierto por una fina cubierta fibrosa susceptible de rotura(33). En esta situación, la vulnerabilidad de la placa en los puntos más frágiles (mayor número de células espumosas y capa fibrosa más delgada) es la causa de los eventos agudos.

Cuando se produce la rotura de la placa, tiene lugar una trombosis que oblitera la luz vascular, desencadenando los cuadros agudos. Debido a que, con frecuencia, antes de la rotura de la placa se ha neoforado circulación colateral, la clínica de la isquemia aguda es mejor tolerada que la que acontece cuando el cuadro de base de la isquemia aguda es de origen embólico.

#### *Extensión de la enfermedad*

La manifestación clínica de la EAP dependerá de manera decisiva del número de territorios afectados. Es frecuente que los sujetos con una vida sedentaria y afectación arterial en una única zona estén asintomáticos u oligosintomáticos. El lado contrario del espectro estaría formado por los individuos que presentan una enfermedad en varias localizaciones, en los que es frecuente la isquemia crítica.

#### *Correlación fisiopatológica-evolución de la enfermedad*

En la mayoría de las ocasiones, la evolución clínica de la EAP es bastante estable debido al desarrollo de circulación colateral, a la adaptación metabólica de las masas

musculares implicadas y al uso, muchas veces inconsciente, de grupos musculares no isquémicos. Se estima que sólo un 25% de los pacientes con claudicación experimentará un empeoramiento y evolucionará hacia la isquemia crítica, lo que suele ocurrir con más frecuencia después del primer año de diagnóstico(34). Si se excluye a los pacientes diabéticos, aún es menos frecuente que la EAP condicione la pérdida de la extremidad. En el estudio de Framingham (35) se encontró que menos de un 2% de los pacientes con EAP requirieron una amputación mayor. En pacientes con claudicación, el mejor predictor de progresión de enfermedad es el ITB. Los pacientes con un ITB < 0,5 tienen un riesgo dos veces superior de precisar una cirugía de revascularización o una amputación mayor, frente a los pacientes con ITB > 0,5. La presión arterial sistólica (PAS) medida en el tobillo también es un factor predictivo de progresión de la enfermedad que es mayor para los pacientes con valores < 50 mmHg. Sin embargo, hay que reseñar que los pacientes con diabetes, por su elevada prevalencia de calcificación en los vasos distales, pueden presentar valores de PAS anormalmente elevados en la zona maleolar, con índices incluso superiores a la unidad en presencia de EAP, por lo que estos dos parámetros tienen una validez limitada en la evaluación no invasiva.

Probablemente, uno de los aspectos más importantes en la valoración de los pacientes con EAP sea la identificación de los casos con un mayor riesgo de evolucionar a isquemia crítica y, por lo tanto, de perder la extremidad. En este sentido, es preciso remarcar que la presencia de varios factores de riesgo cardiovascular actúa de forma sinérgica, multiplicando el riesgo de pérdida de extremidad (36, 37). Cuando se analizan de forma individual se ha podido comprobar que la diabetes mellitus multiplica por 4 el riesgo de isquemia crítica, el tabaquismo lo hace por 3 y un ITB < 0,5 lo incrementa en 2,5 veces. Por ello, es de la mayor importancia realizar un diagnóstico lo más precoz

posible de la arteriopatía para iniciar una terapia de modificación de los factores de riesgo y, así, reducir el riesgo de progresión de la enfermedad.

#### 1.3.4 Enfermedad vascular coexistente con la enfermedad arterial periférica

La práctica clínica demuestra la afectación multisistémica de la enfermedad vascular y es frecuente comprobar la presencia de una enfermedad coronaria o cerebrovascular en los pacientes con enfermedad vascular. Diferentes estudios epidemiológicos han mostrado que hasta un 50% de los pacientes con EAP presenta síntomas de enfermedad cerebrovascular o cardiológica. En el estudio PARTNERS (38), del total de pacientes en los que se realizó el cribado de enfermedad vascular, sólo un 13% presentaba una EAP aislada, sin otra manifestación de enfermedad cardiovascular. En el 32% de los pacientes coexistía bien enfermedad coronaria, bien enfermedad cerebrovascular, y un 24% tenía afectación de los 3 territorios. Por otro lado, la principal causa de muerte tardía en los pacientes con EAP es la cardiopatía isquémica (hasta un 50% de las muertes en pacientes con EAP). A la inversa, la prevalencia de EAP en los pacientes diagnosticados de enfermedad coronaria llega a ser del 30%. En este grupo de pacientes, la mortalidad es 2,5 veces superior que la del grupo sin síntomas clínicos de EAP.

La asociación entre EAP e isquemia cerebrovascular no es tan prevalente como ocurre con la enfermedad coronaria. En algunos estudios en los que se analiza la presencia de estenosis carotídeas mediante estudio con eco-Doppler en los pacientes con EAP se ha mostrado una prevalencia de lesiones en esta localización de hasta el 50%. Sin embargo, sólo un 5% de los pacientes con EAP presentará un evento neurológico.

Por último, desde el punto de vista epidemiológico, es muy interesante la relación existente entre la afectación del ITB y la presencia de enfermedad vascular en otros territorios. Las variaciones en el ITB se han correlacionado con la gravedad y la

extensión de la enfermedad coronaria, así como con el índice íntima-media carotídeo. En estudios poblacionales se ha mostrado que por cada descenso de 0,1 en el ITB se produce una elevación del 10% en el riesgo de presentar un evento vascular mayor (39).

### 1.3.5 Clasificación

La sintomatología de los pacientes con isquemia arterial de las extremidades provocada por arteriopatía crónica se estratifica según la clasificación de Leriche-Fontaine . Esta clasificación agrupa a los pacientes que representan una isquemia arterial progresiva, en 4 estadios, y tiene valor pronóstico, por lo que es muy útil para la indicación de tratamiento.

El estadio I se caracteriza por la ausencia de síntomas. Incluye a los pacientes con enfermedad arterial pero sin repercusión clínica. Esto no debe asociarse con el hecho de una evolución benigna de la enfermedad. Es evidente que los pacientes con una lesión arterial oclusiva extensa en los miembros inferiores, con un hábito sedentario o incapacitados por una enfermedad osteoarticular o neurológica, no presentarán clínica de insuficiencia arterial. En estas situaciones, los pacientes pueden pasar a presentar una isquemia crítica, desde un estadio asintomático.

El estadio II se caracteriza por la presencia de claudicación intermitente. A su vez se divide en dos grupos. El *estadio IIa* incluye a los pacientes con claudicación no invalidante o a distancias largas. El *estadio IIb* se refiere a los pacientes con claudicaciones corta o invalidante para las actividades habituales.

La claudicación intermitente típica de los pacientes con EAP se define como la aparición de dolor en masas musculares provocado por la deambulación y que cede inmediatamente tras cesar el ejercicio. Debe reseñarse que el dolor se presenta siempre

en los mismos grupos musculares y tras recorrer una distancia similar, siempre que se mantenga la misma pendiente y velocidad de la marcha.

Una gran cantidad de pacientes refiere una sintomatología dolorosa en las extremidades en relación con la deambulación, pero no con la presencia de enfermedad arterial. Muchos de ellos tienen enfermedad muscular, osteoarticular o neurológica, y en ocasiones alguna de ellas coexiste con una enfermedad arterial obstructiva. En estas situaciones es de la mayor importancia establecer un correcto diagnóstico diferencial, que inicialmente será clínico y con posterioridad se confirmará con estudios no invasivos. En este sentido, la clínica de estos pacientes suele referirse a dolores articulares, en relación con el ejercicio, pero también durante la movilización pasiva de la extremidad. Cuando los síntomas se refieren a dolores musculares, éstos no suelen presentarse de forma sistemática en la misma localización, y en muchas ocasiones no se localizan en grupos musculares implicados en la marcha (glúteos, cuádriceps y gemelos). En estas claudicaciones no vasculares, el perímetro de marcha es muy variable incluso a lo largo del día. Por otro lado, el dolor no cede simplemente al detener la marcha, sino que el paciente precisa sentarse, acostarse o adoptar posturas especiales, y la sintomatología desaparece habitualmente tras un período de reposo mucho más largo que en la claudicación vascular.

El grupo muscular afectado durante la marcha tiene utilidad para conocer la localización de la lesión oclusiva. Aunque la mayoría de los pacientes referirá claudicación gemelar, la presencia de claudicación en las masas musculares glúteas o del muslo puede indicar la presencia de una enfermedad en el eje iliaco. La claudicación por enfermedad femoropoplítea se localiza de manera característica en las masas gemelares, y las oclusiones infrapoplíteas pueden manifestarse únicamente como claudicación en la planta del pie .

El *estadio III* constituye una fase de isquemia más avanzada y se caracteriza por presentar sintomatología en reposo. El síntoma predominante suele ser el dolor, aunque es frecuente que el paciente refiera parestesias e hipoestesia, habitualmente en el antepié y en los dedos del pie. Las parestesias en reposo pueden ser indistinguibles de las debidas a neuropatía diabética, si bien en este último caso suelen ser bilaterales, simétricas y con distribución «en calcetín». Una característica de este dolor es que mejora en reposo cuando el paciente coloca la extremidad en declive, por lo que muchos sacan la pierna de la cama o duermen en un sillón. Ésta es la causa de la aparición de edema distal en la extremidad debido al declive continuado. En el estadio III el paciente suele tener la extremidad fría y con un grado variable de palidez. Sin embargo, algunos pacientes con isquemia más intensa presentan una eritrosis del pie con el declive debido a vasodilatación cutánea extrema que se ha denominado lobster foot.

El *estadio IV* se caracteriza por la presencia de lesiones tróficas y es debido a la reducción crítica de la presión de perfusión distal, inadecuada para mantener el trofismo de los tejidos. Estas lesiones se localizan en las zonas más distales de la extremidad, habitualmente los dedos, aunque en ocasiones pueden presentarse en el maléolo o el talón. Suelen ser muy dolorosas, salvo en los pacientes diabéticos si hay una neuropatía asociada, y muy susceptibles a la infección.

La exploración básica del sistema arterial se basa en la valoración de la presencia de pulsos, que en la extremidad inferior incluirá la búsqueda en las arterias femoral, poplítea, pedia y tibial posterior. En caso de enfermedad oclusiva aortoiliaca, será evidente una disminución de todos los pulsos en la extremidad o una ausencia completa de éstos. En el caso de una enfermedad femoropoplítea, el pulso femoral estará presente, pero estará ausente en las arterias poplíteas y distales. La auscultación del

abdomen identificará la presencia de soplos, que serán indicativos de enfermedad en la aorta o las arterias ilíacas. La auscultación de la región inguinal puede poner de manifiesto la existencia de lesiones en la ilíaca externa o la bifurcación femoral. También es importante la evaluación de la temperatura, la coloración y el trofismo del pie. En los pacientes con claudicación no suele apreciarse una disminución en la temperatura o el relleno capilar. Sin embargo, la disminución de la temperatura y la palidez, con o sin cianosis o eritrosis de declive, son habituales en los pacientes con isquemia crítica. Por último, no debe olvidarse la exploración clínica de los miembros superiores y la auscultación cervical por la gran prevalencia de lesiones carótidas o de troncos supraaórticos, que en la mayoría de las ocasiones serán subclínicas.(39)

#### 1.4 ALPROSTADIL

La prostaglandina E1 (PGE1 ) se utiliza en el tratamiento sintomático de la arteriopatía oclusiva arterioesclerótica de miembros inferiores en estadios III y IV de Leriche-Fontaine, excluyendo los pacientes candidatos a amputación.

##### 1.4.1 Farmacología

##### 1.4.1 Propiedades Farmacocinéticas:

El alprostadil es una sustancia endógena con una vida media extremadamente corta. Tras la infusión intravenosa de 60 µg de SUGIRAN®/ 2 h en voluntarios sanos se detectaron concentraciones plasmáticas máximas de 5pg/ml por encima de los valores basales (valor basal 2-3 pg/ml). Tras cesar la infusión, las concentraciones plasmáticas vuelven a los valores basales en un tiempo estimado de 10 segundos. Debido a la breve

vida media, el estado de equilibrio de las concentraciones plasmáticas se alcanza rápidamente tras el comienzo de la infusión.

Como resultado de la biotransformación, se detectan en plasma 13,14-dihidro-alprostadil (PGE0) y 15-keto-PGE0 (13,14-dihidro-15-keto-PGE1).

Tras la infusión intravenosa de 60 µg / 2 horas se detectan en plasma niveles de PGE0 de 12 pg/ml por encima de los valores basales (valor basal:1-2 µg /ml). Los niveles plasmáticos de 15-keto-PGE0 fueron de 150 pg/ml por encima del valor basal de 8 pg/ml.

Las vidas medias fueron de 1 minuto (fase α) y 30 minutos (fase β) para la PGE0 y de 1 minuto y 16 minutos respectivamente para la 15-keto-PGE0.

El alprostadil sufre biotransformación predominantemente en los pulmones. Durante el primer paso por los pulmones el 60-90% es metabolizado. Los principales metabolitos (15-keto-PGE1, PGE0 y 15-keto-PGE0) se producen por oxidación enzimática del grupo C15-OH seguida de una reducción del doble enlace C13,14.

El 15-keto-PGE1 solamente se ha podido detectar en preparaciones in vitro de homogeneizado de pulmón, mientras que PGE0 y 15-keto-PGE0 se han encontrado en el plasma.

Tras la degradación por β-oxidación y ω-oxidación, los principales metabolitos se eliminan por orina (88%) y por heces (12%) en 72 horas.

Tras la infusión, es rápidamente metabolizado, principalmente a nivel pulmonar (un 60-90% se metaboliza durante el primer paso por pulmones), careciendo sus metabolitos de actividad farmacológica, siendo eliminados mayoritariamente con la orina (88%) y el 12% restante por heces. Su semivida de eliminación es de 5 min (aumenta en insuficiencia respiratoria grave). Su unión a proteínas plasmáticas es del 93%. de la PGE1 .

La  $\alpha$ -ciclodextrina tiene una vida media de alrededor de 7 minutos. Se elimina de forma inalterada por vía renal.(40)

#### 1.4.2 Mecanismo de acción

##### 1.4.2.1 Propiedades farmacodinámicas

La prostaglandina E1 (alprostadil) tiene propiedades hemodinámicas y acción antiagregante plaquetaria que fundamentan su uso en el tratamiento de la enfermedad vascular periférica severa.

##### Efecto sobre la musculatura vascular lisa:

Tras la administración de PGE1 por vía intraarterial a dosis de 0,1 ng/Kg/min, se ha observado un aumento del flujo sanguíneo en el músculo tibial anterior de pacientes con oclusión arterial crónica.

En pacientes con oclusión arterial crónica, la infusión intravenosa de PGE1 a dosis de 5-8 ng/Kg/min produce un incremento del flujo a nivel de la arteria pedia y tibial posterior.(40)

##### Efecto inhibidor de la agregación plaquetaria:

La prostaglandina E1 inhibe la agregación plaquetaria humana causada por varios coagulantes.

In vitro, la concentración inhibitoria 50 de la PGE1 sobre la agregación inducida por ADP trombina y colágeno fue de 19, 3 y 61 ng/ml, respectivamente.

En pacientes con oclusión arterial periférica, la infusión intraarterial de PGE1 a dosis de 0,1-1 ng/Kg/min inhibe la agregabilidad plaquetaria de la sangre venosa local.

En pacientes con enfermedad arterial oclusiva crónica, la infusión intravenosa de PGE1 a dosis de 5-10 ng/kg/min inhibe la agregabilidad plaquetaria.

Alprostadil, administrado por infusión intraarterial o intravenosa continua, dilata el ductus arterioso en recién nacidos. En el 74% de 238 niños con defectos congénitos, que disminuían el flujo circulatorio sanguíneo pulmonar o sistémico, se obtuvo un incremento de la circulación sanguínea a través del ductus arterioso.

Alprostadil incrementó en promedio la presión arterial de oxígeno (PO<sub>2</sub>) a 14,02 mm Hg y un 23% la saturación de oxígeno en niños con defectos congénitos que disminuían la circulación pulmonar sanguínea. La relación entre presión sanguínea de arteria pulmonar y aórtica, disminuye durante la infusión de Alprostadil en el 87% de los recién nacidos con defectos congénitos que restringían la circulación sanguínea sistémica. La presión sanguínea sistémica y el pH sanguíneo son incrementados.

Su mecanismo de acción no está determinado, pero Alprostadil posiblemente ayuda a mantener la apertura del ductus mediante disminución del tono del músculo liso del ductus.

En animales de laboratorio y en humanos, dosis elevadas de prostaglandinas pueden disminuir la presión sanguínea, probablemente por un efecto miorelajante de la musculatura lisa del sistema vascular; este efecto no ha sido clínicamente significativo con las dosis de Alprostadil utilizadas para mantener la apertura del ductus.

Alprostadil puede también elevar la temperatura corporal.

En el tratamiento del conducto arterioso persistente, mantiene abierto el conducto al relajar sus músculos lisos, es sólo efectivo antes de que tenga lugar por completo el cierre anatómico del conducto arterioso.

La administración de alprostadil en neonatos con defectos congénitos cianóticos cardíacos (flujo pulmonar reducido) ocasiona aumento del flujo de sangre pulmonar con

el correspondiente aumento de la presión parcial arterial de oxígeno (PaO<sub>2</sub>) y de la saturación de O<sub>2</sub>. La respuesta del neonato cianótico al tratamiento con alprostadil está inversamente relacionada con la PaO<sub>2</sub> inicial. Las mejores respuestas aparecen en los neonatos mediante valores más bajos de la PaO<sub>2</sub> (< 20 Torr) y con menos de 4 días de edad. Los neonatos con PaO<sub>2</sub> de 40 Torr o más usualmente muestran mala respuesta al alprostadil; los que presentan restricciones en el flujo sistémico, la administración de alprostadil previene o corrige la acidemia, aumenta el gasto cardíaco, aumenta el flujo y la función renales y, en general, mejora todos los parámetros hemodinámicos.

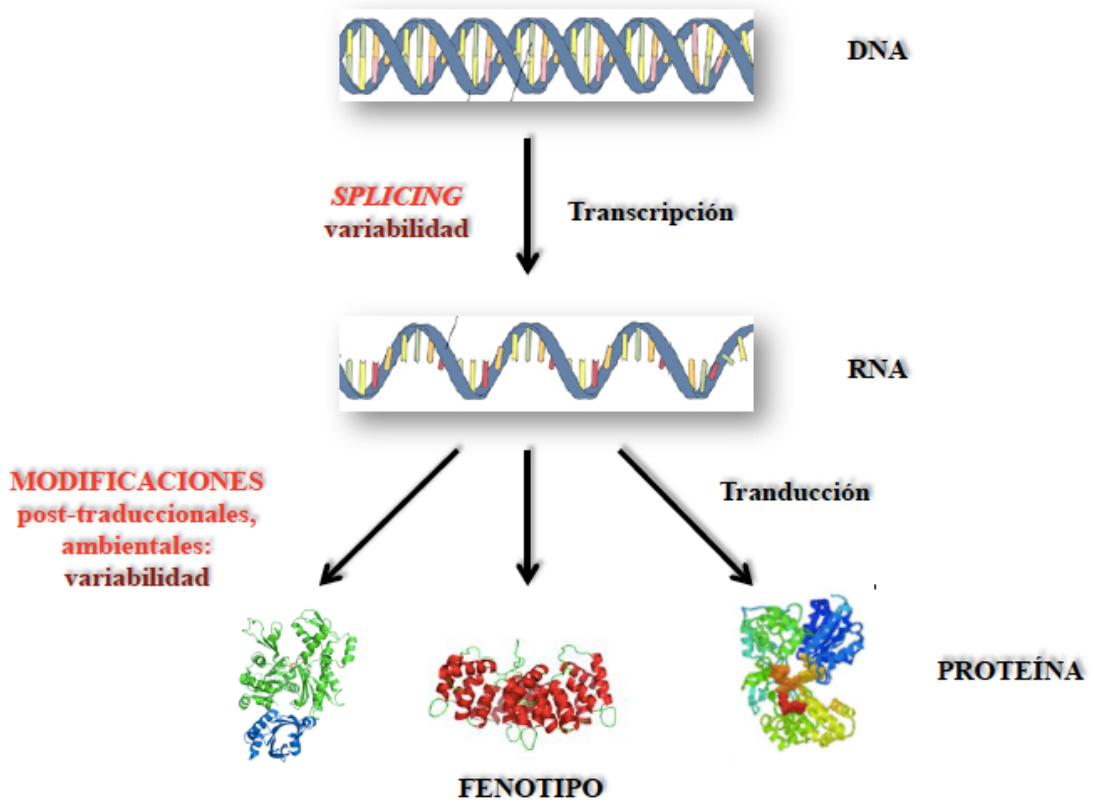
En la impotencia, el alprostadil relaja los músculos lisos del cuerpo cavernoso, al parecer aumenta las concentraciones intracelulares de AMP-cíclico. Interacciona con receptores de membrana que estimulan la adenilatociclasa que aumentan los niveles intracelulares de AMP-cíclico y activa la proteína quinasa, lo cual implica relajación muscular; también antagoniza los efectos vasoconstrictores de la norepinefrina, previene la liberación neuronal de este transmisor y exalta los efectos de los neurotransmisores vasodilatadores no adrenérgicos y no colinérgicos. En la impotencia induce la erección, relajando el músculo trabecular y dilatando las arterias cavernosas y sus ramas; esta dilatación está acompañada por aumento del flujo arterial, al mismo tiempo que se incrementa la resistencia venosa de retorno. Como resultado, los espacios lagunares se expanden y se llenan de sangre, por lo que queda atrapada por la compresión de las venas contra la túnica albugínea. El alprostadil no interfiere directamente con la eyaculación o el orgasmo.

## 1.5 PROTEÓMICA

La proteómica es una técnica que permite el estudio a gran escala de las proteínas de una muestra, constituyendo uno de los más útiles y potentes métodos de separación de

proteínas que existe actualmente. El término proteómica fue introducido por Marc R. Wilkins para hacer referencia al conjunto de proteínas identificadas mediante 2-DE en una muestra biológica compleja en un momento determinado(41). La tecnología utilizada para la separación de las proteínas es relativamente reciente: en la década de los 70 la electroforesis en dos dimensiones se utilizaba como una potente herramienta para la separación y cuantificación de proteínas(42). Su alta resolución, su sensibilidad y reproducibilidad hicieron a esta técnica cada vez más popular en la década de los 80, principalmente tras la aparición de las membranas PVDF (del inglés polyvinylidene difluoride) (43) y la creación de la primera base de datos para geles bidimensionales. Posteriormente, con la aparición y mejora de diversos métodos de preparación y extracción de proteínas de la muestra, así como de las distintas herramientas de secuenciación (método de secuenciación EDMAN (44), comenzó a tener una mayor importancia como método de análisis de las proteínas presentes en los distintos tipos de muestras.

El proteoma de un organismo es el conjunto de proteínas complementarias del genoma funcional. El proteoma es altamente dinámico, varía acorde al tipo de célula y su estado funcional y puede reflejar cambios inmediatos y característicos en respuesta a determinadas enfermedades o estímulos externos. Este conjunto de proteínas presentes en un fluido corporal, un tejido o un organismo en realidad es un subconjunto de todos los posibles productos del genoma en un momento dado, por lo que el proteoma no puede predecirse directamente a partir de la información estática del genoma. Una proteína puede existir en múltiples formas según modificaciones postraduccionales o procesos de degradación que modifican la estructura de la misma, su localización, función y recambio (*Fig. 1.10*).



**Figura 1.10.** Esquema en el que se muestran los diferentes pasos en la expresión de proteínas y su variabilidad.

Las proteínas desempeñan un papel fundamental para la vida y son las biomoléculas más versátiles y más diversas. Se considera que en el ser humano hay entre seis y siete veces más proteínas que genes (entre 200.000 y 250.000 proteínas). Las proteínas, a diferencia de los genes, tienen una complejidad y variabilidad mayores. Dado que poseen una función estructural, enzimática, inmunológica, contráctil, homeostática, transductora de señales, etc, son indispensables para todas las funciones biológicas. Por

ello, la investigación centrada en estos productos derivados del genoma, modificables en condiciones de enfermedad, es fundamental y probablemente nos permitirá entender la fisiopatología de enfermedades tan prevalentes como la arteriosclerosis.

En el momento actual nos encontramos en la era postgenómica, en la que la proteómica va a contribuir al entendimiento de la función de los genes(45). Precisamente porque frecuentemente es difícil predecir la función de una proteína basándose en la homología con otras proteínas, e incluso su estructura tridimensional, la determinación de los componentes de un complejo proteico o de una estructura celular es primordial en el análisis funcional. En este sentido, la proteómica es la tecnología más prometedora para avanzar en este área de interés. La integración genómica-proteómica permitirá comprender los mecanismos implicados en la aparición y desarrollo de una enfermedad.

Se estima que el genoma humano contiene entre 20.000 y 25.000 genes codificantes de proteínas, número muy inferior a las estimaciones iniciales. Sin embargo, las células humanas recurren ampliamente al splicing y a las modificaciones postraduccionales para producir varias proteínas distintas a partir de un único gen (46- 48),. De forma práctica, el genoma tan solo porta la información necesaria para una expresión perfectamente coordinada y regulada del conjunto de proteínas que conforman el proteoma. Mientras que el genoma es relativamente constante (incluso podría considerarse un componente estático de la célula), el proteoma está continuamente cambiando, muchas veces simplemente por la interacción del genoma con el entorno. Todas estas modificaciones y otros cambios secundarios a estímulos ambientales (enfermedades, fármacos...) condicionan el desarrollo de diferentes mapas de expresión proteica, o lo que es lo

mismo, diferentes fenotipos (*Fig. 1.10*), que, a su vez, proporcionan una gran diversidad y diferente susceptibilidad a determinadas enfermedades.

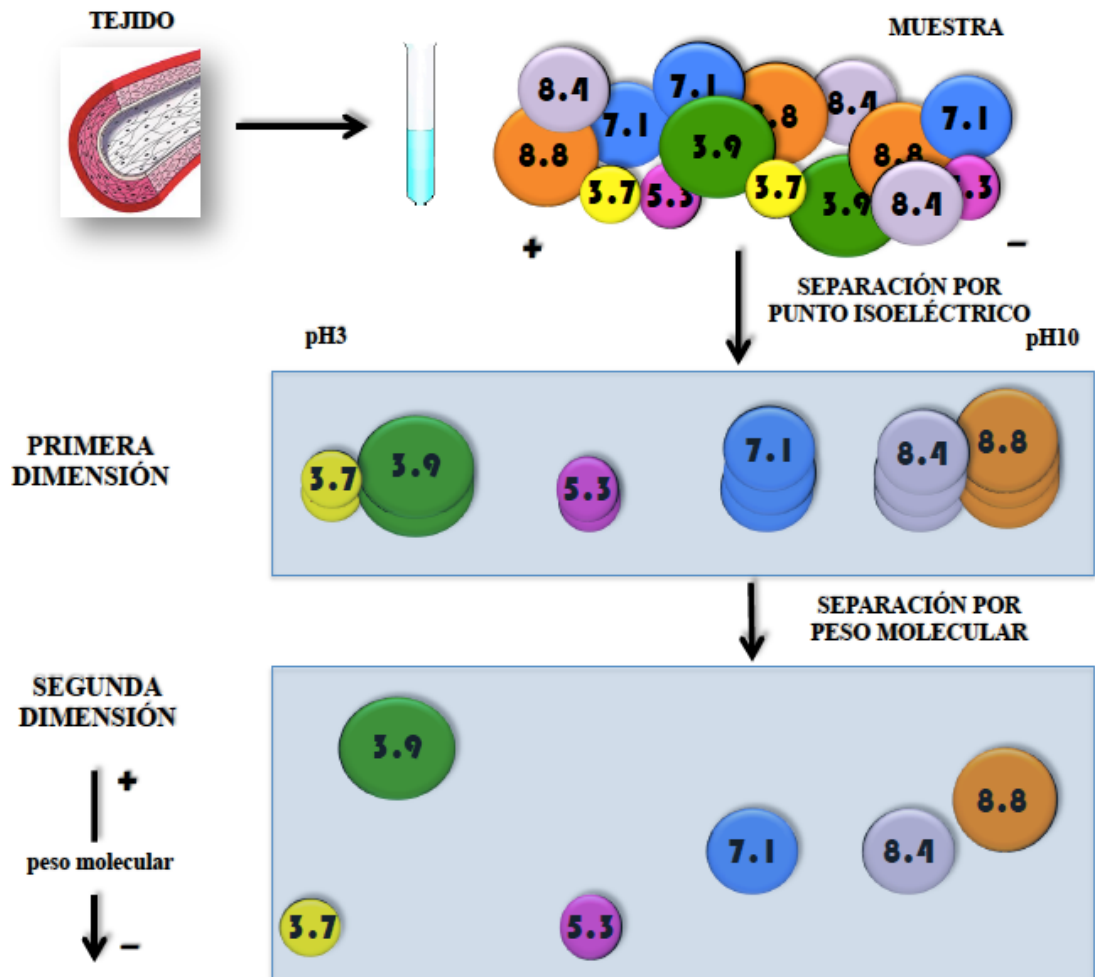
La proteómica utiliza la combinación de diferentes técnicas sofisticadas, incluyendo la 2-DE en gel de poliacrilamida, análisis de imagen, espectrometría de masas, secuenciación de aminoácidos y bioinformática para separar, identificar y caracterizar las proteínas (49). Con todo ello, la proteómica permite la obtención de una información cualitativa y cuantitativa: es posible determinar la existencia o no de una proteína y, además, cambios cuantitativos en su expresión comparando los resultados en la muestra basal y tras un estímulo o condición patológica, por ejemplo. Otra ventaja de esta técnica es la capacidad de detectar las distintas isoformas de una misma proteína (derivadas de las distintas modificaciones bioquímicas postraduccionales), circunstancia que no es posible utilizando el resto de técnicas de análisis e identificación de proteínas. Este punto es de gran importancia, ya que es posible que las isoformas de una determinada proteína tengan propiedades funcionales distintas a las de la proteína original.

La proteómica, sin embargo, va más allá de la mera catalogación de proteínas, pretendiendo establecer, en último término, su estructura, actividad biológica, modo de acción, localización celular, modificaciones postraduccionales e interacción con otras proteínas o moléculas. De esta manera, la comprensión de las situaciones fisiológicas nos permiten acercarnos al conocimiento de las condiciones patológicas. Desde un punto de vista práctico son muchas las aplicaciones que se pueden vislumbrar en diversos terrenos científicos y biotecnológicos, pero la aplicación más llamativa (y con más impacto comercial) es el descubrimiento de fármacos, el diagnóstico molecular y la

medicina personalizada. De hecho, este aspecto de la proteómica está haciendo que la industria farmacéutica invierta grandes cantidades en el desarrollo de esta metodología y se esté avanzando rápidamente. Finalmente, se buscará construir un completo mapa tridimensional celular, con la localización de cada proteína y los procesos o cambios a los que pueden verse sometidas, ayudándonos todo ello a la mejor comprensión de los mecanismos moleculares implicados en cualquier proceso metabólico o patológico.

### 1.5.1 Fundamentos de la técnica

La electroforesis bidimensional (2-DE, del inglés 2-dimensional electrophoresis) es la base fundamental para desarrollar los mapas de expresión proteica. A pesar de que el nombre sugiere que se trata de un proceso de dos pasos, en realidad es algo más complejo e, incluso, pueden considerarse hasta cinco pasos: 1, la preparación de la muestra para la primera separación; 2, la primera separación de la muestra; 3, la interfase entre la primera y segunda separación; 4, la segunda separación; 5, la detección de proteínas. Esta técnica nos permite separar las proteínas de cualquier muestra en dos dimensiones, el peso molecular (tamaño) y el punto isoelectrico (pH en el cual la carga neta de la proteína es cero), lo que dará lugar a un mapa de expresión proteica en el que cada proteína (y sus isoformas) estarán distribuidas en la coordenada formada por las dos variables de separación. En principio, esta coordenada será única para cada proteína, por lo que puede considerarse como el documento de identidad de la misma (50). El concepto básico de la técnica se esquematiza en la *Figura 1.11*.



*Figura 1.11. Esquema del principio de la electroforesis bidimensional.*

El proceso comienza con la extracción de las proteínas desde la muestra biológica. Dicha muestra es separada en dos dimensiones, primero por punto isoelectrico y segundo por peso molecular.

Generalmente, el orden de separación es primero por el punto isoelectrico y posteriormente por el peso molecular. Sin embargo, este esquema de actuación no es obligatorio, y se han publicado trabajos con el orden inverso(51,52). Realmente, el

orden clásico es el que casi exclusivamente se realiza, tanto por motivos económicos (la segunda y mayor separación es mejor que sea la más barata, como lo es la electroforesis SDS) y por razones técnicas, ya que los geles SDS de electroforesis son mucho más fáciles de teñir que los isoelectrónicos y de manejar en las técnicas de análisis (53).

Esta técnica posibilita la identificación de proteínas que hayan sufrido algún tipo de modificación postraduccional, ya que cuando una proteína sufre una modificación postraduccional (fosforilación, glicosilación, etc.) ésta suele conferirle un cambio tanto de carga como de peso molecular. Los cambios que ocurren tras la traducción son, por tanto, reflejados en el mapa proteico, apareciendo la proteína en una localización distinta a la normal.

#### 1.5.1.1. Preparación de las muestras

La situación ideal consiste en solubilizar todas las proteínas de la muestra, sin ninguna modificación añadida durante todo el proceso y eliminando otros componentes biológicos que puedan interferir en la separación de las proteínas. La carga de proteínas que contiene la muestra no debe alterarse en ningún momento, por lo que se deben utilizar sustancias químicas no cargadas que desnaturalicen las proteínas y las mantengan en solución (54). Por razones prácticas, como constituye una mínima interferencia con los geles que contienen el SDS unido a las proteínas y una mínima interferencia con los métodos de ensayo, el detergente CHAPS es de los más utilizados (55).

Otro punto de gran importancia es que para conseguir el punto isoeléctrico se requieren campos eléctricos de gran fuerza. Dado que la carga de las proteínas constantemente va disminuyendo hasta alcanzar el punto isoeléctrico, se requieren estos campos potentes para que en los últimos milímetros las proteínas migren a una velocidad decente. De hecho, es muy común utilizar hasta 170 V/cm en el punto isoeléctrico, números mucho mayores que los empleados en la electroforesis SDS (15 V/cm). En contrapartida, la utilización de estos campos de gran fuerza obliga a trabajar con muy bajas fuerzas iónicas, por el calentamiento.

#### 1.5.1.2. Primera dimensión

En comparación con la fase de preparación de las muestras, la separación por punto isoeléctrico en la primera dimensión generalmente es más sencilla. Para esta fase se utilizan tiras de gel de poliacrilamida con un gradiente de pH inmovilizado (IPG, del inglés Isoelectric Phocusing Gradient). La introducción de los IPG por Bjellqvist et al (56) tuvo un impacto significativo en la primera dimensión de la electroforesis para separar mezclas complejas en un amplio rango de pH. Estos geles permiten una formación estable y reproducible de gradientes de pH capaz de focalizar proteínas ácidas y básicas en un único gel (57).

En la primera dimensión se aplica una corriente eléctrica que consigue que las proteínas presentes en el extracto migren a lo largo de la tira IPG y se distribuyan por toda su longitud hasta alcanzar su punto isoeléctrico, es decir, el punto donde su carga neta sea cero, y en ese momento se detienen. Así pues, en la primera dimensión las proteínas se separan según carga (*Fig. 1.11*).

### 1.5.1.3. Segunda dimensión

La segunda dimensión se realiza sobre geles SDS-PAGE (del inglés sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) para la separación de las proteínas en función de su peso molecular (*Fig. 1.11*). El SDS es un detergente aniónico utilizado para alinear las proteínas y aplicar una carga negativa a cada proteína proporcional a su masa. La realización de esta segunda dimensión aporta la identificación de nuevas proteínas y, además, la medición de la abundancia relativa comparando entre diferentes muestras.

### 1.5.1.4. Detección de las proteínas

Una vez realizada la segunda dimensión, las proteínas presentes en el gel deben visualizarse para poder cuantificarlas y analizarlas. Existen distintos tipos de tinción del gel que, fundamentalmente, se diferencian según la sensibilidad para la detección de proteínas. Destacan la tinción con azul Coomassie, la tinción radiactiva, la fluorescente y, por último, la tinción con nitrato de plata. Los métodos más empleados son la tinción con plata y con el azul de Coomassie (58), en especial la primera por su sensibilidad (59,60), su durabilidad en el tiempo y la buena calidad de imagen que ofrece. Además, este tipo de tinción es compatible con el análisis por espectrometría de masas. Sin embargo, el método más recomendado de tinción para realizar la identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas es el azul de Coomassie, ya que, a pesar de su moderada sensibilidad, tiene buena homogeneidad y la compatibilidad con la espectrometría es excelente (61).

### 1.5.2. Análisis de la imagen

Una vez obtenido el gel bidimensional o mapa de expresión proteica hay que analizar la imagen. Actualmente poseemos programas informáticos (PD-QUEST, MELANIE, etc.) que facilitan mucho el estudio de este tipo de imágenes. De hecho, este software realiza un análisis completo de los mapas de expresión proteica y permite una posterior comparación entre diferentes mapas. Adicionalmente, existe la posibilidad de realizar comparaciones visuales con mapas proteómicos integrados en bases de datos disponibles en internet. En este sentido, la base de datos suiza Swiss-Prot (<http://www.expasy.ch>) es una de las más conocidas y empleadas (Fig. 1.12).

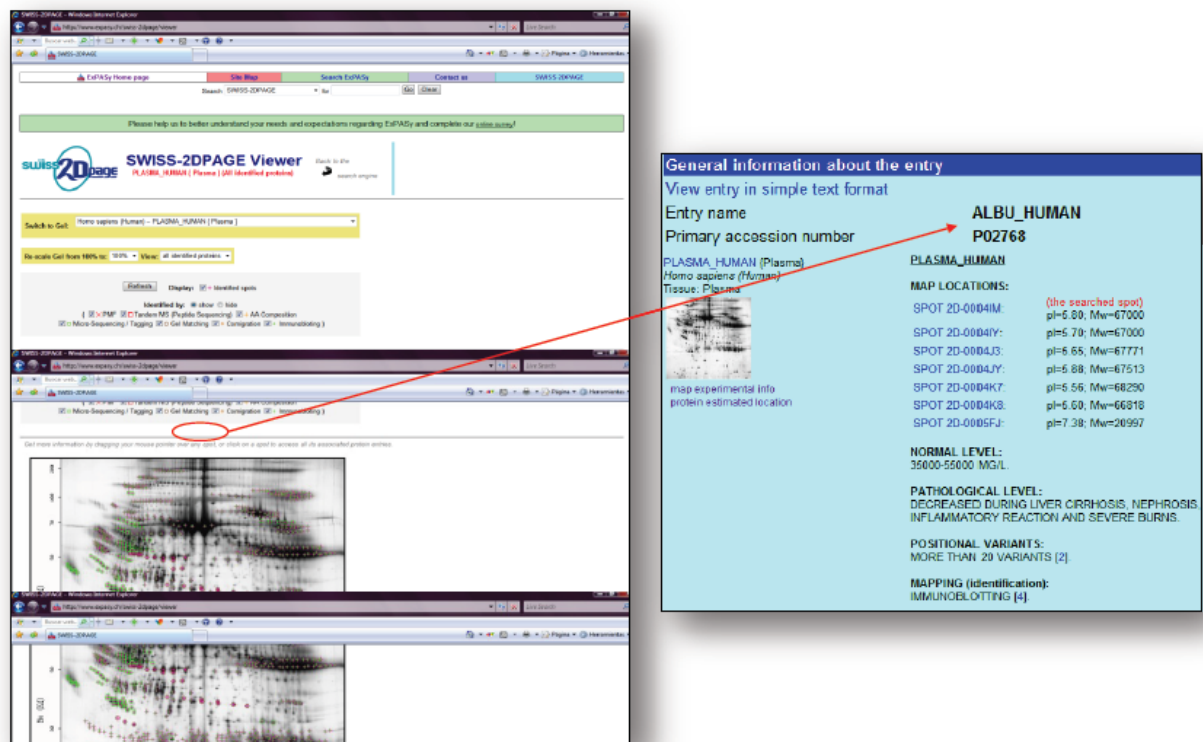


Figura 1.12. Ejemplo de ventanas utilizando la base de datos Swiss-Prot.

Para el análisis cuantitativo de las diferentes proteínas del mapa proteómico disponemos de otras herramientas informáticas que facilitan la detección de variaciones en la expresión de las proteínas, siendo de especial utilidad en estudios patológicos. Un ejemplo es el programa denominado QUANTITY-ONE (Bio-Rad Laboratories).

### 1.5.3. Espectrometría de masas

La aplicación de la espectrometría de masas (MS) para el análisis cuantitativo y cualitativo del proteoma derivado de muestras complejas ha tenido un gran impacto en la comprensión de la función celular (62). Hoy en día se estima que mediante esta técnica se pueden detectar proteínas en geles bidimensionales en el rango femtomolar (10-15 M/L). La MS es muy sensible, tolera el análisis de mezclas proteicas y permite la realización de múltiples análisis, por lo que poco a poco ha reemplazado a la secuenciación por el método de EDMAN.

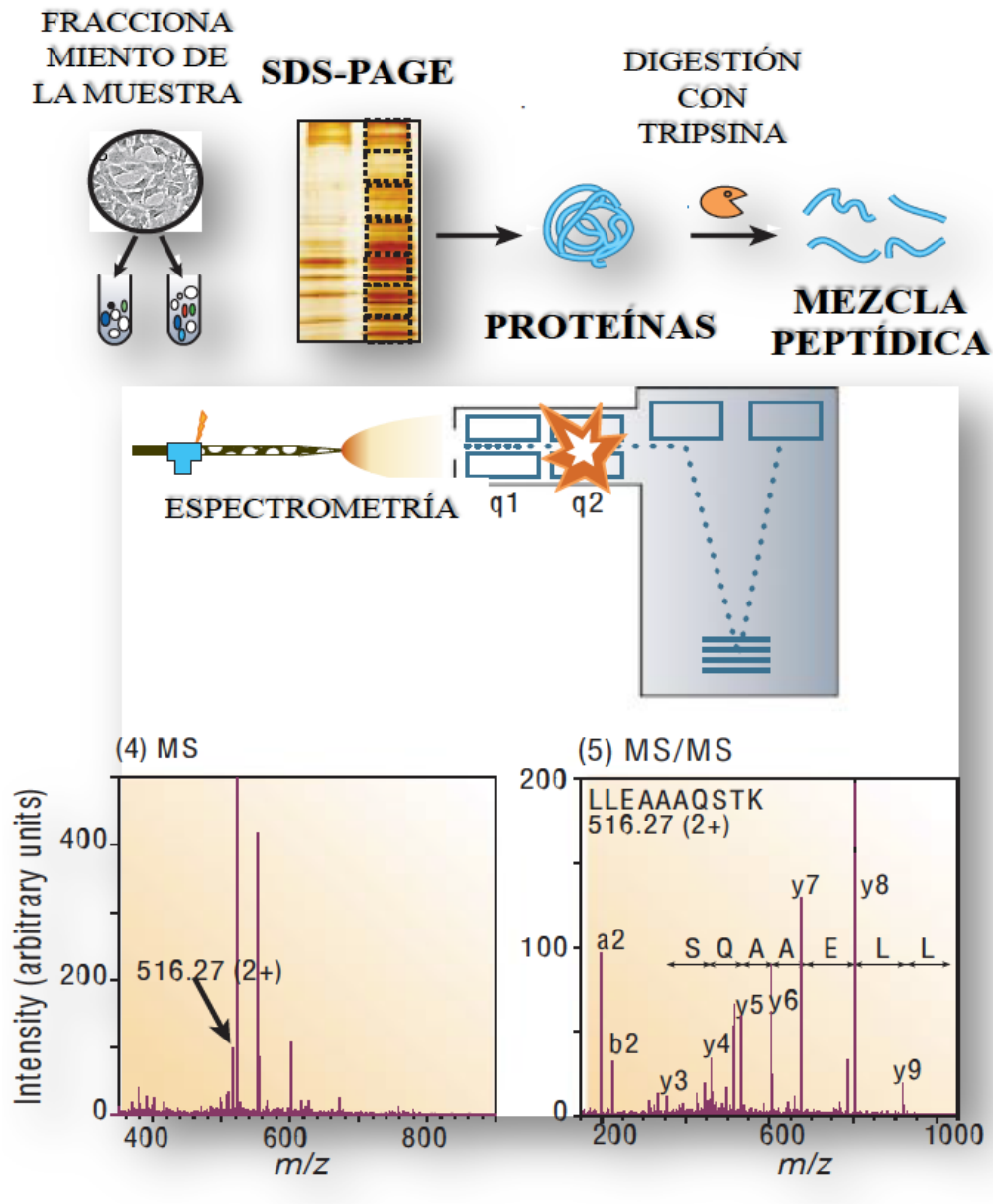
La MS proporciona información sobre la estructura de la proteína: la masa peptídica y la secuencia de aminoácidos. Posteriormente, se utilizarán estos datos para identificarlas con las bases de datos. De esta manera, se determina el tipo y la localización de una modificación postransduccional, por ejemplo.

Las mediciones en la MS se llevan a cabo en fase gaseosa, con los analitos ionizados. Por definición, un espectrómetro de masas consiste en una fuente ionizante, un analizador de masa, que mide la ratio masa/carga ( $m/z$ ) de los analitos, y un detector que registra el número de iones en cada valor de  $m/z$ . Las dos técnicas más utilizadas son las llamadas ESI (del inglés, ElectroSpray Ionization) y MALDI (del inglés, Matrix-

Assisted Laser Desorption/Ionization) (63,64). El analizador de masa es la tecnología fundamental del instrumento y en el terreno de la proteómica sus claves son la sensibilidad, la resolución, la precisión en la medida de la masa y la capacidad de generar espectros a partir de fragmentos peptídicos (en tándem o espectros MS/MS) (65,66). Hay cuatro tipos básicos de analizadores de masa utilizados actualmente en proteómica: la trampa de iones (ion trap), el tiempo de vuelo o TOF (del inglés, time of flight), el cuádruplo y el FT-MS (del inglés, Fourier Transform ion cyclotron). Cada uno de ellos es diferente, variando en relación a su fuerza. Por lo general, MALDI se utiliza conjuntamente con analizadores TOF (MALDI-TOF) por su simplicidad, la precisión en la medición de la masa y su sensibilidad. Con este último método se obtiene la llamada huella peptídica como resultado del emparejamiento de la lista de masas experimentales con la lista de masas calculadas de todos los péptidos de una base de datos.

El proceso habitual consta de cuatro pasos. El primer paso consiste en el aislamiento de las proteínas de la muestra. La MS es menos sensible en el análisis de toda la proteína que en el estudio de los péptidos y, además, la masa de una proteína intacta por sí sola no es suficiente para su identificación. Por ello, las proteínas son degradadas en el segundo paso, generalmente con tripsina, que rompe dichas proteínas en la zona carboxílica de los residuos de lisina y arginina (a no ser que estén seguidos por una prolina), formando huellas peptídicas de péptidos predecibles. En el tercer paso los péptidos son ionizados tras el tratamiento con el láser, que les confiere una carga, y son separados según la ratio  $m/z$ . En el cuarto paso se obtiene el espectro de masas de péptidos y el ordenador genera una lista priorizada de estos péptidos por fragmentación y una serie de experimentos en tándem posteriores, que consisten en el aislamiento de

un péptido dado, fragmentación por colisión con gas y recopilación de un espectro tándem o MS/MS (Fig. 1.13).



**Figura 1.13.** Esquema de un experimento genérico de proteómica basado en la espectrometría de masas. Fuente: internet, modificada por el autor.

#### 1.5.4. Futuro de la proteómica

Después de más de tres décadas de investigación en este campo, la 2-DE es ya una técnica madura, que ofrece gran flexibilidad y resolución modulable (67). Por tanto, no son esperables grandes avances en la pura realización de la electroforesis. Sin embargo, en un futuro sí podrán objetivarse importantes consecuencias en el diagnóstico clínico y tratamientos derivados de la proteómica.

El objetivo último de la medicina moderna es poder ofrecer una medicina personalizada a cada paciente. Actualmente, el centro de muchas investigaciones va dirigido a conocer la etiología de la enfermedad en cada paciente, la respuesta concreta de cada paciente a un determinado factor de riesgo, los factores que facilitan la progresión de la enfermedad, los factores genéticos que hacen a ese paciente susceptible a una enfermedad, su perfil metabólico y, concretamente, cuáles son las proteínas que expresa, para poder así identificar el pronóstico del paciente y su susceptibilidad al tratamiento. Estos objetivos requieren de la utilización de nuevas tecnologías, entre las que se encuentra la proteómica, ya que estudia la base biológica racional, los productos de la interrelación entre unos determinados factores de riesgo y la expresión génica: las proteínas.

#### 1.5.5. La era proteómica en la investigación vascular

Las enfermedades cardiovasculares son la causa más importante de mortalidad en el mundo occidental y, además, se está produciendo un incremento progresivo también en las sociedades menos desarrolladas. La carga económica de estas enfermedades,

incluyendo los gastos en cuidado de la salud y las pérdidas en productividad, se ha calculado en 45.6 billones de euros anuales en la Unión Europea (68) y de 142.5 billones de dólares en Estados Unidos (69).

La proteómica aplicada a las células vasculares o a las placas arterioscleróticas, cuya expresión proteica se modifica a lo largo de la evolución de la enfermedad, constituyen hoy en día una diana en la investigación en el área cardiovascular, siendo en este terreno una técnica de aplicación relativamente reciente. La mayoría de los estudios proteómicos realizados inicialmente en las enfermedades cardiovasculares consistieron fundamentalmente en modelos descriptivos y han permitido la creación de las bases de datos de las que disponemos. Brunnel et al (70) publicaron el mapa de expresión proteica de CE de vena umbilical humana, en el que identificaron 53 proteínas relacionadas con el citoesqueleto, coagulación, apoptosis, presentación de antígenos y funciones enzimáticas. Del mismo modo, en 2001, McGregor et al (71) describieron el proteoma de las CML de la vena safena humana sana, identificando 130 proteínas. Más recientemente, se publicó también el proteoma de 83 proteínas de las CML de la arteria mamaria interna (72). Progresivamente, la proteómica vascular ha ido evolucionando para intentar proporcionar dos tipos de datos: la determinación de proteínas que participan activamente en la fisiopatología de la arteriosclerosis y la búsqueda de nuevas proteínas que potencialmente sirvan como biomarcadores de enfermedad (73). De hecho, la tendencia es utilizar la proteómica para la comparación de los niveles de expresión de una determinada proteína en diferentes condiciones experimentales. Hace más de 20 años Stastny et al (74) compararon extractos de estría grasa con segmentos de íntima sana de aorta humana. Esta comparación se realizó de forma visual, ya que en

esa época todavía no había programas informáticos para el análisis de los geles, por lo que sólo se identificaron los cambios más evidentes.

En la arteriosclerosis se considera fundamental la disfunción endotelial y la proliferación y migración de las CML. Por otro lado, todo ello ocurre en un marco inflamatorio, en el que factores de crecimiento y citoquinas están involucrados en los cambios de expresión de determinadas proteínas específicas. Este es el caso del TNF- $\alpha$ , citoquina implicada en diferentes procesos críticos de la iniciación y la progresión de la lesión vascular. La utilización de este mediador inflamatorio en cultivos de arterias sanas puede inducir cambios inflamatorios en la pared vascular, modificando por tanto la expresión proteica. Un estudio reciente (75) demostró, utilizando la 2D-E y MS, que la incubación de CML con TNF- $\alpha$  conducía a la infraexpresión o sobreexpresión de determinadas proteínas. Zamorano-León et al (76) observaron en segmentos preincubados con TNF- $\alpha$  una mayor expresión de moléculas proinflamatorias (CD40L, PECAM) en el endotelio y una sobreexpresión de la eNOS concentración dependiente.

Otros autores han centrado sus investigaciones en los mecanismos de señalización celular. Molero et al (77) demostraron modificaciones en la expresión proteica en células de músculo liso vascular inducidas por el 17 $\beta$ -estradiol, confirmando que los estrógenos pueden modular un amplio rango de vías de señalización en este tipo de células. Soskic et al (78) estudiaron los cambios en la vía de señalización de fibroblastos de ratón en respuesta al factor de crecimiento derivado de plaquetas.

La información que puede aportar la proteómica en la búsqueda de nuevos biomarcadores en las enfermedades cardiovasculares, sumada al análisis del fenotipo

clínico, cambios metabólicos y al haplotipo genético, puede informar del perfil de riesgo cardiovascular para cada paciente (79,80). Sin embargo, actualmente a nivel cardiovascular la identificación de las modificaciones postraduccionales es prácticamente nula y menos aún se sabe sobre modificaciones en el nivel de expresión de diferentes isoformas de proteínas.

Probablemente, con la introducción de la proteómica, en pocos años el conocimiento de las enfermedades cardiovasculares aumente de forma considerable. En resumen, la proteómica tiene el potencial de revolucionar el modo de diagnosticar, determinar el riesgo y el pronóstico clínico así como las estrategias terapéuticas en individuos con enfermedades cardiovasculares. Incluso ya se ha creado el término farmacoproteómica, que consiste en el estudio de la respuesta farmacológica de un paciente en función de las proteínas que expresa. Sin embargo, todavía no hay muchos estudios que analicen los efectos de los fármacos en el proteoma (81,82,).

#### 1.6 MARCADORES DE APOPTOSIS

El término apoptosis procede del griego “appo-toe-sis”, e indica la caída de las hojas de un árbol o de los pétalos de una flor. Designa el proceso de muerte celular programada, es decir, un tipo de necrosis fisiológica por el que determinados estímulos van a activar un programa genético para llevar a cabo una serie de acciones que finalizan con la muerte celular, sin alteraciones en la fisiología o estructura del tejido del que forma parte (83).

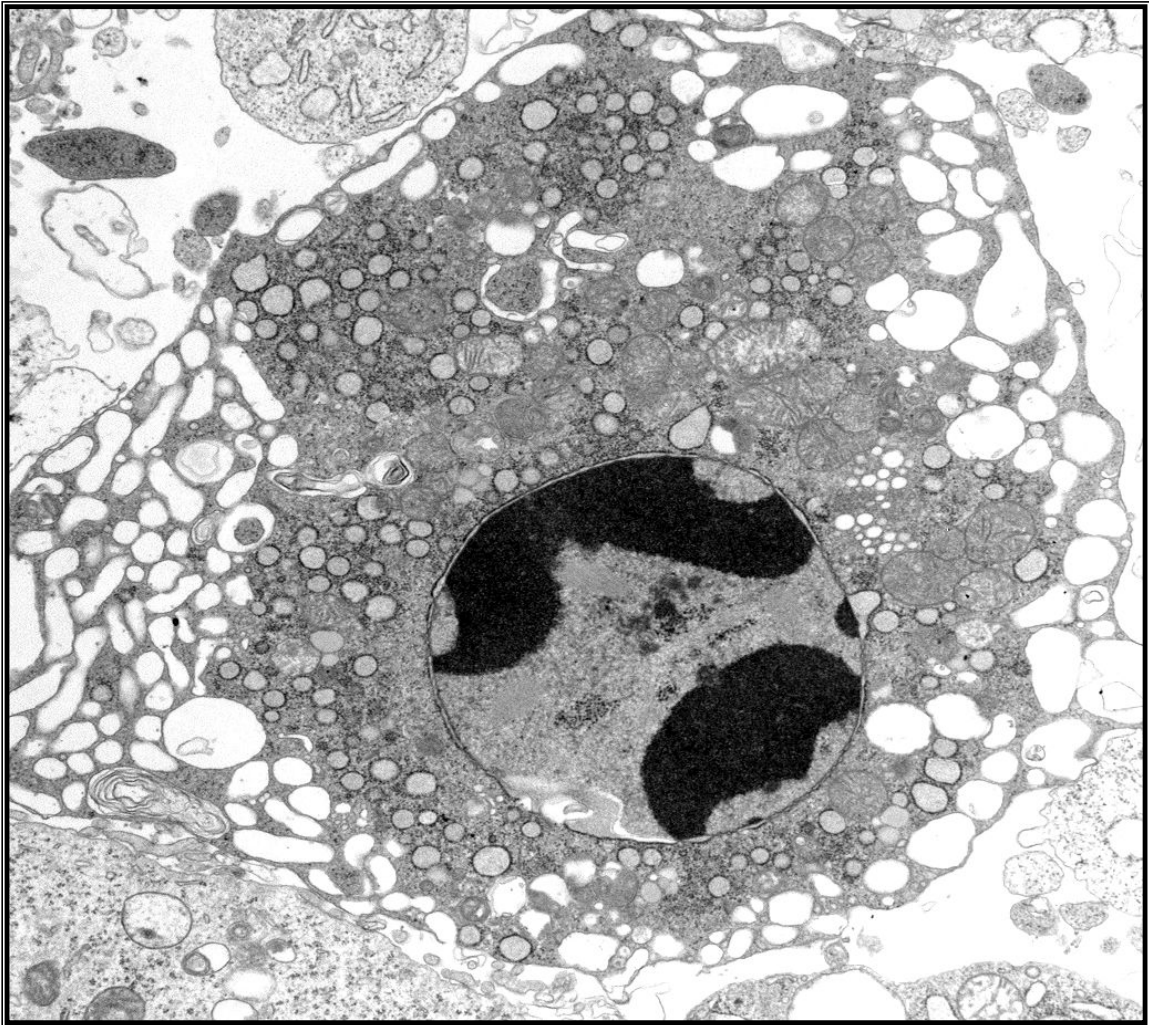
La apoptosis también puede intervenir en situaciones patológicas (84), tanto por exceso de la misma como por defecto.

### 1.6.1 Morfología

La apoptosis se considera, morfológica y bioquímicamente, diferente a la muerte celular por necrosis osmótica. En la necrosis, un grupo de células ante estímulos externos pierde la integridad de la membrana alterando la regulación de la homeostasis iónica celular y permitiendo un gran edema intracelular, con destrucción de organelas. Como consecuencia se provoca una intensa respuesta inflamatoria que participará, igualmente, en la fagocitosis de detritus celulares (85).

Los rasgos morfológicos de la apoptosis difieren de los de la necrosis (85). Inicialmente se produce la constricción de la membrana, disminuyendo el tamaño celular y agrupando las organelas, de modo que el citoplasma tiene un aspecto denso. En el núcleo, la cromatina se condensa en la periferia, por debajo de la membrana nuclear, en masas bien definidas. A continuación el núcleo se fragmenta, formándose al mismo tiempo vesículas citoplasmáticas y los denominados cuerpos de apoptosis (*Fig. 1.14*). Éstos se componen de citoplasma y organelas muy agrupadas, pudiendo contener también fragmentos nucleares, rodeados siempre de membrana. Los cuerpos de apoptosis serán fagocitados por las células sanas adyacentes del parénquima o por macrófagos, donde se degradarán con rapidez dentro de los lisosomas. Posteriormente, las células adyacentes serán capaces de migrar o proliferar, reemplazando así el espacio ocupado por la célula apoptótica suprimida (86).

La apoptosis, al contrario que la necrosis, no produce respuesta inflamatoria.



*Figura 1.14. Célula apoptótica*

### 1.6.2 Mecanismos de apoptosis

La apoptosis puede iniciarse tanto por una vía extrínseca como intrínseca, ambas finalizando en una cascada de caspasas activadas que están involucradas en la degradación del ADN. Las caspasas (cisteinil-aspartato proteasas) son enzimas cuya actividad catalítica depende de un residuo de cisteína dentro de una secuencia altamente conservada, dividiendo específicamente sus sustratos en lugares precedidos por residuos de Aspartato. Se han descrito 11 caspasas en células humanas que

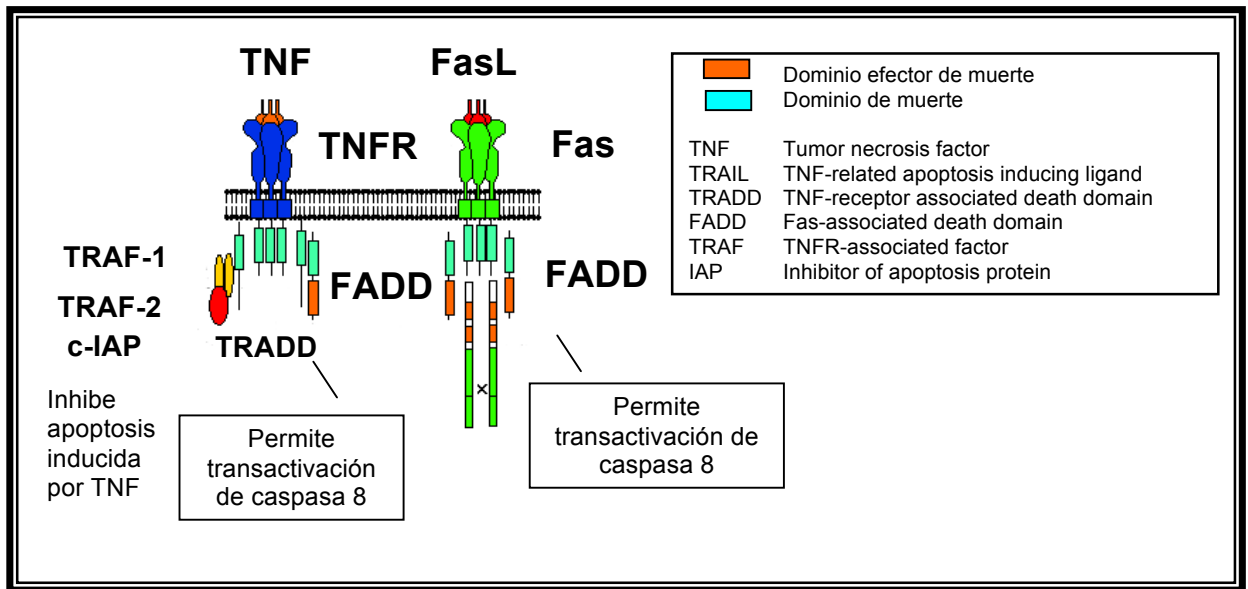
provocan una degradación proteica bien definida hasta llegar a la formación de cuerpos apoptóticos. Algunas caspasas son "iniciadoras" y otras "efectoras" del proceso catalítico, actuando sobre endonucleasas que son las responsables directas de la fragmentación del ADN. La activación de las caspasas, que existen en calidad de pro-caspasas inactivas, se produce por diversas vías en las que participan varios complejos moleculares (87-88).

*a) Vía extrínseca*

La vía extrínseca o de los "receptores de muerte" establece conexiones con el espacio extracelular, recibiendo señales proapoptóticas desde el exterior y de las células vecinas. La inflamación, incluyendo macrófagos o linfocitos, y los "ligandos de muerte" (death ligands) forman parte de esta vía. Dos familias de receptores se han identificado con estas características: la proteína Fas y el factor de necrosis tumoral (TNF) (89) (*Fig 1.15*).

La proteína transmembrana Fas en su porción intracelular enlaza con un factor intermedio denominado FADD (factor associated death domain), nombre que sólo señala que está comprometido con la zona de la molécula Fas que participa en la muerte celular, activando las caspasas-8 y -10.

En cuanto al otro receptor de membrana TNF, su porción intracelular conecta con complejos intermedios como el TRADD (TNF receptor associated death domain) y RAIDD (receptor associated interleukine death domain) que activan caspasas "iniciadoras" de la apoptosis.

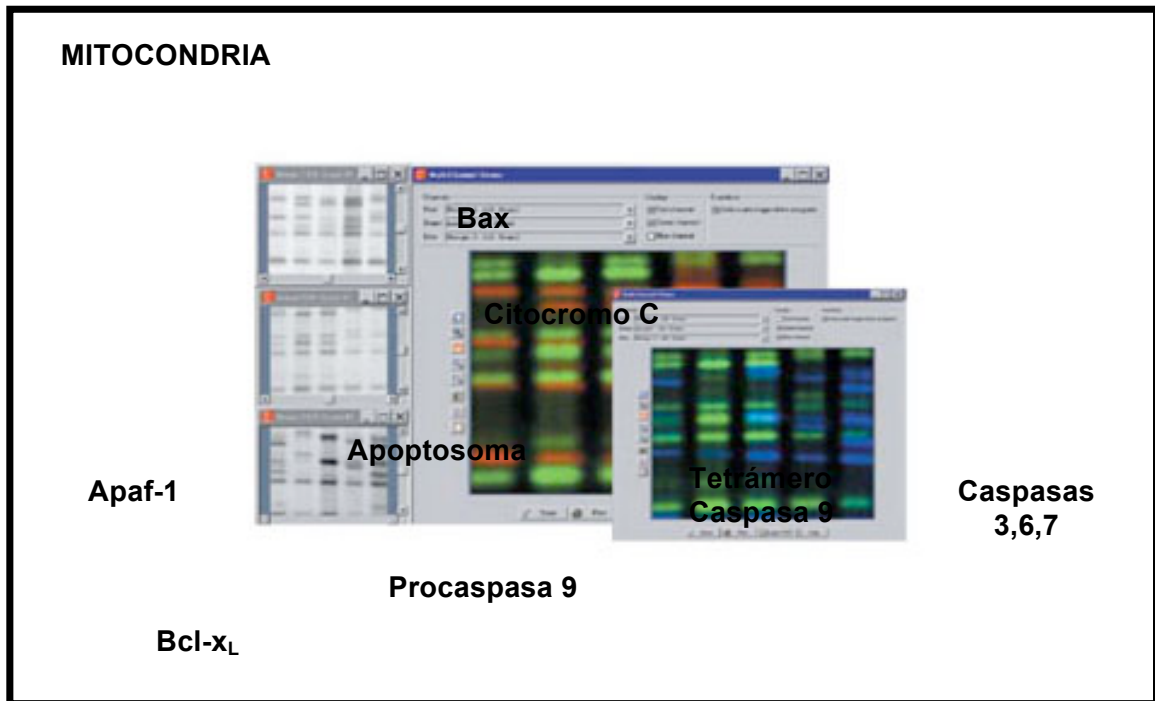


**Fig 1.15.** *Vía extrínseca de apoptosis*

*b) Vía intrínseca o mitocondrial*

Otra vía de inducción de apoptosis es la vía llamada mitocondrial. Esta vía está iniciada por el estrés oxidativo. Las proteínas de la familia de Bcl-2 regulan la apoptosis ejerciendo su acción sobre la mitocondria. La activación de proteínas proapoptóticas de la familia de Bcl-2 produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación de numerosas proteínas del espacio intermembrana; entre ellas, el citocromo c (90).

El citocromo c, una vez en el citosol, activa un complejo proteico llamado "apoptosoma", que activa directamente a la caspasa-9. Una vez que la caspasa-9 está activada, ésta activa a las caspasas efectoras como la caspasa-3, lo que desencadena las últimas fases de la apoptosis (*Fig. 1.16*).



*Fig 1.16. Vía intrínseca*

### 1.6.3 Bcl-2, bax, índice bax/bcl-2

Como hemos comentado, los genes de la familia Bcl-2 están especialmente implicados en la vía intrínseca de la apoptosis.

#### 1.6.3.1 Bcl-2

Fue el primer miembro encontrado en una familia de genes implicados en la regulación de la apoptosis que, a diferencia de otros oncogenes, prolonga la supervivencia celular bloqueando específicamente la muerte celular por apoptosis.

El gen bcl-2 (B-cell Lymphoma 2) se identificó hace más de una década, con el análisis y descubrimiento de la translocación recíproca entre los cromosomas 14 y 18 (q32,q21) (89-91). Esta translocación es la aberración cromosómica más común en los linfomas no Hodgkin, alcanzando el 70-80% en los linfomas foliculares (92).

En este caso la secuencia de bcl-2 se yuxtapone al gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina (IgH) en la región 14q32. Sin embargo, la translocación no se traduce en una interrupción de la región codificante del bcl-2, sino en el gen de la IgH. Consecuentemente, bajo el control del gen promotor de las inmunoglobulinas se produce la sobreexpresión tanto del ARNm como del producto proteico de bcl-2 en estos linfomas, y, como consecuencia, una disminución de la muerte de los linfocitos B afectados (93). Esta prolongación de la vida de las células B es un evento crítico en la génesis del linfoma folicular.

Por otro lado se observó que este gen, activado por la traslocación 14;18, permitía la supervivencia de células hematopoyéticas citoquin-dependientes, en estado quiescente, en ausencia de citoquina. Este hallazgo se verificó en otras líneas celulares en ratones transgénicos, estableciéndose que la supervivencia y la proliferación celular estaban directamente relacionados con una sobreexpresión de bcl-2 (94).

El producto del gen bcl-2 es una proteína de 26 kDa que se localiza principalmente en la membrana externa de la mitocondria, aunque también en la nuclear y en el citosol a nivel del retículo endoplásmico liso (95). La amplia expresión in vivo de bcl-2 en tejidos humanos normales, embriológicos, fetales y adultos sugiere que este gen tiene un importante papel en la homeostasis tisular normal (96).

En tejidos adultos normales bcl-2 parece estar restringido al compartimento proliferativo, donde se localizan las células madre, de larga vida, que se dividen y se diferencian continuamente a elementos maduros. Por el contrario, la expresión de bcl-2 disminuye, o está ausente, en células terminales diferenciadas de los epitelios de colon, piel y próstata, las cuales se cree que mueren por apoptosis. Bcl-2 también se

expresa en células de larga vida como las neuronas (97) y algunas células sensibles al estímulo hormonal, tales como el endometrio (98) o los folículos ováricos (99).

Tomando en conjunto estas observaciones se ha podido hipotetizar que bcl-2 es un factor de supervivencia muy importante para células progenitoras precoces, posiblemente a través de la prevención de la muerte celular programada en el compartimento regenerativo, y para células completamente diferenciadas de larga vida.

### 1.6.3.2 Otros miembros de la familia Bcl-2

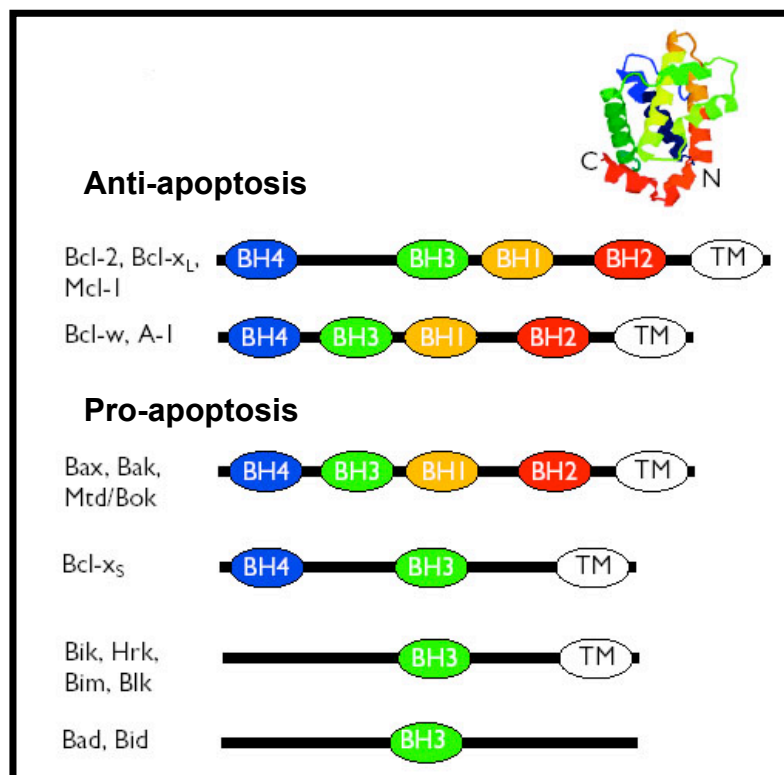
Se han identificado, en mamíferos, al menos 15 genes que tienen homología en la secuencia con el gen bcl-2 y se han clasificado como miembros de la familia de genes bcl-2. A su vez, se han dividido en dos grupos, en base al efecto que tienen sobre el ciclo celular (100). (*Tabla 1.1*)

<b>Antiapoptóticos</b>	<b>Proapoptóticos</b>	
Bcl-2	<b>Grupo Mdt</b>	<b>Sólo BH3</b>
Bcl-x <sub>L</sub>	Bax	Bik
Bcl-w	Bcl-x <sub>S</sub>	Blk
Mcl 1	Bok	Hrk
A1	Bak	BNIP 3
NR-13		Bim <sub>L</sub>
BHRF 1		Bad
DRF 16		Bid
		EGL-1

**Tabla 1.1.** Familia Bcl-2

Las proteínas codificadas poseen, al menos, uno de cuatro dominios homólogos al bcl-2 (BH1, BH2, BH3 y BH4). Las inhibidoras de la apoptosis contienen el BH1 y el BH2; incluso las de mayor homología con el bcl-2 presentan los cuatro dominios.

Sin embargo, las proteínas proapoptóticas pueden subdividirse en dos grupos en relación a la homología estructural que compartan con el bcl-2: el grupo Mdt, que incluye bax, bak y bok, que contiene 3 dominios (BH1, BH2 y BH3) homólogos al bcl-2; y el grupo de proteínas “asesinas”, que tan solo coinciden estructuralmente con una pequeña región central (9 a 16 residuos) del dominio BH3; este grupo incluye bik, blk, hrk, BNIP 3, bim L, bad, bid y EGL-1 (101 ) (Fig. 1.17).



*Fig. 1.17. Familia Bcl-2*

### 1.6.3.3 Bax

La primera proteína conocida asociada con bcl-2 in vivo (bax=bcl-2 associated protein X). Es una proteína de 21 kD con la habilidad de suprimir la capacidad de bcl-2 para bloquear la apoptosis (102).

En algunos tejidos incluyendo mama, estómago, piel, ganglios linfáticos, colon e intestino delgado, entre otros, los patrones de expresión de bax y bcl-2 están regulados de forma paralela, lo que sugiere un antagonismo activo entre ambas proteínas (96). Por otro lado, también se ha visto que la expresión de bax se localiza especialmente en áreas cuyas células tienen una alta tasa de apoptosis.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar el papel regulador de esta interacción proteína-proteína en el control de la apoptosis (103):

- a) Bax podría funcionar como una molécula inductora de muerte celular, que es neutralizada por bcl-2;
- b) Bcl-2 podría funcionar como un represor de muerte celular, que es neutralizado por competencia con una molécula inerte de bax;
- c) Bcl-2 podría tener una función bioquímica totalmente opuesta a bax.

En otros tejidos bax se distribuye paradójicamente. Así, en algunas células de larga vida como las neuronas en el sistema nervioso central, la expresión de bax es alta, mientras que en células de corta vida tales como granulocitos y timocitos corticales su expresión es nula o escasa, lo que sugiere que, o bien la vía bcl-2/bax no es responsable de la regulación de la vida y la muerte en estas células, o bien que otros miembros de la familia bcl-2 son expresados en estas células y contribuyen a la regulación de la muerte celular. Sin embargo, las neuronas están entre las células más

sensibles para la inducción de muerte celular por pérdida de factores de supervivencia (neurotrofinas), hipoxia, hipoglucemia y una variedad de otros insultos. Por tanto, los altos niveles de bax encontrados en varios tipos de neuronas del sistema nervioso central, además de poder contribuir a su inherente estado de vulnerabilidad, sugieren que bax por sí solo es insuficiente para poner en marcha la vía de muerte celular en estas células, e implica un antagonismo activo entre bax y presumiblemente otros miembros de la familia de proteínas bcl-2 para mantener la supervivencia de esas células de larga vida (104).

#### 1.6.3.4 Índice Bax/Bcl-2

La razón entre la proteína Bax, apoptótica, y su homóloga antiapoptótica, Bcl-2, se ha considerado como un índice apoptótico. Parece ser un buen indicativo de la relativa resistencia al estímulo que puede iniciar la muerte celular (105).

#### 1.6.3.5 Bcl-x

El gen Bcl-x presenta una forma larga (L) y una forma corta (S). La proteína producida por la forma larga, Bcl-xL, tiene un 47% de homología con bcl-2 y una distribución celular semejante a este, lo que sugiere que ambas proteínas funcionan de una manera similar. Por el contrario, el producto derivado de la forma corta, Bcl-xs, antagoniza con la inhibición de la muerte celular programada por las dos anteriores (106-107).

#### 1.6.3.6 Bak

La proteína Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer) aumenta la tasa de apoptosis inducida por la deprivación de factores de crecimiento de fibroblastos,

neuronas y células linfoides murinas, lo que sugiere que funciona principalmente como un promotor de apoptosis (108). Bak se expresa ampliamente en epitelios complejos incluyendo nasofaringe, esófago, colon y vejiga, en los que tiene un papel pro-apoptótico.

#### 1.6.3.7 Mcl-1

El gen Mcl-1 (Mieloid cell leukemia-1), descubierto en células de la leucemia mieloblástica, funciona de manera similar a bcl-2, bloqueando la apoptosis en células hematopoyéticas más diferenciadas. Este gen codifica una proteína de 37 kDa que tiene una homología significativa con bcl-2 pero, al contrario que esta, su expresión es mayor en las células más diferenciadas de epidermis, intestino, colon, próstata, nasofaringe y vía aérea superior. Esto sugiere que ambos desempeñan funciones diferentes en la regulación in vivo de la apoptosis (109).

#### 1.6.4 La apoptosis en el sistema cardiovascular

El interés que actualmente despierta el estudio de la apoptosis en medicina es grande. En los últimos diez años se han publicado hallazgos que sugieren que la regulación de la apoptosis puede estar alterada en diversas enfermedades del corazón y de los vasos sanguíneos .

En el sistema cardiovascular la apoptosis puede ser parte del proceso de renovación, pero por defecto de mitosis o exceso de muerte celular, puede constituir un proceso patológico (110,111).

En el ventrículo derecho ocurre una remodelación fisiológica después del nacimiento cuando ya este ventrículo no tiene que cumplir con la función hemodinámica intrauterina (111). Una cantidad importante de células de ese ventrículo mueren de manera programada después del nacimiento. Esto suele durar apenas unos días, pero en ciertas condiciones se prolonga indefinidamente y ocurre la denominada miocardiopatía de Uhl, caracterizada por una dilatación extrema del ventrículo derecho con la consecutiva insuficiencia ventricular derecha (112,113).

Otra enfermedad relacionada con la enfermedad de Uhl, en la que también se ha demostrado apoptosis, es la displasia arritmogénica del ventrículo derecho (112-114), en la que la infiltración fibrótica que sustituye al miocito apoptótico, crea el sustrato para arritmias potencialmente letales (114).

Otra entidad en donde se ha demostrado muerte celular programada es la miocardiopatía dilatada, principalmente en su forma idiopática (113). En ella se ha demostrado que aproximadamente el 0,2 por ciento de las células tenían características apoptóticas (113). Esta cantidad aparenta ser poco influyente en la función del corazón, pero si se toma en cuenta que la muerte celular ocurre en cuestión de horas y si se trata de un proceso ininterrumpido sin replicación celular compensadora, alrededor del 50 por ciento de la masa ventricular se perdería en un año.

La apoptosis parece también jugar un papel importante en la formación anatómica de los nodos sinusal y auriculoventricular (115). En efecto, una buena cantidad de pequeñas células P redondas u ovoides presentes en el nodo sinusal en el nacimiento va desapareciendo poco a poco por un proceso exclusivamente apoptótico, sin que

medie el menor signo inflamatorio. Algo semejante ocurre en el nodo auriculoventricular. Las conexiones auriculoventriculares son eliminadas en la remodelación posnatal. La persistencia de algunas de estas conexiones podría ser el origen de algunos fascículos accesorios como aquellos que se encuentran en el síndrome de Wolf Parkinson White y en el bloqueo auriculoventricular acompañado de arritmias ventriculares (116).

James T.N. y colaboradores han demostrado muerte celular exagerada sin inflamación previa en el nodo sinusal de pacientes con síndrome de QT largo que tienen síncope y arritmias potencialmente letales (117).

En la remodelación que ocurre en el tejido aparentemente sano después de un infarto del miocardio hay una reexpresión del programa fetal genético, con disfunción progresiva (118). Esta situación puede ser causada por la muerte programada de tejido viable y de hecho, se ha demostrado que en el tejido sano contiguo a la necrosis postinfarto hay células apoptóticas (118,119).

Se han dado evidencias en tejido aislado, así como en modelos experimentales, que puede ocurrir apoptosis en respuesta a la isquemia-reperfusión (120), al infarto del miocardio (118), a la estimulación eléctrica rápida del miocardio (121), al estiramiento mecánico (122) y a la sobrecarga debida a la constricción aórtica (123). También se ha visto que constantemente ocurre apoptosis miocárdica en órganos diana de ratas hipertensas (124).

También se han hallado evidencias del papel de la apoptosis en las células musculares y del endotelio de los vasos sanguíneos en el desarrollo de la aterosclerosis (125).

### 1.6.5 Apoptosis y Alprostadil

Recientemente se ha descrito el papel supresor de la apoptosis en enfermedades inflamatorias como la hepatopatía crónica, en la que la administración de PGE1 junto con somatostatina, presentó un efecto protector de daño hepático al inhibir las respuestas inflamatorias y de apoptosis (126).

También se ha descrito de forma experimental su posible papel terapéutico en determinadas enfermedades por su influencia sobre los mecanismos de la apoptosis, como en los gliomas cerebrales (127), hepatocarcinomas (128,129), o el cáncer colorectal (130).

También se ha visto que la perfusión de PGE1 al hígado en isquemia, previo al trasplante hepático, presenta efectos protectores al daño isquemia-reperfusión en parte por modificación de los índices apoptóticos (131).



## 2. HIPÓTESIS

El alprostadil (prostaglandina E1) es una prostaglandina natural, presente en las vesículas seminales y tejidos del cuerpo cavernoso de los varones y en la placenta y ductus arteriosus del feto. Tiene un efecto reconocido como vasodilatador y antiagregante, por lo que es utilizado actualmente en el tratamiento de los pacientes con isquemia crítica (estadios III y IV de Fontaine) no revascularizable, y en los pacientes con isquemia crítica que son revascularizados como terapia adyuvante para mejorar la perfusión tisular periférica.

Se conoce bien el efecto que realiza esta droga a nivel del endotelio, pero no se conoce con exactitud si produce algún efecto sobre el músculo esquelético. La mejora de la perfusión que se produce por su efecto vasodilatador podría cambiar el patrón empleado para obtener energía por sí sólo, pero además como efecto pleiotrópico podría tener un efecto directo sobre el propio músculo, y fundamentalmente sobre su metabolismo aeróbico o anaeróbico cuando estamos ante un estado isquémico. Por lo tanto, el efecto del alprostadil sobre el metabolismo del músculo prodría presumiblemente ser diferente en el musculo isquémico respecto al no isquémico.

La apoptosis de las células es un mecanismo activo de muerte tisular en el que participan prooncogenes como el Bcl-2 y el Bax. Por ésto, en base a los hallazgos descritos en la literatura sobre la apoptosis de la célula de músculo esquelético en el estado isquémico, y básandonos también en la hipótesis de que el alprostadil podría modificar el metabolismo energético en el músculo sano e isquémico, en la segunda parte de este trabajo de tesis analizaremos el efecto de alprostadil sobre el estado

apóptico del músculo esquelético. Para ello, valoraremos si existen diferencias en cuanto a los marcadores de apoptosis Bcl2 y Bax en el músculo isquémico respecto al sano, y el posible efecto que el alprostadil pueda tener sobre estos.

### **3. OBJETIVOS**

1. Estudiar las diferencias existentes en el perfil proteómico del metabolismo del músculo sometido a isquemia frente al músculo con un correcto nivel de perfusión.
2. Determinar el efecto del alprostadil sobre el metabolismo energético del músculo esquelético isquémico, comparándolo con el metabolismo energético del músculo esquelético sano, mediante un estudio proteómico.
3. Determinar el efecto del alprostadil sobre dos de los principales productos del metabolismo energético en el músculo esquelético isquémico, frente al sano.
4. Comprobar si en el músculo esquelético isquémico existe una actividad apoptótica mayor que en el sano y si se modifica con el Alpostradil a través de la cuantificación de los niveles de expresión proteica de dos proteínas relacionadas con los procesos apoptóticos, Bax y Bcl2.



## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

En la presente tesis se realizaron experimentos *in vitro* para estudiar el efecto del alprostadil sobre el metabolismo energético del músculo esquelético, tanto sano como isquémico, observando cambios en la expresión proteica de las enzimas fundamentales implicadas en las principales rutas metabólicas. Se obtuvieron segmentos de músculo esquelético incubados con dosis de 5ng/ml del fármaco dejando además uno de los experimentos de cada muestra sin alprostadil como control. Además, se estudiaron cambios en los principales metabolitos de estas rutas.

### 4.1. SELECCIÓN DE PACIENTES

Entre Febrero y Noviembre de 2011 se obtuvieron muestras de 10 pacientes sometidos a amputación supracondílea de extremidad inferior. Los criterios de inclusión fueron isquemia crónica avanzada de la extremidad (estadios III y IV de la clasificación de Fontaine), no revascularizable, con oclusión femoropoplítea en la exploración física, y buenos registros de volumen del pulso (PVR) a nivel de muslo distal en el estudio hemodinámico. Se excluyeron aquellos enfermos con infección activa severa en el pie o que hubieran recibido tratamiento anteriormente con alprostadil. En aquellos casos en los que el paciente estuviera tomando estatinas y antiagregantes previamente, se realizó un periodo de lavado de los mismos de al menos 10 días. El reclutamiento se realizó de forma consecutiva.

En todos los pacientes se obtuvo consentimiento informado para su participación y el estudio fue aprobado por el Comité Ético del centro donde se llevó a cabo la obtención y procesamiento de muestras.

Se recogieron las siguientes características de los pacientes: edad; sexo; factores de riesgo cardiovascular: hipertensión arterial (tensión arterial sistólica > de 140 mmHg o con tratamiento antihipertensivo), diabetes mellitus (glucemia basal >110 mg/dl o HBA1c >7%, o tratamiento con antidiabéticos orales o insulina), dislipemia (cifras de colesterol total >240 mg/dl, triglicéridos >150 mg/dl o ratio HDL/LDL <0,3, o con tratamiento hipolipemiente), fumador (habitual o exfumador de menos de un año); enfermedad coronaria (historia de angina de pecho, infarto agudo de miocardio o revascularización miocárdica quirúrgica o percutánea); insuficiencia renal (valores de creatinina >1,5 mg/dl) y enfermedad cerebrovascular (antecedente de ictus, ataque isquémico transitorio o revascularización carotídea previa).

#### 4.2. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS Y CULTIVO

En cada paciente se obtuvieron especímenes de dos localizaciones: muestras de músculo isquémico (extraído del músculo extensor corto de los dedos a nivel del pie) o grupo I; y muestras de músculo sano del borde de amputación (músculo cuádriceps) o grupo S.

El material obtenido se conservó en medio estándar RPMI blanco 1640 (*Invitrogen Corporation: Gibco®* RPMI 1640) en condiciones estériles y se cultivó de forma inmediata.

El medio RPMI 1640 fue inicialmente diseñado para el crecimiento de linfoblastos y líneas celulares leucémicas en suspensión, pero con los suplementos adecuados tiene un amplio rango de aplicaciones en células de mamíferos.

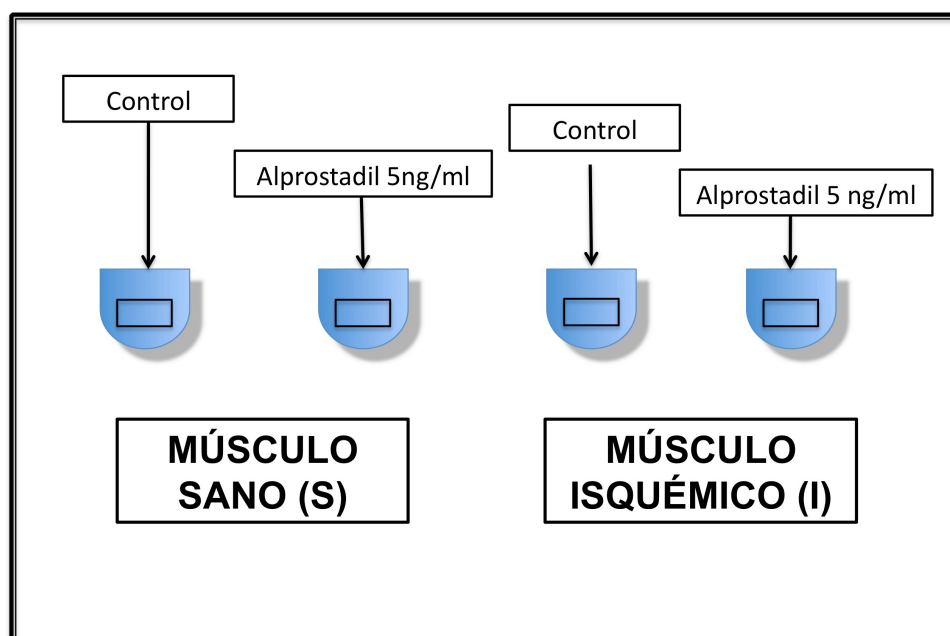
Las piezas quirúrgicas se cortaron en piezas de 10 mm de diámetro y se cultivaron en placas de cultivo con medio RPMI 1640 blanco en una atmósfera de 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> a 37°C durante 48 horas y bajo condiciones estériles. El empleado en nuestro caso no contiene rojo fenol para evitar alteraciones posteriores en los análisis en los que se utilizan métodos colorimétricos. Este medio está constituido por la formulación basal estándar recogida en publicaciones previas (132), suplementado con aminoácidos no esenciales y piruvato sódico. Además se suplementó con un 1% de suero fetal bovino (SFB) (al tratarse de tejidos requieren menos suero SFB que los cultivos celulares), 5 mmol/l de glutamina,  $2 \times 10^{-5}$  µg/l de penicilina y  $2 \times 10^{-5}$  µg/l de estreptomicina. La formulación del medio se indica en la *Tabla 4.1*.

De cada grupo de muestras (I y S) se realizaron 2 cultivos, uno basal, sin fármaco, y otro con alprostadil, a una concentración de 5ng/ml. La concentración se basó en estudios similares realizados en células endoteliales (133,134) El medio se cambió cada 12 horas. Por tanto, de cada paciente se obtuvieron 4 cultivos (grupo I basal, grupo I con alprostadil, grupo S basal, grupo S con alprostadil). (*Fig 4.1.*)

**Tabla 4.1. Formulación del medio RPMI 1640 Gibco®**

COMPONENTES	PESO MOLECULAR	CONCENTRACION (mg/l)	Molaridad (mM)
<b>AMINOACIDOS</b>			
Glicina	75	10	0.133
L-Arginina	174	200	1.15
L-Asparagina	132	50	0.379
Ácido L-Aspártico	133	20	0.150
L-Cistina 2HCl	313	65	0.208
Ácido L-Glutámico	147	20	0.136
L-Glutamina	146	300	2.05
L-Histidina	155	15	0.0968
L-Hidroxiprolina	131	20	0.153
L-Isoleucina	131	50	0.382
L-Leucina	131	50	0.382
L-Lisina	146	40	0.274
L-Metionina	149	15	0.101
L-Fenilalanina	165	15	0.0909
L-Prolina	115	20	0.174
L-Serina	105	30	0.286
L-Treonina	119	20	0.168
L-Triptófano	204	5	0.0245
L-Valina	117	20	0.111
<b>VITAMINAS</b>			
Biotina	244	0.2	0.000820
Cloruro de colina	140	3	0.0214
A.pantoténico	477	0.25	0.000524
Ácido fólico	441	1	0.00227
i-Inositol	180	35	0.194
Niacinamida	122	1	0.00820
P-aminobenzoico	137	1	0.00730
Piridoxina	206	1	0.00485
Riboflavina	376	0.2	0.000532
Tiamina	337	1	0.00297
Vitamina B12	1355	0.005	0.0000037
<b>SALES</b>			
Nitrato de calcio	236	100	0.424
Sulfato magnésico	120	48.84	0.407
Cloruro potásico	75	400	5.33
Bicarbonato sódico	84	2000	23.81
Cloruro sódico	58	5300	91.38
Fosfato disódico	142	800	5.63
<b>OTROS</b>			
D-Glucosa	180	2000	11.11
Glutation (reducido)	307	1	0.00326
HEPES	238	5958	25.03

*Fig. 4.1. Esquema de cultivos*



Las muestras de músculo fueron aisladas y homogeneizadas con el homogeneizador *Ultra-Turrax® T8* (IKA<sup>®</sup>-Werke). Dicho homogeneizador es una unidad de dispersión para conseguir emulsiones y dispersiones con un alto rendimiento. El *Ultra-Turrax® T8* (Figura 4.2.) es un instrumento de mano de alta calidad, con una potencia de hasta 100 vatios y unas velocidades de 5000 a 25000 por minuto. Gracias al amplio rango de velocidades y que el elemento dispersor tiene un diámetro de 5-8 mm, incluso pequeñas cantidades se procesan y dispersan rápidamente.



**Fig. 4.2.** Ejemplo del instrumento Ultra-Turrax® T8.

Las muestras se homogeneizaron en una solución tampón (*rehydration buffer*) que contenía un agente desnaturalizante (urea), un agente detergente (CHAPS y anfolitos) y un agente reductor (ditiotreitól) en las concentraciones que se exponen a continuación (*Tabla 4.2*):

- Urea.....8 mol/l
- CHAPS w/v.....2%
- Ditiotreitól.....40 mmol/l
- Anfolitos Bio-Lyte (Laboratorios *Bio-Rad*, Hercules, Cal)...0.2%
- Azul de bromofenol w/v.....0.01%

**Tabla 4.2.** Componentes, función y concentración de la solución de rehidratación.

<b>COMPONENTE</b>	<b>FUNCIÓN</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
<b>Urea</b>	Desnaturaliza y solubiliza las proteínas	8 M/l
<b>Detergente (CHAPS)</b>	Solubiliza las proteínas y ayuda a mantenerlas en solución durante la rehidratación y electroforesis	2%
<b>Agente reductor (ditiotreitól)</b>	Rompe los puentes disulfuro en las proteínas	40 mM
<b>Anfolitos</b>	Ayudan a solubilizar las proteínas y a mantener el gradiente de pH entre 0.2-2%	0.2%

Posteriormente, los tejidos homogeneizados se centrifugaron a 10000 g durante 10 minutos y el sobrenadante se congeló a -80 °C hasta su análisis.

#### 4.3 ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2-DE)

El mapa de expresión proteica del músculo se realizó mediante electroforesis bidimensional (2-DE), según la técnica descrita en publicaciones previas (135), la primera en un gradiente de pH inmovilizado (IPG-strips, BioRad) y la segunda sobre geles de SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) al 10%.

#### 4.3.1 Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína se estimó utilizando el *kit Pierce*<sup>®</sup> *BCA Protein Assay*. Se trata de una formulación basada en el ácido bicinconínico (BCA), compatible con detergentes, para la detección colorimétrica y cuantificación de las proteínas totales.

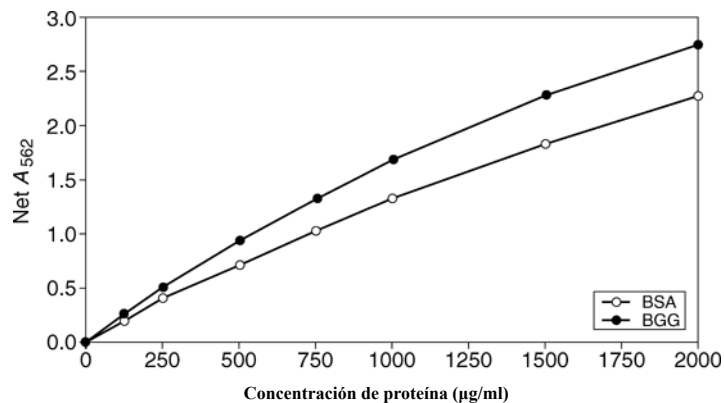
El principio del método del ácido bicinconínico (BCA), patentado por *Pierce Biotechnology* (Rockford, IL, USA), es similar al procedimiento de *Biuret*, en cuanto que ambos se basan en la formación de un complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína bajo condiciones alcalinas, seguido de la reducción del  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^{1+}$  (136). La cantidad de reducción es proporcional a la proteína presente. El BCA forma un complejo azul púrpura con el  $\text{Cu}^{1+}$  por proteínas en medios alcalinos, de modo que permite monitorizar la reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  por las proteínas a un máximo de absorbancia de 562 nm y de este modo cuantificar las proteínas. La estructura macromolecular de la proteína, el número de uniones peptídicas y la presencia de 4 aminoácidos en particular (cisteína, cistina, triptófano y tirosina) han sido descritos como los responsables de la formación de color con BCA. La concentración de proteínas se determina en referencia generalmente a una proteína estándar común, como la albúmina bovina.

El ensayo BCA es más sensible y aplicable que los métodos de *Biuret* o de *Lowry*. Además, tiene menos variabilidad que el método de *Bradford*. Entre otras características del ensayo BCA encontramos:

- Método colorimétrico, se lee a 562 nm
- Compatible con la mayoría de los detergentes iónicos y no iónicos
- Más rápido y fácil que el método de *Lowry*
- Todos los reactantes son estables a temperatura ambiente durante 2 años

- El rango de trabajo varía de 20 a 2000  $\mu\text{g/ml}$
- El complejo de color es estable
- Adaptable a microplacas
- Menor variación proteína-a-proteína que con los métodos de tinción
- Es aplicable a un amplio rango de concentraciones de proteínas

La concentración de proteínas se determinó con referencia al estándar, la albúmina bovina (*Figura 4.3*).



**Fig. 4.3.** Ejemplo de curva de comparación de concentración de proteínas frente a la albúmina bovina.

La cuantificación de las proteínas se realizó siguiendo los pasos que se indican a continuación:

1. Preparación de las diluciones estándar de BSA (albúmina de suero bovino). Las diluciones de BSA se prepararon a partir de ampollas de BSA de 2.0 mg/ml, según el siguiente esquema:

**Tabla 4.3.** Diluciones de BSA indicando el volumen de disolvente, la relación volumen/fuente de BSA y la concentración final de BSA. BSA: albúmina de suero bovino.

VIAL	VOLUMEN DE DISOLVENTE	VOLUMEN/FUENTE DE BSA	CONCENTRACIÓN FINAL BSA
A	700 µl	100 µl del estándar	250 µg/ml
B	400 µl	400 µl del vial A	125 µg/ml
C	450 µl	300 µl del vial B	50 µg/ml
D	400 µl	400 µl del vial C	25 µg/ml
E	400 µl	100 µl del vial D	5 µg/ml
F	400 µl	0	0 µg/ml (blanco)

2. Preparación del reactivo de trabajo BCA.

Se empleó como reactivo el *kit Pierce*<sup>®</sup> *BCA Protein Assay*. Para determinar el volumen total de reactivo de trabajo se empleó la siguiente fórmula: (x estándar + x muestras problema) x (nº duplicados) x (volumen de reactivo de trabajo por muestras= 200 µl)= volumen total. El reactivo de trabajo se prepara mezclando 50 partes de reactivo A (carbonato sódico, bicarbonato sódico, ácido bicinínico y tartrato sódico en hidróxido sódico 0.1 M) con una parte de reactivo B (sulfato cúprico 4%).

3. Se pipetearon 25 µl de cada estándar o muestra problema por triplicado en pocillos.

4. Se añadieron 200 µl de reactivo de trabajo a cada pocillo y se mezcló el platillo en un agitador durante 30 segundos.

5. Se tapó el platillo y se incubó a 37 °C durante 30 minutos.
6. Se dejó enfriar hasta temperatura ambiente.
7. Medida de absorbancia a 562 nm.
8. Se restó la absorbancia de la muestra blanco al resto de muestras.
9. Se preparó la curva estándar: en el eje de ordenadas la medida de absorbancia; en el eje de abscisas, la concentración conocida de BSA. A continuación, en esta curva se interpolan los valores obtenidos en el resto de muestras problema.

#### 4.3.2 Primera dimensión

Para la primera dimensión de la 2-DE se cargaron muestras de 250 µg de proteína total en tiras de geles de gradiente de pH inmovilizado (IPG) con un pH de 3 a 10 (*Bio-Rad ReadyStrip™*). El foco isoeléctrico se realizó con el sistema PROTEAN® IEF *cell* (Laboratorios *Bio-Rad*) durante 3 días y a temperatura ambiente (20°C). Este sistema está diseñado para llevar a cabo la primera dimensión y consiste en una fuente de alimentación programable con una plataforma *Peltier* que mantiene la temperatura constante para asegurar la reproducibilidad. El rango de temperaturas varía desde 10 a 25 °C, lo que permite trabajar con un rango más amplio de muestras de proteínas y condiciones. Dicho sistema permite acomodar hasta 24 tiras de 7 cm o 12 de 17 cm para realizar el foco isoeléctrico. Puede ser programado completamente para una rehidratación pasiva o activa (50 V). Las especificaciones técnicas se listan en la *Tabla 4.4*.

**Tabla 4.4.** Especificaciones técnicas del sistema *PROTEAN® IEF cell* (Laboratorios *Bio-Rad*).

<b>Dimensiones</b>	28 x 30 x 14 cm
<b>Voltaje</b>	50-10000 V, incrementos de 10 V
<b>Corriente</b>	0-2.4 mA, incrementos de 1.0 $\mu$ A
<b>Potencia</b>	0-24 W
<b>PLATAFORMA</b> <b>Peltier</b>	
<b>Capacidad</b>	24 tiras de 7 cm o 12 tiras de 11,17,18 o 24 cm.
<b>Temperatura de operación</b>	10-25 °C

Como se ha publicado con anterioridad (137,138), los geles fueron rehidratados activamente a 50 V durante 60 horas, seguido de rápidas subidas lineales de tensión y voltaje, limitados por una corriente máxima de 50  $\mu$ A por gel (139).

### 4.3.3 Segunda dimensión

En la segunda dimensión las proteínas de las tiras se separaron según su peso molecular en geles de electroforesis de poliacrilamida y dodecil sulfato sódico al 10% (SDS-PAGE) utilizando el sistema PROTEAN® II XL (Laboratorios *Bio-Rad*). Esta unidad proporciona una gran área de separación de las proteínas, lo que permite analizar muestras con mayor carga y, finalmente, también obtener una mejor resolución respecto a los formatos de gel más pequeños. Las especificaciones técnicas se incluyen en la *Tabla 4.5*.

**Tabla 4.5.** Especificaciones técnicas del sistema PROTEAN® II XL (Laboratorios Bio-Rad)

<b>Número de geles</b>	<b>1-4</b>
<b>Tamaño del gel</b>	18.3 x 20 cm (altura x longitud)
<b>TAMAÑO del PLATO</b>	
<b>Interno</b>	20 x 20 cm
<b>Externo</b>	20 x 22.3 cm
<b>Longitud del espaciador</b>	22.3 cm
<b>Volumen superior de tampón</b>	350 ml
<b>Volumen inferior de tampón</b>	1.2 L
<b>TIEMPOS para el SDS-PAGE</b>	
<b>Sin enfriamiento</b>	5 h
<b>Con enfriamiento</b>	3.5 h

#### 4.3.4 Tinción

Posteriormente, los geles fueron teñidos con nitrato de plata utilizando el kit *Silver Stain Plus* (Laboratorios *Bio-Rad*), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El *Silver Stain Plus* es un sistema rápido y sencillo para detectar proteínas en los geles de poliacrilamida tras la electroforesis. Esta tinción con plata es muy sensible, pudiendo detectar incluso cantidades de nanogramos de proteínas. El *kit Silver Stain Plus* contiene los siguientes componentes:

- Concentrado potenciador del fijador
- Solución de complejo de plata, que contiene  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{AgNO}_3$

- Ácido tungstosilícico, compuesto por silicio y tungsteno ( $\text{H}_4[\text{Si}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4]\cdot\text{H}_2\text{O}$ ) y que a 20 °C es completamente soluble
- Formaldehído
- Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) como agente acelerador de la tinción

Es muy importante destacar que la tinción con plata utilizada fue compatible con posteriores pasos de espectrometría de masas. El siguiente paso fueron dos lavados con agua destilada de un minuto de duración cada uno para seguidamente aplicar la solución de revelado compuesta de carbonato sódico y formaldehído en agua destilada. Una vez que los geles alcanzaron el grado de tinción deseado se paró el proceso mediante el empleo de una solución con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) en agua destilada.

#### 4.3.5 Adquisición de imágenes y análisis

Los geles teñidos fueron escaneados utilizando un escáner UMAX POWERLOOK III operado por el software *ScanMagic V 4.5*. El análisis de la imagen se realizó utilizando el programa *Quantity One 4.2.3* (Laboratorios *Bio-Rad*) (*Figura 4.4*). Dicho *software* permite la adquisición, cuantificación y análisis de gran variedad de datos, incluyendo muestras teñidas adquiridas mediante sistemas de geles. Las imágenes fueron configuradas, marcadas y, posteriormente, editadas. A la intensidad del volumen de cada punto le fue sustraída la intensidad correspondiente al fondo y el volumen resultante fue normalizado *in situ* con el valor densitométrico correspondiente a la actina  $\alpha$ .

**Fig. 4.4.** Ejemplo de pantalla de análisis con el programa *Quantity One*.



La identidad de cada punto se realizó por comparación con la base de datos *Swiss Prot* (ExPASy). La densidad de los puntos estudiados más importantes se confirmó con espectrometría de masas.

#### 4.4 ESPECTROMETRÍA DE MASAS (EM)

La espectrometría de masas (EM) es una tecnología analítica esencial en el contexto de la proteómica actual debido a su alta capacidad de análisis, su sensibilidad y su precisión en la determinación de masas moleculares proteicas.

### Material utilizado

- Agua *Milli-Q™* (Merk Millipore)
- Acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) al 100%
- Sistema *SpeedVac®* (Thermo Scientific)
- Ditioeritritol (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>)
- Bicarbonato amónico (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)
- Iodoacetamida (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>INO)
- Tripsina (*Promega®*)
- Ácido trifluoroacético (TFA, CF<sub>3</sub>COOH)
- Puntas mmol-18 *Zip* (Millipore)
- Matriz de α-ciano 4-hidroxi-trans-cinámico (*Sigma*)
- Placa de MALDI (*Pro MS MALDI Genomic Solutions*)
- 4700 *Proteomic Analyzer* (*Applied Biosystem*)
- Calibradores estándar (*Applied Biosystem*)

### Método

Para la identificación de las proteínas de interés, los puntos se extrajeron manualmente de los geles utilizando un punzón para biopsias (139,140). La identificación de cada proteína se llevó a cabo extrayendo el mismo punto de interés en tres geles diferentes. La tinción de plata fue solubilizada y eliminada y los puntos fueron lavados tres veces con agua *Milli-Q™* (Merk Millipore). Con este sistema se puede obtener agua ultrapura para este tipo de aplicaciones en el laboratorio, teniendo las siguientes características: un nivel de resistividad de 18,2 MegaOhmios.cm a 25 °C y un nivel de carbonato orgánico total inferior a 10 ppb. Los sistemas *Milli-Q™* constan de varias etapas de

purificación, cada una de ellas diseñada para eliminar una determinada gama de contaminantes. Se utilizó el módulo Gradient A10 (*Tabla 4.6*).

**Tabla 4.6.** Especificaciones del agua producida por el sistema Milli-Q™ Gradient A10.

ESPECIFICACIONES	
Resistividad (MΩ.cm) a 25 °C	18.2
Nivel de COT (valores típicos)	1-5
Nivel de pirógenos (Eu/ml)	NE
Bacterias (UFC/ml)	<1
Partículas > 0.22 μm (P/ml)	<1
Caudal (L/min)	1.5

Después las muestras se incubaron con acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN), utilizado como disolvente, al 100% durante 5 minutos y otros 30 minutos con TFA el 5% y acetonitrilo al 50% y se secaron con un sistema *SpeedVac*® (*Thermo Scientific*).

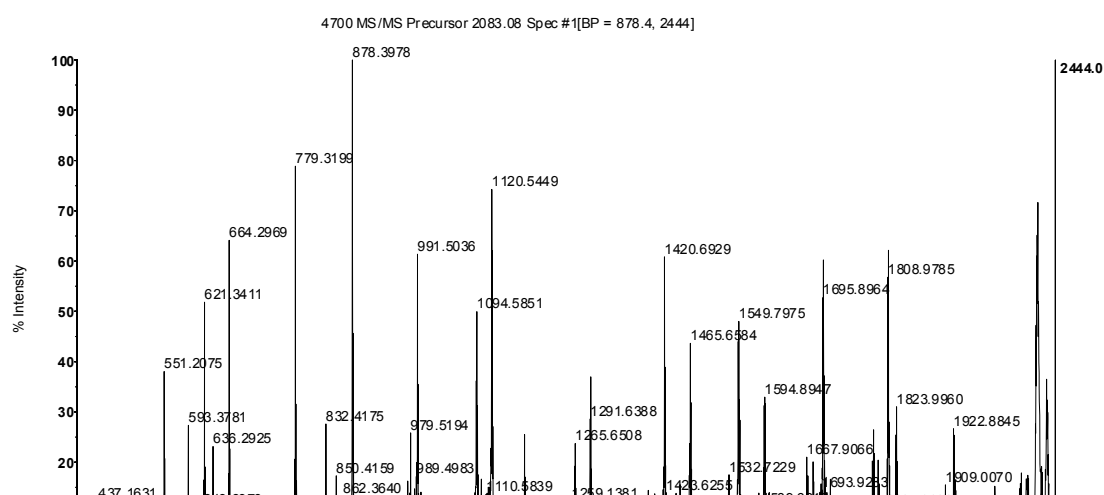
Como se ha publicado previamente (135), las muestras se redujeron con ditioeritrol (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>) en bicarbonato amónico (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) y posteriormente fueron alquiladas con iodoacetamida (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>INO), un inhibidor irreversible de todas las cisteína peptidasas (mediante el mecanismo de alquilación de los residuos catalíticos de la cisteína), en bicarbonato amónico. Finalmente, las muestras fueron digeridas con 12.5 ng/μl de tripsina (*Promega*®, Madison, WI) en 25 mM de bicarbonato de amonio (pH 8.5) a 37 °C durante toda la noche.

La tripsina utilizada es una enzima peptidasa de origen porcino, modificada mediante metilación, que hidroliza específicamente los enlaces peptídicos del extremo carboxilo de los residuos lisina (Lys) y arginina (Arg). Su actividad máxima se establece a un pH entre 7 y 9 y se inactiva de forma reversible a un pH de 4.

Tras la digestión, los péptidos se extrajeron del gel mediante una solución de 100 mmol/l de bicarbonato amónico ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ). Estos extractos se liofilizaron y resuspendieron en ácido trifluoroacético (TFA, del inglés *TriFluoroAcetic acid*, con la fórmula  $\text{CF}_3\text{COOH}$ ) al 0.1%. Los péptidos se purificaron usando puntas mmol-18 Zip (*Millipore*). Para la espectrometría de masas se mezcló 1  $\mu\text{l}$  de los extractos purificados con 1  $\mu\text{l}$  de matriz de  $\alpha$ -ciano 4-hidroxi-trans-cinámico (*Sigma*) en acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) al 50%. Un microlitro de esta mezcla se cargó en una placa de MALDI (*Pro MS MALDI Genomic Solutions*, del inglés *Matriz-Assisted Laser Desorption/Ionization*) y se dejó secar al aire a temperatura ambiente.

Los espectrómetros de masas utilizados en el análisis de proteínas o péptidos pueden ser divididos básicamente en dos partes: la fuente de iones y el detector. La fuente de ionización MALDI se asocia a un analizador de tiempo de vuelo (*TOF-Time of Flight*) en el que los iones se separan en función de su relación masa/carga tras ser acelerados en un campo eléctrico o a un analizador TOF/TOF que proporciona un mejor enfoque de los iones y, por tanto, mayor resolución y precisión másicas. En el primer TOF los iones son acelerados a bajo voltaje, favoreciendo la fragmentación metaestable. Mediante un pulsador se selecciona un determinado ion padre y sus iones fragmento, que son acelerados a un potencial mayor y separados en el segundo TOF.

La espectrometría de masas se realizó utilizando el aparato 4700 *Proteomic Analyzer* (*Applied Biosystem*) y el análisis se efectuó en modo reflector positivo. Todos los espectros de masas se calibraron usando una mezcla de calibradores estándar (*Applied Biosystem*). Con el análisis en modo MS obtuvimos un espectro de masas denominado “huella peptídica” (*Fig. 4.5*), y algunos de los péptidos observados se analizaron en modo MS/MS, como se ha publicado anteriormente (135). El modo MS/MS obtiene espectros de fragmentación de las 3-5 masas mayoritarias dentro de cada una de las huellas peptídicas. Los péptidos con una relación señal-ruido mayor de 20 se consideraron en la Base de Datos *Mascot* (*MatrixScience*, UK) para la identificación de la proteína. Para llevar a cabo dicha identificación se utilizó la base de datos *Mascot* 1.9 (<http://www.matrixscience.com>) como algoritmo para comparar los péptidos obtenidos por espectrometría de masas.



**Fig. 4.5.** Ejemplo huella peptídica de anexina A2

La base de datos *Mascot* (*MatrixScience*, UK) es una potente máquina de búsqueda para identificar proteínas de bases de datos primarias. Nos permite integrar todos los métodos de búsqueda probados: la huella peptídica o los fragmentos derivados del modo MS/MS.

Tras analizar la mezcla de péptidos mediante MS obtuvimos un conjunto de valores de masas moleculares que cruzamos con la base de datos *Mascot*. Para cada entrada en la base de datos de proteínas la máquina simula la rotura de los enlaces específica de la tripsina utilizada en la digestión de las proteínas, calcula las masas de los péptidos previstos y compara el conjunto de valores de masas calculadas con los obtenidos de forma experimental. Para realizar la búsqueda, se introdujo la huella peptídica y después de un corto período de tiempo, se recibieron los resultados.

El análisis proteómico que realizamos se centró en las principales proteínas implicadas en las distintas vías metabólicas de la célula muscular: triosa-fosfato-isomerasa (TPI), malato deshidrogenasa (MDH), lactato deshidrogenasa (LDH) y piruvato carboxilasa (PC).

#### 4.5 DETERMINACIÓN DE LACTATO Y PIRUVATO

Para la determinación del piruvato y lactato, principales productos de las vías metabólicas analizadas, se emplearon, respectivamente, los kits de ensayo K609-100 y K607-100 (*BioVision Research Products*, CA, USA).

#### 4.5.1 Determinación de piruvato

En el ensayo empleado el piruvato es oxidado por la piruvato oxidasa mediante reacciones enzimáticas que generan color ( $\lambda=570$  nm) y fluorescencia (Ex/Em=535/587 nm). El color/fluorescencia es proporcional al contenido de piruvato de la muestra. Las principales características del *Pyruvate Assay Kit* (K609-100) son:

- Detección basada en la absorbancia (570 nm) o fluorescencia
- Permite utilizar muestras de cultivos celulares y tisulares, orina, plasma, suero, así como otros fluidos.
- Detección de 1 a 200  $\mu$ M de piruvato.
- Método sencillo con una duración de unos 40 minutos

El *Pyruvate Assay Kit* contiene los componentes que se especifican en la tabla a continuación:

**Tabla 4.7.** Componentes del *Pyruvate Assay Kit*.

COMPONENTES	100 ENSAYOS	COLOR	NÚMERO
Buffer <i>Pyruvate Assay</i>	25 ml	WM	K609-100-1
Sonda <i>Pyruvate</i>	200 $\mu$ l	Rojo	K609-100-2A
Mezcla enzimática <i>Pyruvate</i>	Liofilizado	Verde	K609-100-4
Piruvato estándar (100 nmol/ $\mu$ l)	100 $\mu$ l	Amarillo	K609-100-5

Para medir la concentración de piruvato mediante el ensayo colorimétrico se utilizaron 80 µg de cada homogeneizado de proteínas y se siguieron las instrucciones del fabricante:

1. Preparación de los reactivos:

- La sonda *Pyruvate* se calentó hasta los 37 °C durante 1-2 minutos hasta fundir la solución. Se mezcló bien y se evitó la exposición a la luz y humedad.
- La mezcla enzimática *Pyruvate* se disolvió con 220 µl del *buffer Pyruvate Assay*.

2. Protocolo del ensayo:

- Primero se preparó la curva estándar del ensayo colorimétrico, diluyendo el piruvato estándar hasta 1 nmol/µl al añadir 10 µl del estándar a 990 µl del tampón. Posteriormente, se mezcló bien.
- Después se prepararon las muestras para el ensayo en 50 µl/pocillo de tampón en un plato de 96 pocillos. Se extrajeron las muestras con un volumen cuatro veces mayor de tampón y se centrifugó hasta obtener el extracto de piruvato.
- Para cada pocillo se preparó un total de 50 µl de *Reaction Mix*, que contenía los siguientes componentes: 46 µl de tampón, 2 µl de sonda y 2 µl de mezcla enzimática. Esta cantidad se añadió a cada pocillo con las muestras.
- Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, evitando la luz.
- Se midió a 570 nm en un microplato de lectura.
- El cálculo de la cantidad de piruvato se realizó utilizando la siguiente fórmula:  $C=Py/Sv$  (nmol/µl o mM), donde *Py* era la cantidad de piruvato

(nmol) de la muestra en relación con la curva estándar y  $S_v$  era el volumen de la muestra ( $\mu\text{l}$ ) añadido en el pocillo.

#### 4.5.2 Determinación de lactato

En el ensayo empleado el lactato reacciona con una mezcla enzimática para generar color ( $\lambda=570$  nm) y fluorescencia (Ex/Em=535/587 nm). El color/fluorescencia es proporcional al contenido de lactato de la muestra. Las principales características del *Lactate Assay Kit* (K607-100) son:

- Detección basada en la absorbancia (570 nm) o fluorescencia
- Permite utilizar muestras de cultivos celulares y tisulares, plasma, suero, medios de fermentación...
- Detección de 0.001 a 10 mM de lactato.
- Método sencillo

El *Lactate Assay Kit* contiene los componentes que se especifican en la tabla a continuación

**Tabla 4.8.** Componentes del *Lactate Assay Kit*.

COMPONENTES	100 ENSAYOS	COLOR	NÚMERO
Buffer <i>Lactate Assay</i>	25 ml	WM	K607-100-1
Sonda <i>Lactate</i>	200 $\mu\text{l}$	Rojo	K607-100-2A
Mezcla enzimática <i>Lactate</i>	Liofilizado	Verde	K607-100-4
Lactato estándar (100 nmol/ $\mu\text{l}$ )	100 $\mu\text{l}$	Amarillo	K607-100-5

Para medir la concentración de lactato mediante el ensayo colorimétrico se utilizaron 80  $\mu\text{g}$  de cada homogeneizado de proteínas y se siguieron las instrucciones del fabricante:

1. Preparación de los reactivos:

- La sonda *Lactate* se calentó a temperatura ambiente y se evitó la exposición a la luz.
- La mezcla enzimática *Lactate* se disolvió con 220  $\mu\text{l}$  del *buffer Lactate Assay*.

2. Protocolo del ensayo:

- Primero se preparó la curva estándar del ensayo colorimétrico, diluyendo el lactato estándar hasta 1 nmol/ $\mu\text{l}$  al añadir 10  $\mu\text{l}$  del estándar a 990  $\mu\text{l}$  del tampón. Posteriormente, se mezcló bien.
- Después se prepararon las muestras para el ensayo en 50  $\mu\text{l}$ /pocillo de tampón en un plato de 96 pocillos.
- Para cada pocillo se preparó un total de 50  $\mu\text{l}$  de *Reaction Mix*, que contenía los siguientes componentes: 46  $\mu\text{l}$  de tampón, 2  $\mu\text{l}$  de sonda y 2  $\mu\text{l}$  de mezcla enzimática. Esta cantidad se añadió a cada pocillo con las muestras.
- Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, evitando la luz.
- Se midió a 570 nm en un microplato de lectura.
- El cálculo de la cantidad de lactato se realizó utilizando la siguiente fórmula:  $C=L_y/S_v$  (nmol/ $\mu\text{l}$  o mM), donde  $L_y$  era la cantidad de lactato (nmol) de la muestra en relación con la curva estándar y  $S_v$  era el volumen de la muestra ( $\mu\text{l}$ ) añadido en el pocillo.

#### 4.6 DETERMINACIÓN DE BAX Y BCL-2

La expresión de Bcl-2 y Bax se detectó mediante dot-blot. El dot-blot es una técnica para detectar, analizar e identificar proteínas, similar al Western-blot pero con la diferencia de que las muestras de proteínas no se separan mediante electroforesis, sino que son depositadas a través de plantillas circulares directamente en la membrana sintética.

En resumen, el protocolo se realizó de la siguiente forma: las muestras de músculo fueron pulverizadas y solubilizadas con tampón Laemmli. La misma cantidad de proteínas (20 µg por pocillo) fue cargada en una membrana de nitrocelulosa dentro de un aparato de filtración múltiple dot-blot. La cantidad de proteínas fue determinada por el método del ácido bicinonínico (BCA). El análisis fue realizado mediante anticuerpos policlonales contra Bax y Bcl-2.

##### Descripción de la técnica de dot-blot

La transferencia de proteínas o “blotting” consiste en la inmovilización de las proteínas sobre membranas sintéticas para, a continuación, detectarlas mediante sistemas de tinción de las mismas. El método más potente es el denominado “Western blot”, en el que las proteínas son separadas en primer lugar mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y posteriormente se transfieren mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel.

Otro método empleado, más sencillo, consiste en aplicar las proteínas directamente en forma de una pequeña gota de una solución concentrada sobre la membrana. La absorción de la gota provoca la adhesión de la proteína a la membrana, quedando en forma de una mancha o “dot”. Esta técnica es la empleada en nuestro caso.

Existen dispositivos que facilitan la aplicación de las proteínas directamente a la membrana, aplicando una succión que facilita la penetración de la solución (Fig. 4.6). Estos dispositivos se denominan “dot blot” o “slot blot”, en función de que la proteína quede aplicada en forma de gota circular o de una línea.



**Fig. 4.6.** Ejemplo de dispositivo dot-blot

El trabajar con las proteínas fijadas sobre una membrana en lugar del gel tiene una serie de ventajas: son más rápidas de teñir y desteñir, se detectan cantidades menores de proteínas pues se concentran en la superficie y no se diluyen en todo el espesor del gel, las membranas son más fáciles de manipular que el propio gel.

Cualquier procedimiento de “blotting” consta de 5 etapas:

1. Inmovilización de proteínas sobre la membrana, ya sea mediante transferencia (electroforética, aspiración, presión...) o mediante aplicación directa.
2. Saturación de todos los lugares de unión de proteínas de la membrana no ocupados para evitar la unión no específica de anticuerpos, que son proteínas.
3. Incubación del “blot” con anticuerpos primarios contra la/s proteína/s de interés.
4. Incubación del “blot” con anticuerpos secundarios, o reactivos que actúan de ligando del anticuerpo primario unidos a enzimas u otros marcadores.
5. Incubación con los sustratos apropiados en aquellas bandas de proteínas marcadas con enzimas para formar productos coloreados insolubles en el lugar donde se encuentran las bandas de proteína.

#### Materiales empleados

-Dispositivo dot-blot de filtración

-Membrana de nitrocelulosa de polifluoruro de vinilideno (PVDF)

-Papel de filtro

-Tampón Laemmli

Se preparó Laemmli 10x con:

- Tris base 30.3 gr
- Glycina 144 gr
- SDS 10 gr
- Agua destilada hasta completar 1 l

De este tampón Laemmli 10x se hace una dilución de una parte de 10x y 9 partes de agua destilada, siendo este el tampón empleado.

-PBS para lavado

-Albúmina de suero bovino (BSA)

-Anticuerpos primarios:

- Anti-Bax (IgG policlonal de conejo, de Oncogene®; Cat.PC 66-100 UG)
- Anti-Bcl2 (IgG monoconal de ratón, de Oncogene®, Cat.OP 66-100 UG)
- Anti- $\beta$ -actina (IgG monoclonal de ratón, de SIGMA®, A-5441)

-Anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa de rábano

- IgG Anti-ratón, BD Pharmingen®
- IgG Anti-conejo, CHEMICON®

-ECL plus (Amersham, cod. RPN 2132)

### Cuantificación de las proteínas de la muestra

La cuantificación de proteína se estimó utilizando el *kit Pierce*<sup>®</sup> *BCA Protein Assay*, técnica ya descrita previamente en esta tesis (págs. 114-118).

### Protocolo dot-blot

1. Inmovilización de proteínas sobre la membrana. En primer lugar se preparó la membrana de nitrocelulosa: se lavó con metanol y a continuación con tampón neutro (PBS), depositándose sobre el papel de filtro. A continuación se colocaron ambos dentro del dispositivo del dot-blot y se cargó mediante pipetas de boca estrecha la misma cantidad de

proteínas de cada muestra, 20 µg por pocillo, que de tampón Laemmli en los orificios.

Una vez cargados todos se aplica vacío en el dot-blot para acelerar la transferencia y a continuación se realizan lavados con PBS, extrayendo después la membrana del dispositivo.

2. Saturación de los lugares de unión de proteínas de membrana. El bloqueo de los sitios de unión no-específicos de las proteínas se realizó con BSA.
3. Incubación con anticuerpo primario. La incubación con los anticuerpos policlonales anti-Bax y anti-Bcl-2 se realizó con una dilución de 1:1000 durante 1 hora a temperatura ambiente, según la bibliografía. También se realizó un control de carga con β-actina para normalizar las muestras.
4. Incubación con anticuerpo secundario. A continuación se realizaron lavados con PBS (3 durante 5 minutos) y se incubaron con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (anticuerpos antiespecie anti-ratón y anti-conejo, obtenidos inoculando en la especie productora inmunoglobulinas de la especie a detectar) con una dilución de 1:1500 durante 1 hora a temperatura ambiente.
5. Incubación con el sustrato. Nuevamente se realizaron lavados con PBS y se incubó con ECL plus (Amersham Bioscience, cod. RPN 2132). Inmediatamente después de la oxidación se leyó a 428 nm, con un máximo de emisión entre 15 y 20 minutos después de iniciada la reacción.

#### 4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante tests no paramétricos (U de Mann-Whitney, Wilcoxon). Se exigió un valor de p menor de 0.05 para considerar diferencias estadísticamente significativas. El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante el programa IBM -SPSS para Windows. Versión 16.0 ( SPSS Inc.,CA,USA) .



## 5. RESULTADOS

### 5. 1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

En la *Tabla 5.1* se resumen las características clínicas de los pacientes.

<b>Características de los pacientes</b>	
Edad (años)	76 (63-84)
Sexo varón	8 /10
Hipertensión arterial	7 /10
Diabetes mellitus	7 /10
Dislipemia	5 /10
Fumador (*)	4 /10
Enfermedad coronaria	5 /10
Insuficiencia renal	3 /10
Enfermedad cerebrovascular	3 /10

*Tabla 5.1.- Características clínicas de los pacientes. \*Fumador actual y hasta 10 años antes.*

## 5.2. ANÁLISIS ENZIMÁTICO

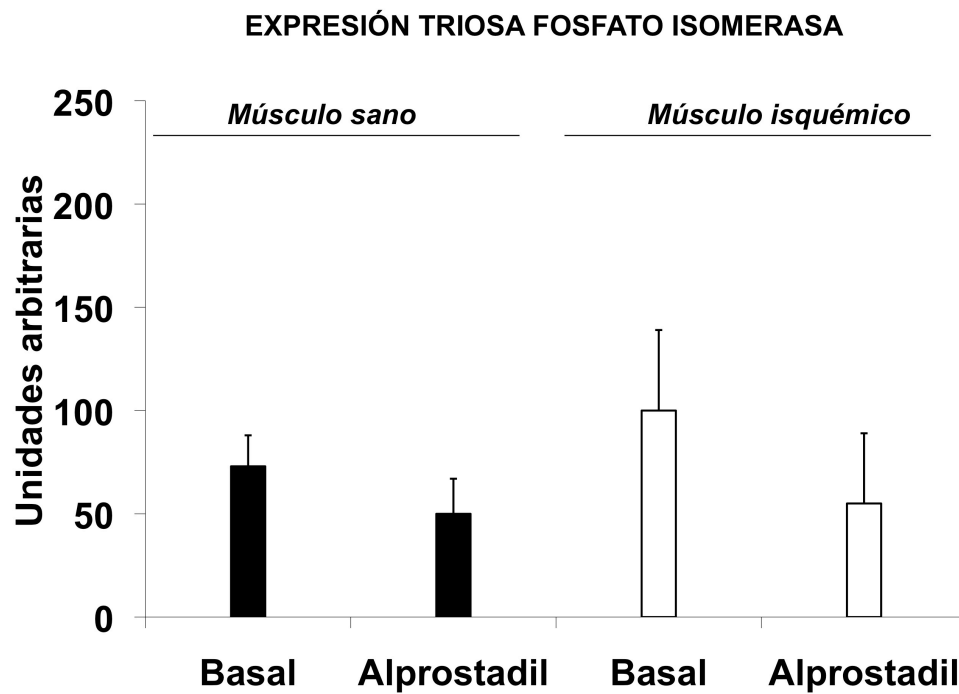
El análisis proteómico que realizamos se centró en las principales proteínas implicadas en las distintas vías metabólicas de la célula muscular. Los resultados se resumen en la *Tabla 5.2*.

	Grupo Sano		Grupo Isquémico	
	Basal	Alprostadil	Basal	Alprostadil
<b>TPI (UAD)</b>	73 $\pm$ 15	50 $\pm$ 17	100 $\pm$ 39	55 $\pm$ 34
<b>MDH (UAD)</b>	2196 $\pm$ 348*	2088 $\pm$ 177	644 $\pm$ 192*	761 $\pm$ 273
<b>LDH (10<sup>5</sup>UAE/ml)</b>	35,75 $\pm$ 9,51	63,25 $\pm$ 9,98	35,36 $\pm$ 12,15	53,15 $\pm$ 7,72
<b>Lactato (<math>\mu</math>mol/l)</b>	0,22 $\pm$ 0,044	0,24 $\pm$ 0,046	0,109 $\pm$ 0,01	0,113 $\pm$ 0,01
<b>Piruvato (<math>\mu</math>mol/l)</b>	1,46 $\pm$ 0,28	1,53 $\pm$ 0,28	1,24 $\pm$ 0,31	1,59 $\pm$ 0,26
<b>PC (UAD)</b>	1,80 $\pm$ 1,27†	6,72 $\pm$ 2,13†	3,16 $\pm$ 2,25†	8,16 $\pm$ 3,63†

**Tabla 5.2.** Proteínas implicadas en las distintas rutas metabólicas y sus productos. TPI: triosa-fosfato-isomeras, MDH: malato deshidrogenasa, LDH: lactato deshidrogenasa, PC: piruvato carboxilasa. UAD: Unidades Arbitrarias Densitométricas, UAE: Unidades de Actividad Enzimática

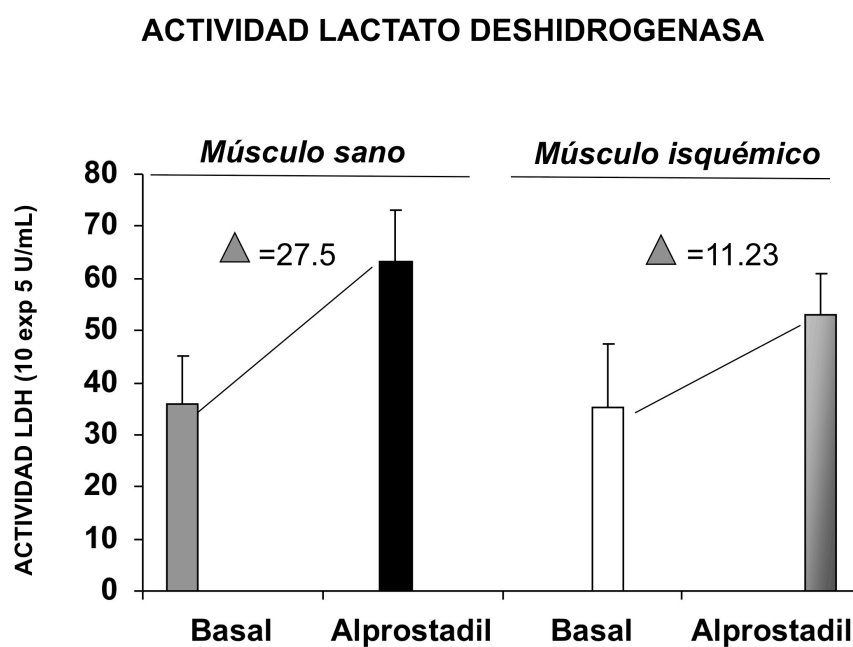
\* $p < 0,05$  Grupo S vs Grupo I; †  $p < 0,05$  basal vs alprostadil

En cuanto a los enzimas glucolíticos, la triosa-fosfato-isomerasa, una de las enzimas claves en la regulación de la vía glucolítica, no mostró diferencias en el músculo isquémico frente al sano, ni tampoco al incubarlo con alprostadil. *Fig. 5.1*



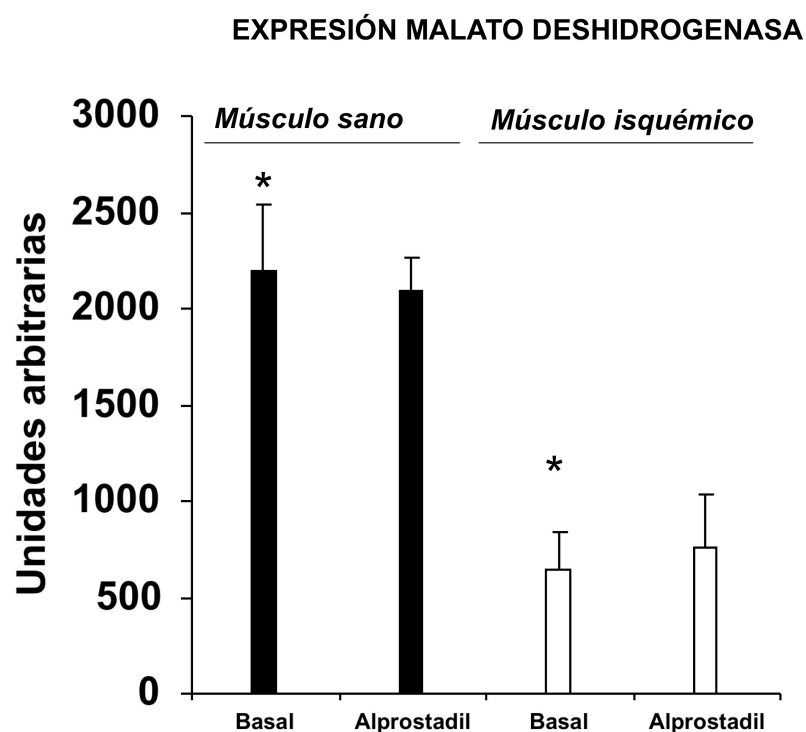
*Figura 5.1. Expresión de Triosa fosfato Isomerasa*

En cuanto a la vía anaeróbica, se observó un aumento de la lactato deshidrogenasa (LDH) al incubar con Alprostadil tanto en el grupo S como en el I, aunque no significativo (*Fig. 5.2*).



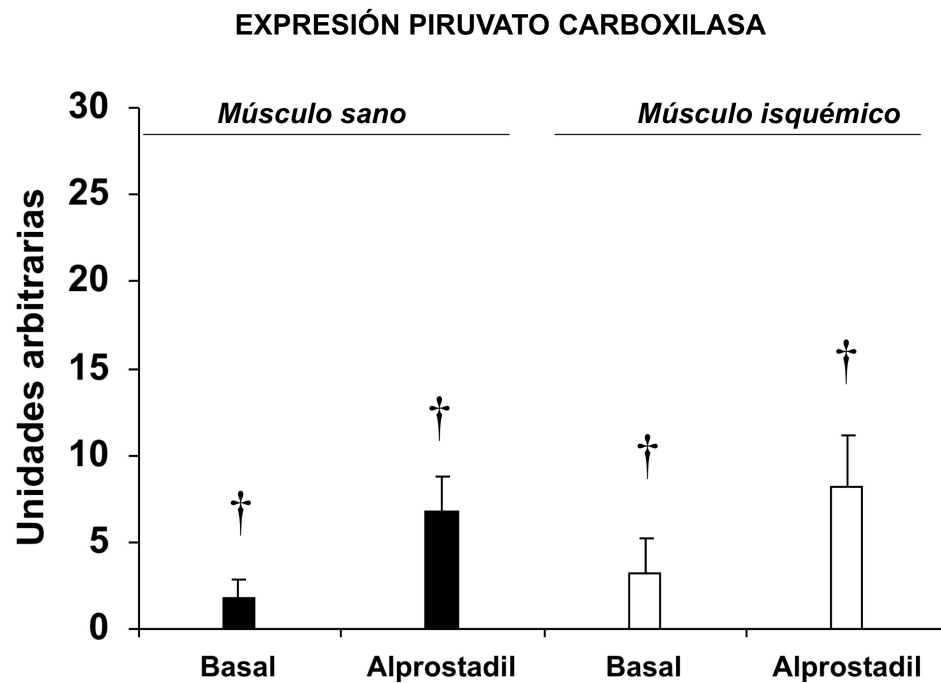
*Fig 5.2. Actividad enzimática de Lactato Deshidrogenasa*

Respecto a las proteínas del ciclo de Krebs, se observó una disminución significativa de la malato deshidrogenasa (MDH) en el músculo isquémico respecto al músculo sano, sin existir diferencias al incubar con alprostadil. *Fig. 5.3*



*Fig. 5.3. Expresión de Malato Deshidrogenasa, disminución significativa. \* $p < 0.05$  respecto a músculo control sin alprostadil*

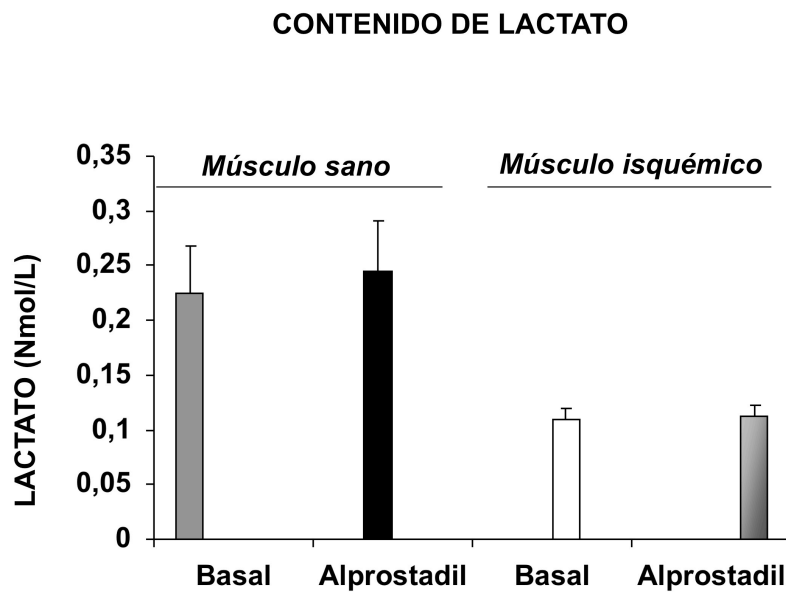
La piruvato carboxilasa se elevó en las muestras incubadas con alprostadil 5 ng/ml, tanto en el control como en el músculo isquémico. (Fig. 5.4).



*Fig. 5.4. Expresión de Piruvato Carboxilasa, †  $p < 0,05$  basal vs alprostadil*

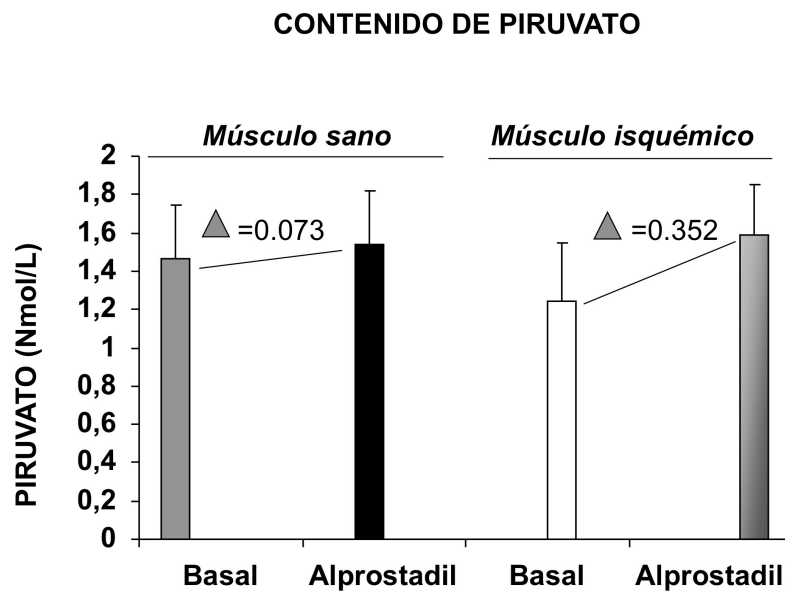
### 5.3. CONTENIDO DE LACTATO Y PIRUVATO

El Lactato no presentó diferencias significativas en el valores músculo isquémico respecto al sano, tampoco al añadir Alprostadil. (*Fig. 5.5*).



*Fig. 5.5. Contenido de Lactato*

No se observaron diferencias en los niveles de piruvato en ninguna de las muestras (Figura 5.6).



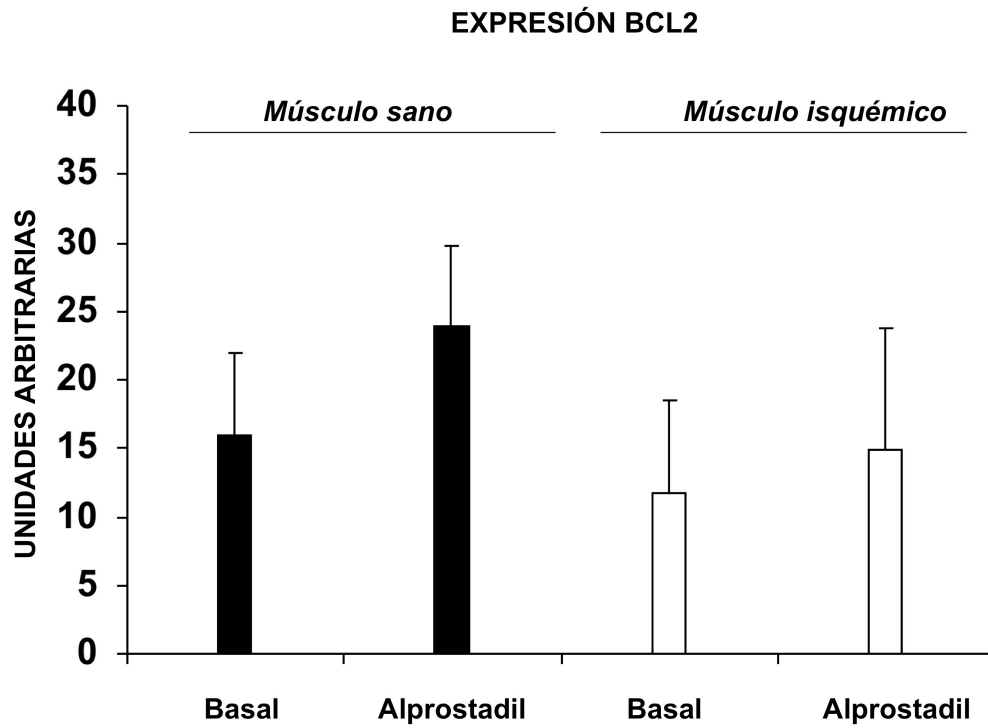
*Fig. 5.6. Contenido de Piruvato*

#### 5.4 DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE APOPTOSIS

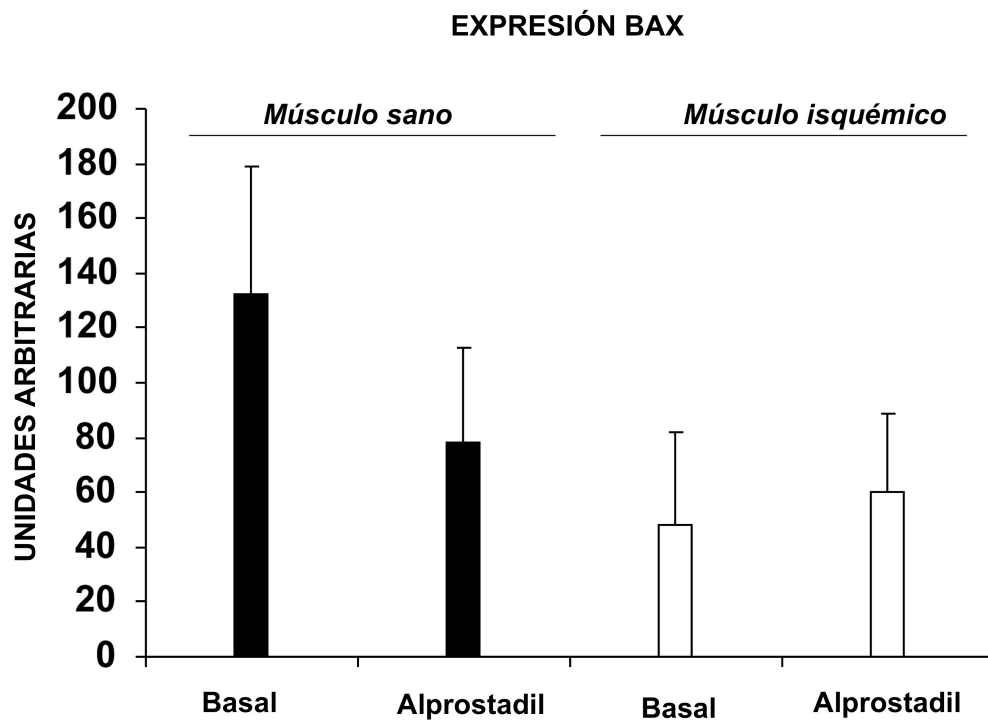
En cuanto a los valores obtenidos de los marcadores de apoptosis , no se encontraron diferencias estadísticamente significativas . Se resumen en la *tabla 5.3* y en las *figuras 5.7* y *5.8*.

	Grupo S		Grupo I	
	Basal	Alprostadil	Basal	Alprostadil
<b>Bax (UAD)</b>	132.5± 47.1	78.6± 35.8	48.6± 34.7	60.4± 29.1
<b>Bcl-2 (UAD)</b>	16.3±6.3	23.9±5.9	11.8±6.8	14.9±8.9

*Tabla 5.3. Proteínas implicadas en la apoptosis. UAD: Unidades Arbitrarias Densitométricas*



*Fig. 5.7* Expresión de Bcl-2



*Fig. 5.8* Expresión de Bax

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 EN RELACIÓN A LAS PROTEINAS DEL METABOLISMO ENERGÉTICO

Las proteínas están envueltas en todas las funciones celulares, controlan cualquier mecanismo que ocurre en el interior celular y son modificadas en diferentes enfermedades.

El proteoma de una célula es el conjunto de proteínas que se expresan en una célula. Por lo tanto, el proteoma dicta el fenotipo de la célula y su funcionalidad así como la funcionalidad del tejido en el cual la célula está contenida. El fenotipo puede variar en condiciones normales, únicamente por el estado de crecimiento de la célula o la edad, además de evidentemente variar por la intervención en respuesta a los estímulos que aparecen durante enfermedades crónicas o agudas. Las proteínas pueden sufrir modificaciones postransduccionales debido a situaciones patológicas o incluso a tratamientos farmacológicos.

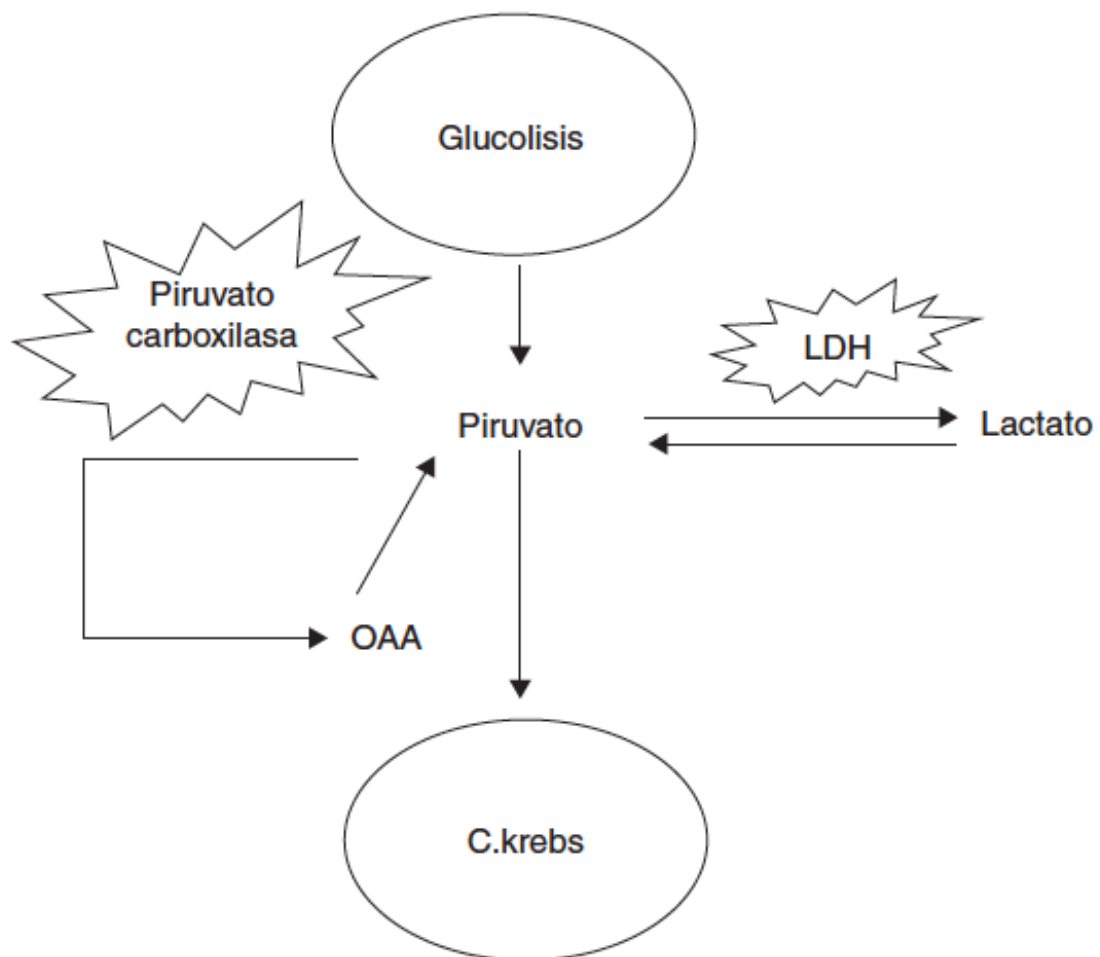
El proteoma, por lo tanto, es un elemento dinámico de la célula, a diferencia del genoma que es un elemento estático.

La proteómica es el estudio del proteoma, o lo que es lo mismo de las proteínas de una célula que se expresan en un momento dado, pero no sólo aquellas que aparecen en la célula mediante la expresión de un gen, sino también todas aquellas modificaciones proteicas debidas a transcritos alternativos o modificados en el proceso postranslacional así como la combinación de estos dos.

En resumen, y en términos sencillos, la proteómica nos va a permitir comparar la expresión proteica general de las células, sometidas a diferentes maniobras experimentales. Hasta el momento actual la proteómica en investigación cardiovascular se ha realizado mayoritariamente en miocardiopatías(141-142)

La glicolisis es una de las vías metabólicas principales de obtención de la energía. Los 10 pasos enzimáticos de conversión de la glucosa en piruvato se continúan en condiciones aeróbicas con la reacción del ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa.

Sin embargo, bajo condiciones anaeróbicas, el piruvato es convertido en lactato en los tejidos musculares (*Fig. 6.1*).



**Fig. 6.1** Esquema de las vías metabólicas. LDH: Lactatodeshidrogenasa, OAA: Oxalacetato

En los últimos años se han realizado múltiples estudios de proteómica en el músculo esquelético(143). Los niveles de expresión y las modificaciones post-transduccionales

de los enzimas glicolíticos están claramente alterados durante el desarrollo, o distintos procesos adaptativos fisiológicos como la actividad neuromuscular aumentada o la atrofia por desuso. La vía glicolítica también se modifica en muchas enfermedades neuromusculares, incluyendo la debilidad en la contracción muscular relacionada con la diabetes, la distrofia muscular o la sarcopenia de la vejez.

La isquemia crónica de miembros inferiores supone una situación patológica a nivel del músculo, con una disminución del aporte sanguíneo, y con ello de oxígeno y otras sustancias, ante el que se establecen respuestas a nivel molecular. En este estudio hemos analizado la proteómica de las células musculares en pacientes con isquemia de la extremidad, a nivel de los principales enzimas metabólicos y sus productos, y su relación con el músculo sano. Así mismo, se estudia por primera vez el efecto del alprostadil sobre ambos.

Hemos encontrado en el músculo isquémico una disminución de la malato-DH, enzima del Ciclo de Krebs, no encontrándose diferencias en la glucolisis (triosa-fosfato-isomerasa) . En cuanto a la vía anaeróbica, se observó un aumento de la lactato deshidrogenasa (LDH) al incubar con Alprostadil tanto en el grupo S como en el I, aunque no significativo , sin embargo no hubo diferencias significativas del lactato en musculo isquémico frente al sano ni tampoco con Alprostadil.

El Alprostadil produjo un aumento de la Piruvato Carboxilasa tanto en el músculo sano como en el isquémico con significación estadística. El estado isquémico también produce un aumento de la Piruvato Carboxilasa, enzima implicada en el complejo que transforma piruvato en acetil CoA, probablemente como intento de mecanismo compensador por la falta de actividad del ciclo de Krebs. Es posible que el aumento de Piruvato Carboxilasa observado con Alprostadil sea debido a un mecanismo de retroalimentación en respuesta al no aumento de la actividad del ciclo de Krebs. Este

efecto de retroalimentación también se observó en el tejido sano, lo que sugiere que se potencia el mecanismo compensador observado en condiciones sin Alprostadil.

La reducción de malato-DH en el músculo isquémico sugiere una reducción del ciclo de Krebs, en relación con un menor aporte de oxígeno en el músculo isquémico.

La no modificación de lactato-DH, ni del contenido de lactato, podría indicar que Alprostadil, probablemente a través de su conocida actividad de estimulación del AMP cíclico-proteína quinasa A, haría que el acetyl CoA, generado a expensas del aumento de piruvato carboxilasa, se metabolizara a través de la generación de ácidos grasos mediante la lipogénesis

Si bien no se han encontrado referencias a alteraciones en el perfil proteómico de marcadores del metabolismo energético en el músculo sometido a isquemia crónica, si se han encontrado referencias de variaciones del mismo en la diabetes, obesidad y en pacientes ancianos, factores altamente prevalentes en la isquemia crónica de MMII.

El análisis proteómico del músculo vasto lateral en pacientes con diabetes mellitus tipo II, muestra una serie de marcadores de diabetes, como son la anormal fosforilación de la ATP sintetasa y niveles elevados de proteínas de stress (144,145). Así mismo estudios realizados sobre músculo gastronómico en un modelo de rata diabética muestra cambios en las proteínas asociadas a la contracción, sistema de defensa antioxidante, mecanismos de detoxificación, metabolismo de glucosa y utilización de ácidos grasos(146,147). El análisis proteómico en modelos de pacientes obesos y potencialmente prediabéticos, muestra una alteración generalizada en la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo energético en estos pacientes (148).

En pacientes ancianos también se han identificado alteraciones en el perfil proteómico de marcadores del metabolismo energético en el músculo. Análisis proteómicos de

fragmentos de músculos añosos muestran diferentes efectos sobre las enzimas mitocondriales(149-152). Chang et al (149) estudiaron el efecto de la edad y la restricción calórica en el proteoma de la mitocondria de la rata. En músculos esqueléticos, la isocitrato deshidrogenasa y la malato deshidrogenasa se incrementaron en ratas de 25 meses respecto a ratas de 6 meses. La restricción calórica tiene un efecto minoritario en estos cambios. Se han observado cambios importantes en el metabolismo energético en preparaciones mitocondriales en extractos de músculo gastronómico en preparaciones de ratas de 3 meses respecto ratas de 26 meses (151). Estos músculos representan muestras de adultos jóvenes frente a ancianos. Análisis realizados mediante electroforesis en gel demostraron una elevación edad dependiente en numerosos enzimas mitocondriales, incluyendo la NADH deshidrogenasa, ATPasa sintetasa, succinato deshidrogenasa(149-152).

Diversos estudios muestra la aparición de cambios postranscripcionales en las enzimas mitocondriales en el musculo esquelético con la edad (153), que alterarían la estabilidad de las proteínas, las interacciones intra e intermoleculares, así como la eficiencia en la unión de los sustratos con sus sitios activos en las enzimas mitocondriales afectadas, todo lo cual explicaría la disfunción mitocondrial en fibras musculares ancianas (153), con una disminución en la capacidad de la extracción de oxígeno(154-157).

En nuestro estudio hemos encontrado una disminución de la malato-DH en las muestras de músculo isquémico, al contrario de lo que ocurre en pacientes ancianos. Se podría pensar que de esta forma la isquemia crónica contribuye a aumentar la función mitocondrial que se observa de forma habitual en el musculo añoso, tal y como se ha visto en los estudios anteriormente mencionados.

Según los resultados obtenidos, el Alprostadil no modifica esta vía directamente pero estimula la expresión de Piruvato Carboxilasa. (*Fig 6.1*).

Entre las limitaciones del estudio, se ha realizado con cultivos de tejidos. Hay que contar con la limitación intrínseca que supone un estudio *in vitro*, que no refleja las distintas interacciones que tendrán lugar en el conjunto del organismo. Asimismo, la identificación de las proteínas mediante la doble electroforesis no es exacta, y puede subestimar la presencia de elementos poco abundantes, las proteínas integradas en la membrana o componentes con peso molecular muy elevado (158-161). Además, aquellas proteínas con valores de pI extremos no suelen ser bien detectadas en sistemas con un amplio rango de pI. Otra cuestión importante es la distorsión de los puntos de proteínas debido a la presencia de distintas especies o isoformas con extensas modificaciones postranslacionales. El análisis mediante espectrometría de masas en ese sentido resuelve la mayoría de estos problemas.

## 6.2 EN RELACIÓN A LAS PROTEINAS DE LA APOPTOSIS

En los últimos diez años se han publicado hallazgos que sugieren que la regulación de la apoptosis puede estar alterada en diversas enfermedades del corazón y de los vasos sanguíneos.

En efecto, son muy abundantes los trabajos experimentales que describen la aparición de apoptosis en cardiomiocitos sometidos a isquemia y/o reperfusión (162). Además, una exagerada apoptosis de los cardiomiocitos se ha objetivado en pacientes con infarto agudo de miocardio (163,164) y con cardiopatía isquémica e insuficiencia cardíaca (165,166). Por otra parte, diversos estudios demuestran que la sobrecarga mecánica (167) y los agonistas vasoconstrictores como la angiotensina II (168) inducen la

apoptosis de los cardiomiocitos. De hecho, la apoptosis de los cardiomiocitos es mayor en el ventrículo izquierdo de las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) que en el de las ratas normotensas Wistar-Kyoto, especialmente cuando las primeras desarrollan insuficiencia cardíaca (169). Queda por demostrar si la apoptosis puede ser la causa del menor número de cardiomiocitos presente en el ventrículo izquierdo de pacientes hipertensos sin enfermedad coronaria (170) y si ello sería el resultado de una susceptibilidad exagerada de dichas células para morir vía apoptosis (171).

A nivel de las células musculares lisas, la regulación de la proliferación y de la muerte por apoptosis en éstas es un determinante importante en la configuración de la estructura normal de la pared vascular en condiciones fisiológicas. Por ello, el predominio de la proliferación sobre la apoptosis se ha propuesto como el mecanismo responsable de la acumulación de células musculares, que facilita el engrosamiento de la capa media y de la pared de las arterias pequeñas en la hipertensión arterial (172) y que contribuye a la reestenosis tras la angioplastia (173).

Por el contrario, se ha descrito que las células musculares lisas vasculares que han emigrado al espacio subintimal en una placa aterosclerótica presentan apoptosis más frecuentemente que las células que aún permanecen en la media (174). La exagerada apoptosis de estas células puede ser un factor determinante de la vulnerabilidad de una placa aterosclerótica, pues comportaría una disminución de su número y una menor capacidad para la síntesis de colágeno fibrilar (175). Ello, combinado con la liberación desde los macrófagos de las metaloproteinasas de matriz que degradan las fibras de colágeno, daría lugar a una cápsula fibrosa más frágil (176). En el desencadenamiento de la apoptosis de las células musculares se han implicado diversas citocinas secretadas por las células espumosas presentes en la lesión (177,178).

A nivel del endotelio la apoptosis parece ser el principal mecanismo de muerte del endotelio en condiciones fisiológicas. Por otra parte, el equilibrio proliferación-apoptosis de las células endoteliales desempeña un papel crítico en la formación y regresión de los vasos sanguíneos, especialmente las arteriolas y los capilares. Por ello, una excesiva apoptosis de estas células puede estar implicada tanto en la disfunción endotelial, como en la inhibición de la angiogénesis, descritas en diversas enfermedades vasculares (179).

Especialmente relevante puede ser la participación de la apoptosis endotelial en la patogenia de la aterosclerosis. Las células endoteliales apoptóticas presentan modificaciones fenotípicas de su superficie que se traducen en un aumento en la expresión de moléculas de adhesión (180) y de factor tisular procoagulante (181). Lo primero participaría en los estadios iniciales de la formación de la lesión aterosclerótica, mientras que lo segundo contribuiría a la complicación trombótica de la misma. Las lipoproteínas aterogénicas, especialmente las formas oxidadas, podrían ser las inductoras de la apoptosis de las células endoteliales en el contexto de la aterosclerosis (182-184)

No se han encontrado referencias a la implicación de los mecanismos de apoptosis en el músculo en situaciones de isquemia crónica. En nuestro estudio se estudia por primera vez si existen diferencias en cuanto a los marcadores de apoptosis en el músculo sano frente al isquémico, no encontrándose diferencias. Esto podría deberse a que la isquemia producida en el músculo esquelético conllevara a un fenómeno de necrosis tisular no dependiente de muerte celular programada.

La implicación de las prostaglandinas en la muerte celular por apoptosis aún no está bien comprendida y es muy compleja; pues en unos casos se muestran antiapoptóticas y en otros proapoptóticas. Las observaciones indican que esta diferencia varía según la

prostaglandina, la población celular sobre la que actúa y la concentración de éstas. Por ejemplo, en células cancerosas de colon, la PGE2 activa la expresión de Bcl-2, una proteína antiapoptótica que favorece el crecimiento del tumor, por esta razón, en el cáncer de colon se recomienda el uso de inhibidores de COX. En cambio, en los linfocitos T, la PGE2 no muestra efectos sobre la expresión de Bcl-2, pero sí muestra activación de Myc, proteína proapoptótica, responsable de la fragmentación del DNA. En estas mismas células existe la observación de que la PGE2 incrementa la apoptosis. Se ha reportado que la PGE2 induce apoptosis dependiendo de la dosis en el SNC al activar el receptor EP2 y la subsecuente activación de la caspasa-3. (185)

En nuestro estudio no hemos encontrado influencia de la PGE1 sobre los marcadores apoptóticos Bcl-2 y BAX 2. Esto vuelve a sugerir un mecanismo de muerte tisular por necrosis independiente de muerte celular programada. Además es evidente que los cambios observados sobre las enzimas del metabolismo no están relacionados con modificaciones en Bcl-2 ni Bax.

Existen, como en el caso del análisis del metabolismo energético, limitaciones inherentes al estudio. La detección in situ de las células apoptóticas presenta actualmente varias limitaciones, derivadas de la propia biofisiología del proceso: su corta duración, que afecta a células aisladas y que tras su resolución por fagocitosis no persisten lesiones residuales. Por lo tanto, la identificación y la cuantificación de la apoptosis en los tejidos requiere estudios muy minuciosos y exhaustivos. A ello se añade que ninguna de las técnicas bioquímicas e histológicas hoy día utilizadas es suficientemente específica o sensible, por lo que se recomienda el uso combinado de varias de ellas : la electroforesis en gel para detectar la presencia de la fragmentación apoptótica del ADN que da lugar a la imagen típica en escalera, las técnicas

inmunohistoquímicas destinadas a marcar en las células los extremos 3' de los fragmentos del ADN ( Taq polimerasa, transferasa deoxinucleótido terminal, Pfu polimerasa) o a identificar en la membrana celular sustancias como la anexina y las técnicas que evalúan la expresión y la actividad de las caspasas. Para el diagnóstico sistémico de la apoptosis se pueden detectar en sangre ciertos marcadores del proceso apoptótico. Pudiera ser que si se alterase el efecto sobre otras proteínas implicadas en la apoptosis, tal y como se ha descrito a nivel de las células del cáncer de colon.

Tampoco sabemos si dosis mayores de PGE1, pudieran tener alguna influencia sobre el tejido muscular.

## 7. CONCLUSIONES

1. Durante la isquemia del músculo esquelético se produce una reducción de la expresión de malato-DH, lo que podría sugerir un defecto en la actividad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs).
2. El estado isquémico también produce un aumento de la Piruvato Carboxilasa, enzima implicada en el complejo que transforma piruvato en acetil CoA, probablemente como intento de mecanismo compensador por la falta de actividad del ciclo de Krebs.
3. No se observaron cambios significativos en el nivel de biomarcadores asociados con apoptosis (Bcl-2, Bax) entre el tejido isquémico y el sano. Esto podría deberse a que la isquemia producida en el músculo esquelético conllevara un fenómeno de necrosis tisular no dependiente de muerte celular programada.
4. El Alprostadil no modificó la expresión de malato-DH en el músculo isquémico. Tampoco se observó modificaciones en la expresión de la lactato-DH pero si aumentó la expresión de Piruvato Carboxilasa.

5. Es posible que el aumento de piruvato carboxilasa observado con Alprostadil sea debido a un mecanismo de retroalimentación en respuesta al no aumento de la actividad del ciclo de Krebs. Este efecto de retroalimentación también se observó en el tejido sano, lo que sugiere que se potencia el mecanismo compensador observado en condiciones sin Alprostadil.
  
6. La no modificación con el fármaco de lactato-DH, ni del contenido de lactato, podría indicar que Alprostadil, probablemente a través de su conocida actividad de estimulación del AMP cíclico-proteína kinasa A, haría que el acetil CoA, generado a expensas del aumento de piruvato carboxilasa, se metabolizara a través de la generación de ácidos grasos mediante la lipogénesis.
  
7. Alprostadil no modificó los parámetros de apoptosis Bcl-2 y Bax. Esto vuelve a sugerir un mecanismo de muerte tisular por necrosis independiente de muerte celular programada. Además es evidente que los cambios observados sobre las enzimas del metabolismo no están relacionados con modificaciones en Bcl-2 ni Bax.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Biblioteca digital de la Universidad de Chile. Biofisiopatología muscular. (7ª edición). 2007; 120-121.
2. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J.D. "The cytoskeleton". Molecular Biology of the cell (2ª edición). Garland Publishing Inc. Nueva York y Londres. 1989; 614-680,
3. Cooke R. "The mechanism of muscle contraction". CRC Crit. Rev. Biochem. 1986; 23, 53-118,
4. Cooke R. "Force generation in muscle". Current Opinion Cell Biol. 1990; 2, 62-66,.
5. Darnell J, Lodish H, Baltimore D. "Molecular Cell Biology" (2ª edición). Scientific American Books, 1990.
6. Goldman Y.E. "Kinetics of the actomyosin ATPase in muscle fibers". Ann. Rev. Physiol. 1987; 49, 637-654..
7. Hibberd M.G, Trentham D.R. "Relationships between chemical and mechanical events during muscular contraction". Ann. Rev. Biophys. Chem. 1986; 15, 119-161.
8. Huxley A.F. "Muscular contraction" J. Physiol. 1974; 243, 1-43,.
9. Johnson K., A "Pathway of the microtubule-dynein ATPase and the structure of dynein: A comparison with actomyosin". Ann. Rev. Biophys. Chem. 1985; 14, 161-188.
10. Lackie J.M. "Cell movement and cell behaviour". Allen and Unwin, Londres. 1986.
11. Needham D.M. "Machina carnis: The biochemistry of muscular contraction in its historical development". Cambridge University Press. Londres. 1971.

12. Pollard T.D, Cooper J.A. "Actin and actin-binding proteins.A critical evaluation of mechanisms and functions". *Ann. Rev. Biochem.* 1986; 55,987-1035.
13. Syrový I. "Isoforms of contractile proteins". *Prog.Byophys.Molec.Biol.* 1987; 49,1-27.
14. Vale R.B, "Microtubule-based motor proteins". *Current Opinion Cell Biol.* 1990; 2, 15-22.
15. Vallee R.B., Shpetner H.S., Paschal B.M., "The role of dynein in retrograde axonal transport". *Trends Neurosci.* 1989;12,66-70.
16. Zot A.S., Potter J.D."Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction". *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 1987;16,535-559.
17. Nelson D, Cox M (ed). *Principles of Biochemistry.* "Glycolysis, gluconeogenesis and the pentose phosphate pathway". Lehninger. W.H.Freeman; 2004.
18. Criqui MH, Fronek A, Barrett-Connor E, Klauber MR, Gabriel S, Goodman D. "The prevalence of peripheral arterial disease in a defined population". *Circulation* 1985.Mar;71(3):510-5
19. Hiatt WR, Hoag S, Hamman RF. "Effect of diagnostic criteria on the prevalence of peripheral arterial disease". *The San Luis Valley Diabetes Study. Circulation* 1995.Mar 1;91(5):1472-9
20. Selvin E, Erlinger TP. "Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the Nacional Health and Nutrition Examination Survey", 1999-2000. *Circulation* 2004. Aug 10;110(6):738-43.
21. Norgren L, Hiatt W, Dormandy J, Nehler M, Harris K, Fowkes F. "Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II)". *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2007;33 Suppl1:S1-75

22. Khot UN, Khot MB, Bajzer CT, Sapp SK, Ohman EM, Brener SJ, et al. "Prevalence of conventional risk factors in patients with coronary heart disease". JAMA.2003 Aug 20;290(7): 898-904
23. Greenland P, Knoll MD, Stamler J, et al. "Major risk factors as antecedents of fatal and nonfatal coronary heart disease events". JAMA.2003 Aug 20;290(7). 891-7
24. Hirsch AT, Treat-Jacobson D, Lando HA, Neaton JD, Dyer AR, Garside DB, et al. "The role of tobacco cessation, antiplatelet and lipid-lowering therapies in the treatment of peripheral arterial disease". Vasc Med 1997;2(3):243-51
25. Jonason T, Bergstrom R. "Cessation of smoking in patients with intermittent claudication". Acta Med Scand 1987;221(3):253-60
26. Quick CR.G, Cotton LT. "The measured effect of stopping smoking on intermittent claudication". Br J Surg. 1982;69 Suppl:S24-6.
27. Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, et al. "ACC/AHA 2005 guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): executive summary a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Ang" . Circulation 2006 Mar 21; 113(11): 463-654.
28. Cole CW, Hill GB, Farzad E, Moher D, Rody K, Shea B, et al. "Cigarette smoking and peripheral occlusive disease". Surgery.1993.Oct;114(4):753-6
29. Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G, Rami T, Brancati FL, Powe NR, et al. "Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus". Ann Intern Med 2004 Sep 21;141(6):421-31

30. Molgaard J, Malinow MR, Lassvik C, Holm AC, Upson B, Olsson AG, et al. "Hyperhomocyst(e)inaemia: an independent risk factor for intermittent claudication". *J Intern Med* 1992 Mar; 231 (3): 273-9
31. Rossi E, Biasucci LM, Citterio F, Pelliccioni S, Monaco C, Ginnetti F, et al. "Risk of myocardial infarction and angina in patients with severe peripheral vascular disease: predictive role of C-reactive protein". *Circulation*.2002 Feb 19;105(7):800-3
32. Ouriel K, Veith FJ, Sasahara AA. "A comparison of recombinant urokinase with vascular surgery as initial treatment for acute arterial occlusion of the legs. Thrombolysis or Peripheral arterial surgery. TOPAS investigators". *N England J Med*.1998 Apr 16; 338(16): 1105-11
33. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. "Lesson from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions". *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 May;20(5): 1262-75
34. McDermott MM, Criqui MH, Greenland P, Guralnik JM, Liu K, Pearce WH, et al. "Leg strength in peripheral arterial disease: associations with disease severity and lower-extremity performance". *J Vasc Surg*. 2004 Mar;39 (3):523-30
35. Kannel WB, Skinner JJ, Schwartz MJ, Shurtleff D. "Intermittent claudication. Incidence in the Framingham Study". *Circulation* 1970 May;41(5):875-83
36. Rothwell PM, Eliasziw M, Gutnikov SA, Warlow CP, Barnett HJ. "Endarterectomy for symptomatic carotid stenosis in relation to clinical subgroups and timing of surgery". *Lancet*.2004 Mar 20;363 (9413):915-24

37. Hirsch A, Criqui M, Treat-Jacobson D, Regensteiner J, Creager M, Olin J, et al. "Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care". JAMA. 2001 Sep 19;286 (11): 1317-24
38. Mehler PS, Coll JR, Estacio R, Esler A, Schrier RW, Hiatt WR. "Intensive blood pressure control reduces the risk of cardiovascular events in patients with peripheral arterial disease and type 2 diabetes". Circulation 2003 Feb 11;107(5):753-6
39. Serrano FJ, Martín-Conejero A. "Enfermedad arterial periférica :aspectos fisiopatológicos, clínicos y terapéuticos". Rev Esp Cardiol. 2007;60:969-82. - Vol. 60 Núm.09 DOI: 10.1157/13109651
40. Agencia española del medicamento. Ficha técnica SUGIRAN. Revisado en 2002.
41. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC et al. "From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis". Biotechnology 1996;14:61-5.
42. O'Farrell PH. "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins". J Biol Chem 1975;250:4007-21.
43. Bauw G, Van Damme J, Puype M, Vandekerckhove J, Gesser B, Ratz GP et al. "Protein-electroblotting and -microsequencing strategies in generating protein data bases from two-dimensional gels". Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86:7701-5.
44. EDMAN P. "A method for the determination of amino acid sequence in peptides". Arch Biochem 1949;22:475.
45. Pandey A, Mann M. "Proteomics to study genes and genomes". Nature 2000;405:837-46.

46. Anderson L, Seilhamer J. "A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver". *Electrophoresis* 1997;18:533-7.
47. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. "Correlation between protein and mRNA abundance in yeast". *Mol Cell Biol* 1999;19:1720-30.
48. Maithal K. "Proteomics—a new player in the post-genomic era". *Indian J Biochem Biophys* 2002; 39:291-302.
49. López Farré A, González Armengol J, Mateos-Cáceres PJ, Macaya C. "Horizontes de la proteómica en el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad cardiovascular". *Clin Invest Arterioscl* 2008;20:164-72.
50. Tuszynski GP, Buck CA, Warren L. "A two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) system using sodium dodecyl sulfate-PAGE in the first dimensión". *Anal Biochem* 1979;93:329-38.
51. Nakamura K, Okuya Y, Katahira M, Yoshida S, Wada S, Okuno M. "Analysis of tubulin isoforms by two-dimensional gel electrophoresis using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in the first dimensión". *J Biochem Biophys Methods* 1992;24:195-203.
52. Rabilloud T, Lelong C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. *J Proteomics* 2011;74:1829-41.
53. Gordon JA, Jencks WP. "The relationship of structure to the effectiveness of denaturing agents for proteins". *Biochemistry* 1963;2:47-57.
54. Perdew GH, Schaup HW, Selivonchick DP. "The use of a zwitterionic detergent in two-dimensional gel electrophoresis of trout liver microsomes". *Anal Biochem* 1983;135:453-5.

55. Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Görg A, Westermeier R et al. "Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications". *J Biochem Biophys Methods* 1982;6:317-39.
56. Bjellqvist B, Pasquali C, Ranvier F, Sanchez JC, Hochstrasser D. "A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale". *Electrophoresis* 1993;14:1357-65.
57. Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250". *Electrophoresis* 1988;9:255-62.
58. Chevallet M, Lescuyer P, Diemer H, van Dorsselaer A, Leize-Wagner E, Rabilloud T. "Alterations of the mitochondrial proteome caused by the absence of mitochondrial DNA: A proteomic view". *Electrophoresis* 2006;27:1574-83.
59. Rabilloud T. "Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis". *Electrophoresis* 1990;11:785-94.
60. Chevalier F, Centeno D, Rofidal V, Tauzin M, Martin O, Sommerer N et al. "Different impact of staining procedures using visible stains and fluorescent dyes for large-scale investigation of proteomes by MALDI-TOF mass spectrometry". *J Proteome Res* 2006;5:512-20.
61. Guerrera IC, Kleiner O. "Application of mass spectrometry in proteomics". *Biosci Rep* 2005;25:71-93.
62. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules". *Science* 1989;246:64-71.

63. Karas M, Hillenkamp F. "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons". *Anal Chem* 1988;60:2299-301.
64. Aebersold R, Goodlett DR. "Mass spectrometry in proteomics". *Chem Rev* 2001;101:269-95.
65. Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. "Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry". *Annu Rev Biochem* 2001;70:437-73.
66. Görg A, Weiss W, Dunn MJ. "Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics". *Proteomics* 2004;4:3665-85.
67. Leal J, Luengo-Fernández R, Gray A, Petersen S, Rayner M. "Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union". *Eur Heart J* 2006;27:1610-9.
68. Mensah GA, Brown DW. "An overview of cardiovascular disease burden in the United States". *Health Aff (Millwood)* 2007;26:38-48.
69. Bruneel A, Labas V, Mailloux A, Sharma S, Vinh J, Vaubourdolle M et al. "Proteomic study of human umbilical vein endothelial cells in culture". *Proteomics* 2003;3:714-23.
70. McGregor E, Kempster L, Wait R, Welson SY, Gosling M, Dunn MJ et al. "Identification and mapping of human saphenous vein medial smooth muscle proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis". *Proteomics* 2001;1:1405-14.
71. Dupont A, Corseaux D, Dekeyzer O, Drobecq H, Guihot AL, Susen S et al. "The proteome and secretome of human arterial smooth muscle cells". *Proteomics* 2005;5:585-96.

72. Alvarez-Llamas G, de la Cuesta F, Barderas ME, Darde V, Padial LR, Vivanco F. "Recent advances in atherosclerosis-based proteomics: new biomarkers and a future perspective". *Expert Rev Proteomics* 2008;5:679-91.
73. Stastny J, Fosslie E, Robertson AL Jr. "Human aortic intima protein composition during stages of atherogenesis". *Atherosclerosis* 1986;60:131-9.
74. Jang WG, Kim HS, Park KG, Park YB, Yoon KH, Han SW et al. "Analysis of proteome and transcriptome of tumor necrosis factor alpha stimulated vascular smooth muscle cells with or without alpha lipoic acid". *Proteomics* 2004;4:3383-93.
75. Zamorano-León JJ, Fernández-Sánchez R, López Farré AJ, Lapuente-Tiana L, Alonso-Orgaz S, Sacristán D et al. "Direct effect of F12511, a systemic inhibitor of Acyl-CoA cholesterol acyltransferase on bovine aortic endothelial cells". *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;48:128-134.
76. Molero L, García-Méndez A, Alonso-Orgaz S, Carrasco C, Macaya C, López-Farré AJ. "Proteomic approach to identify changes in protein expression modified by 17beta-oestradiol in bovine vascular smooth muscle cells". *Clin Sci* 2005;109:457-63.
77. Soskic V, Görlach M, Poznanovic S, Boehmer FD, Godovac-Zimmermann J. "Functional proteomics analysis of signal transduction pathways of the platelet-derived growth factor beta receptor". *Biochemistry* 1999;38:1757-64.
78. Cieniewski-Bernard C, Acosta A, Dubois E, Lamblin N, Beseme O, Chwastyniak M et al. "Proteomic analysis in cardiovascular diseases". *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008;35:362-6.
79. Balestrieri ML, Giovane A, Mancini FP, Napoli C. "Proteomics and cardiovascular disease: an update". *Curr Med Chem* 2008;15:555-72.

80. Steiner S, Gatlin CL, Lennon JJ, McGrath AM, Aponte AM, Makusky AJ et al. "Proteomics to display lovastatin-induced protein and pathway regulation in rat liver". *Electrophoresis* 2000;21:2129-37.
81. Steiner S, Gatlin CL, Lennon JJ, McGrath Am, Seonarain MD, Makusky AJ et al. "Cholesterol biosynthesis regulation and protein changes in rat liver following treatment with fluvastatin". *Toxicol Lett* 2001;120:369-77.
82. Alonso-Orgaz S, Moreno L, Macaya C, Rico L, Mateos-Cáceres PJ, Sacristán D et al. "Proteomic study of plasma from moderate hypercholestrolemic patients". *J Proteome Res* 2006;5:2301-8.
83. Uchiyama Y. Apoptosis: "The history and trends of its studies". *Arch Histol Cytol* 1995; 58(2): 127-37
84. Lu QL, Abel P, Foster CS, Lalani EN. "Bcl-2: role in epithelial differentiation and oncogénesis". *Hum Pathol* 1996; 27 (2): 102-10.
85. Van Cruchten S, Van Den Broeck W. "Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis". *Anat Histol Embryol* 2002; 31 (4): 214-23.
86. Martelli AM, Zweyer M, Ochs RL, Tazzari PL, Tabellilni G, Narducci P et al. "Nuclear apoptotic changes: an overview". *J Cell Biochem* 2001; 82 (4): 634-46.
87. Horvitz HR. "A first insight into the molecular mechanisms of apoptosis". *Cell* 2004; 116 (2 Suppl): S53-6.
88. Lawen A. "Apoptosis – an introduction". *Bioessays* 2003; 25: 888-96.
89. Ashkenazi A. "Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily". *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 420-30. Green DR. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 2000; 102: 104.
90. Hengartner MO. "The biochemistry of apoptosis". *Nature* 2000; 407: 770-6. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000; 157: 1415-30.

91. Korsmeyer SJ. "Bcl-2: an antidote to programmed cell death". *Cancer Surv* 1992; 15: 105-18.
92. Cooper K, Haffajee Z. "Bcl-2 and p53 protein expression in follicular lymphoma". *J Pathol* 1997; 182 (3): 307-10.
93. Jaeger U, Kart GD, Knapp S, Fiedl J, Laczika K, Kusec R. "Molecular mechanism of the t(14;18)—a model for lymphoid-specific chromosomal translocations". *Leuk Lymphoma* 1994; 14 (3-4): 197-202.
94. Tsujimoto Y. "Bcl-2: antidote for cell death". *Prog Mol Subcell Biol* 1996; 16: 72-86.
95. Verma YK, Gangenahalli GU, Singh VK, Gupta P, Chandra R, Sharma RK, et al. "Cell death regulation by B-cell lymphoma protein". *Apoptosis* 2006; 11(4): 459-71.
96. Sorenson CM. "Bcl-2 family members and disease". *Biochim Biophys Acta* 2004; 1644 (2-3): 169-77.
97. Shacka JJ, Roth KA. "Regulation of neuronal cell death and neurodegeneration by members of the Bcl-2 family: therapeutic implications". *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2005; 4(1): 25-39.
98. Maia H Jr, Maltez A, Studart E, Ataide C, Coutinho EM. "Ki-67, Bcl-2 and p53 expression in endometrial polyps and in the normal endometrium during the menstrual cycle". *BJOG* 2004; 111(11): 1242-7.
99. Depalo R, Nappi L, Loverro G, Bettocchi S, Caruso ML, Valentini AM et al. "Evidence of apoptosis in human primordial and primary follicles". *Hum Reprod* 2003; 18(12): 2678-82

100. Reed JC. "Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles and therapeutic opportunities". *Cell Death Differ* 2006; 13(8): 1378-86.
101. Lutz RJ. "Role of the BH3 (Bcl-2-homology 3) domain in the regulation of apoptosis and Bcl-2-related proteins". *Biochem Soc Trans* 2000; 28 (2): 51-6.
102. Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. "Structural biology of the Bcl-2 family of proteins". *Biochim Biophys Acta* 2004. 1644 (2-3) 83-94.
103. Zhang Z, Lapolla SM, Annis MG, Truscott M, Roberts GJ, Miao Y et al. "Bcl-2 homodimerization involves two distinct binding surfaces, a topographic arrangement that provides an effective mechanism for Bcl-2 to capture activated Bax". *J Biol Chem* 2004;279(42):43920-8.
104. Merry DE, Korsmeyer SJ. "Bcl-2 gene family in the nervous system". *Annu Rev Neurosci* 1997; 20: 245-67.
105. Zamzami N, Brenner C, Marzo I, Susin SA, Kroemer G. "Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins". *Oncogene* 1998; 16: 2265-2282.
106. Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS et al. "X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death". *Nature* 1996; 23; 381 (6580): 335-41.
107. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA et al. "Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death". *Cell* 1993; 74(4):597-608.
108. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panaoutsakopoulou V, Ross AJ et al. "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death". *Science* 2001; 292(5517):727-30.

109. Michels J, Johnson PW, Packham G. Mcl-1. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37(2):267-71.
110. Mallat Z, Tedgui A. "L'apoptose en clinique cardiovasculaire". *Inf Cardiol* 1997;21:355-8.
111. Colucci WS. "Apoptosis in the heart". *N Engl J Med* 1996;335:1224-6.
112. McKenna WJ, Thiene G, Nava A. "Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy". *Br Heart J* 1994;71:215-8.
113. Narula J, Haider N, Virmani R. "Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure". *N Engl J Med* 1996;335:1182-9.
114. Mallat Z, Tedgui A, Fontaliran F, Frank R, Durigon M, Fontaine G. "Evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia". *N Engl J Med* 1996;335:1190-6.
115. James TN. "Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. From postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias". *Circulation* 1994;90:556-73.
116. James TN, St Martin E, Willis PW, Lohr TO. "Apoptosis as a possible cause of gradual development of complete heart block and fatal arrhythmias associated with absence of the AV node, sinus node, and internodal pathways". *Circulation* 1996;93:1424-38.
117. James TN, Terasaki F, Pavlovich ER, Vikhert AM. "Apoptosis and pleomorphic micromitochondriosis in the sinus nodes surgically excised five patients with the long QT syndrome". *J Lab Clin Med* 1993;122:309-23.
118. Kajstura J, Cheng W, Reiss K, et al. "Apoptosis and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats". *Lab Invest* 1996;74:86-107.

119. Itoh G, Tamura J, Suzuki M, et al. "DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by nick end labelling method and DNA agarose gel electrophoresis". *Am J Pathol* 1995;146:1325-31.
120. Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. "Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes". *J Clin Invest* 1994;94:1621-8.
121. Liu Y, Cigola E, Cheng W, et al. "Myocyte nuclear mitotic division and programmed myocyte cell death characterize the cardiac myopathy induced by rapid ventricular pacing in dogs". *Lab Invest* 1995;73: 771-87.
122. Cheng W, Li B, Kajstura J, et al. "Stretch-induced programmed myocardial cell death". *J Clin Invest* 1995;96:2247-59.
123. Teigler E, Than VD, Richard L, et al. "Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat". *J Clin Invest* 1996;97:2891-7.
124. Hamet P, Richard L, Dam T-V, et al. "Apoptosis in target organs of hypertension". *Hypertension* 1995;26:642-8.
125. Diez J. "Apoptosis en cardiovascular diseases". *Rev Esp Cardiol* 2000;53:267-74
126. *Int J Mol Med*. 2013 Feb;31(2):416-22. "Co-administration of prostaglandin E1 with somatostatin attenuates acute liver damage after massive hepatectomy in rats via inhibition of inflammatory responses, apoptosis and endoplasmic reticulum stress". Jia C(1), Dai C, Bu X, Peng S, Xu F, Xu Y, Zhao Y.
127. *Lipids Health Dis*. 2012 Dec 11;11:171. "E series prostaglandins alter the proliferative, apoptotic and migratory properties of T98G human glioma cells in vitro". Gomes RN(1), Colquhoun A.

128. *Anticancer Drugs*. 2013 Feb;24(2):140-9. "Involvement of the prostaglandin E receptor EP2 in paeoniflorin-induced human hepatoma cell apoptosis". Hu S(1), Sun W, Wei W, Wang D, Jin J, Wu J, Chen J, Wu H, Wang Q.
129. *Pak J Biol Sci*. 2011 Nov 1;14(21):976-83. "Expression of p53 during apoptosis induced by D-galactosamine and the protective role of PGE1 in cultured rat hepatocytes". Fouad D(1), Ataya FS, Muntane J.
130. *Br J Pharmacol*. 2012 Jul;166(5):1724-37. "The omega-3 polyunsaturated fatty acid eicosapentaenoic acid inhibits mouse MC-26 colorectal cancer cell liver metastasis via inhibition of PGE2-dependent cell motility". Hawcroft G(1), Volpato M, Marston G, Ingram N, Perry SL, Cockbain AJ, Race AD, Munarini A, Belluzzi A, Loadman PM, Coletta PL, Hull MA.
131. Hara Y1, Akamatsu Y, Kobayashi Y, Iwane T, Satomi S. "Perfusion using oxygenated buffer containing prostaglandin E1 before cold preservation prevents warm ischemia-reperfusion injury in liver grafts from non-heart-beating donors". *Transplant Proc*. 2010 Dec;42(10):3973-6
132. Moore GE, Woods LK. "Culture media for human cells- RPMI 1603, RPMI1634, RPMI 1640 y GEM 1717". *TCA manual* 1977;3:503-9.
133. Fang WT, Li HJ, Zhou LS. "Protective effects of prostaglandin E1 on human umbilical vein endothelial cell injury induced by hydrogen peroxide". *Acta Pharmacol Sin* 2010 31:485-92.
134. Haider DG, Bucek RA, Giurgea AG, Maurer G, Glogar H, Minar E et al. "PGE1 analog alprostadil induces VEGF and eNOS expression in endothelial cells". *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: 2066-72.

135. Mateos-Cáceres PJ, García-Méndez A, López-Farré A, Macaya C, Núñez A, Gómez J, et al. "Proteomic analysis of plasma from patients during an acute coronary syndrome". *J Am Coll Cardiol* 2004; 44:1578-83.
136. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD et al. "Measurement of protein using bicinchoninic acid". *Anal Biochem* 1985; 150:76-85
137. Molero L, García-Méndez A, Alonso-Orgaz S, Carrasco C, Macaya C, López-Farré AJ. "Proteomic approach to identify changes in protein expression modified by 17beta-oestradiol in bovine vascular smooth muscle cells". *Clin Sci* 2005; 109:457-63.
138. Alonso-Orgaz S, Moreno L, Macaya C, Rico L, Mateos-Cáceres PJ, Sacristán D et al. "Proteomic study of plasma from moderate hypercholesterolemic patients". *J Proteome Res* 2006; 5:2301-8.
139. Boersma E, Harrington RA, Moliterno DJ, White H, Théroux P, Van de Werf F et al. "Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in acute coronary syndromes: a meta-analysis of all major randomised clinical trials". *Lancet* 2002; 359:189-98.
140. Deckelbaum Li, SF (ed.). "Tirofiban, a nonpeptide inhibitor of the platelet glycoprotein IIb-IIIa receptor". Marcel Decker, New York, 1997.
141. Macri J, Rapundalo T. "Application of proteomics to the study of cardiovascular biology". *Trends Cardiovasc Med* 2001; 11: 66-75.
142. Arrell DK, Neverova I, Van Eryk JE. "Cardiovascular proteomics: Evolution and potential". *Circ Res* 2001; 88: 763-773.
143. Ohlendieck K. "Proteomics of skeletal muscle glycolysis". *Biochim Biophys Acta* 2010; 1804: 2089-101.

- 144.K. Højlund, K. Wrzesinski, P. M. Larsen et al., “Proteome analysis reveals phosphorylation of ATP synthase  $\beta$ -subunit in human skeletal muscle and proteins with potential roles in type 2 diabetes,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 12, pp. 10436–10442, 2003.
- 145.F. B. Stentz and A. E. Kitabchi, “Transcriptome and proteome expressions involved in insulin resistance in muscle and activated T-lymphocytes of patients with type 2 diabetes,” *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, vol. 5, no. 3-4, pp. 216–235, 2007.
- 146.E. Mullen and K. Ohlendieck, “Proteomic profiling of nonobese type 2 diabetic skeletal muscle,” *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 25, no. 3, pp. 445–458, 2010.
- 147.E. Mullen, E. O’Reilly, and K. Ohlendieck, “Skeletal muscle tissue from the Goto-Kakizaki rat model of type-2 diabetes exhibits increased levels of the small heat shock protein Hsp27,” *Molecular Medicine Reports*, vol. 4, no. 2, pp. 229–236, 2011.
- 148.D. H. Kim, J. W. Choi, J. I. Joo et al., “Changes in expression of skeletal muscle proteins between obesity-prone and obesity-resistant rats induced by a high-fat diet,” *Journal of Proteome Research*, vol. 10, no. 3, pp. 1281–1292, 2011.
- 149.J. Chang, J. E. Cornell, H. van Remmen, K. Hakala, W. F. Ward, and A. Richardson, “Effect of aging and caloric restriction on the mitochondrial proteome,” *Journals of Gerontology A*, vol. 62, no. 3, pp. 223–234, 2007.
- 150.A. Lombardi, E. Silvestri, F. Cioffi et al., “Defining the transcriptomic and proteomic profiles of rat ageing skeletal muscle by the use of a cDNA array, 2D- and Blue native- PAGE approach,” *Journal of Proteomics*, vol. 72, no. 4, pp. 708–721, 2009.

- 151.K. O'Connell and K. Ohlendieck, "Proteomic DIGE analysis of the mitochondria-enriched fraction from aged rat skeletal muscle," *Proteomics*, vol. 9, no. 24, pp. 5509–5524, 2009.
- 152.R. M.P. Alves, R. Vitorino, P. Figueiredo, J. A. Duarte, R. Ferreira, and F. Amado, "Lifelong physical activity modulation of the skeletal muscle mitochondrial proteome in mice," *Journals of Gerontology A*, vol. 65 A, no. 8, pp. 832–842, 2010.
- 153.J. Kanski, M. A. Alterman, and C. Schöneich, "Proteomic identification of age-dependent protein nitration in rat skeletal muscle," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 35, no. 10, pp. 1229–1239, 2003.
- 154.Johnson ML, Robinson MM, Nair KS. "Skeletal muscle aging and the mitochondrion". *Trends Endocrinol Metab.* 2013;24:247---56.
- 155.Short KR, Bigelow ML, Kahl J, Singh R, Coenen-Schimke J, Raghavakaimal S, et al. "Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:5618---23.
- 156.Rooyackers OE, Adey DB, Ades PA, Nair KS. "Effect of age on in vivo rates of mitochondrial protein synthesis in human skeletal muscle". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:15364---9.
- 157.Lanza IR, Short DK, Short KR, Raghavakaimal S, Basu R, Joyner MJ, et al. "Endurance exercise as a countermeasure for aging". *Diabetes.* 2008;57:2933--42.
- 158.Rabilloud T, Chevillet M, Luche S, Lelong C. "Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: past, present and future". *J Proteomics* 2010; 73:2064-2077.

159. Gorg A, Weiss W, Dunn MJ. "Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics". *Proteomics* 2004; 4:3665-3685.
160. Wittmann-Liebold B, Graack HR, Pohl T. "Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry". *Proteomics* 2006; 6:4688-4703.
161. Weiss W, Gorg A. "High-resolution two-dimensional electrophoresis". *Methods Mol Biol* 2009; 564:13-32.
162. Buja LM, Entman ML. "Modes of myocardial cell injury and cell death in ischemic heart disease". *Circulation* 1998; 98: 1355-1357.
163. Itoh G, Tamura J, Suzuki M, Suzuki Y, Ikeda H, Koibe M et al. "DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis". *Am J Pathol* 1995; 146: 1325-1331.
164. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. "Apoptosis in human acute myocardial infarction". *Circulation* 1997; 95: 320-333.
165. Narula J, Haider N, Virmani R, Disalvo G, Kolodgie FD, Hajjar RJ et al. "Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure". *N Engl J Med* 1996; 335: 1182-1189.
166. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA et al. "Apoptosis in the failing human heart". *N Engl J Med* 1997; 336: 1131-1141.
167. Cheng W, Li B, Kajstura J, Li P, Wolin MS, Sonnenblick EH et al. "Strech-induced programmed myocyte cell death". *J Clin Invest* 1995; 96: 2247-2259.

168. Kajstura J, Cigola E, Malhotra A, Li P, Cheng W, Meggs LG et al. "Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro". *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 859-870.
169. Díez J, Fortuño MA, Ravassa S. "Apoptosis in hypertensive heart disease". *Curr Opin Cardiol* 1998; 13: 317-325.
170. Olivetti G, Melissari M, Balbi T, Quaini F, Cigola E, Sonnenblick EH et al. "Myocyte cellular hypertrophy is responsible for ventricular remodelling in the hypertrophied heart of middle aged individuals in the absence of cardiac failure". *Cardiovasc Res* 1994; 28: 1199-1208.
171. Díez J, Fortuño MA, Ravassa S. "Apoptosis en la cardiopatía hipertensiva". *Rev Esp Cardiol* 1999; 52 (Supl 3): 19-25.
172. Hamet P. "Proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle in hypertension". *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1995; 4: 1-7.
173. Isner JM, Kearney M, Bortman S, Passeri J. "Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis". *Circulation* 1995; 91: 2703-2711.
174. Best PJM, Hasdai D, Sangiorgi G, Schwartz RS, Holmes DR Jr, Simari RD et al. "Apoptosis. Basic concepts and implications in coronary artery disease". *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 14-22.
175. Kockx MM. "Apoptosis in the atherosclerotic plaque. Quantitative and qualitative aspects". *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1519-1522.
176. Kockx MM, Herman AG. "Apoptosis in atherogenesis: implications for plaque destabilization". *Eur Heart J* 1998; 19 (Supl G): G23-G28.
177. Geng YG, Libby P. "Evidence for apoptosis in advanced human atheroma: colocalization with interleukin 1b converting enzyme". *Am J Pathol* 1995; 147: 251-266.

178. Geng YG, Wu Q, Muszynski M, Hansson GK, Libby P. "Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with IFN-g, TNF-a, and IL-1b". *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 19-27.
179. Karsan A, Harlan JM. "Modulation of endothelial cell apoptosis: mechanisms and pathophysiological roles". *J Atheroscler Thromb* 1996; 3: 75-80.
180. Hebert MJ, Gullans SR, Mackenzie HS, Brady HR. "Apoptosis of endothelial cells is associated with paracrine induction of adhesion molecules: evidence for an interleukin-1beta-dependent paracrine loop". *Am J Pathol* 1998; 152: 523-532.
181. Bombeli T, Karsan A, Tait JF, Harlan JM. "Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant". *Blood* 1997; 89: 2429-2442.
182. Dimmeler S, Haendeler J, Galle J, Zeiher AM. "Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. A mechanistic clue to the «response to injury» hypothesis". *Circulation* 1997; 95: 1760-1763.
183. Escargueil-Blanc I, Meilhac O, Pieraggi MT, Arnal JF, Salvayre R, Negre-Salvayre A. "Oxidized LDLs induce massive apoptosis of cultured human endothelial cells through a calcium-dependent pathway". *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 331-339.
184. Galle J, Schneider R, Heinloth A, Wanner C, Galle PR, Conzelman E et al. "Lp(a) and LDL induce apoptosis in human endothelial cells and in rabbit aorta: Role of oxidative stress". *Kidney Int* 1999; 55: 1450-1461.
185. Hla T, Neilson K. "Human cyclooxygenase-2 cDNA". *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 7384-7388.



## **9. RESUMEN**

### **EFFECTO DEL ALPROSTADIL EN LOS CULTIVOS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO ISQUÉMICO. ESTUDIO PROTEÓMICO COMPARATIVO FRENTE A MÚSCULO SANO.**

#### **INTRODUCCIÓN**

La enfermedad arterial periférica tiene una alta prevalencia en la población, sobre todo en los pacientes mayores de 70 años, con una incidencia de mortalidad cardiovascular del 2.5%. El alprostadil (PGE1) es un fármaco intravenoso utilizado en el tratamiento de la isquemia crítica de MMII, con un efecto vasodilatador y antiagregante plaquetario. Es bien conocido su efecto endotelial, pero se desconocen si presenta posibles efectos pleiotrópicos sobre el músculo esquelético.

#### **HIPÓTESIS**

Es posible que la vasodilatación producida por el alprostadil produzca cambios en el metabolismo energético del músculo esquelético. Pero además, el alprostadil podría tener un efecto directo sobre el músculo esquelético (no dependiente de la vasodilatación) como efecto pleiotrópico, efecto que presumiblemente será diferente en el músculo esquelético isquémico en comparación con el sano. Por último, dado que la apoptosis celular parece jugar un papel en el desarrollo de la aterosclerosis, y que existe evidencia del efecto antiapoptótico del alprostadil, es previsible que existan diferencias en los niveles de los marcadores de apoptosis del músculo isquémico al compararlo con el sano, y que el tratamiento con alprostadil los modifique.

## **OBJETIVOS**

Los objetivos de este estudio consisten en determinar si existen diferencias en el metabolismo energético del músculo esquelético isquémico en comparación con el sano, determinar el efecto del alprostadil sobre el metabolismo energético del músculo esquelético, valorar diferencias en su acción sobre el músculo isquémico frente al sano, comprobar si en el músculo isquémico existe una actividad apoptótica aumentada, y si el tratamiento con Alprostadil modifica esta actividad en ambos tipos de músculo.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se obtuvieron muestras de tejido de 10 pacientes con isquemia irreversible intervenidos de amputación supracondílea, tanto de músculo isquémico (extensor corto de los dedos del pie, grupo I) como de músculo sano (músculo cuádriceps del borde de amputación, grupo S). Ambos grupos se cultivaron basalmente y con 5 ng de alprostadil. Se analizó la expresión proteómica de las siguientes enzimas: triosa-fosfoisomerasa (TPI), malato deshidrogenasa (MDH), lactato deshidrogenasa (LDH) y piruvato carboxilasa (PC). Se determinaron también sus productos, lactato y piruvato, mediante kits de detección específicos. Para cuantificar la actividad apoptótica en cada uno de los grupos se cuantificaron los niveles de las proteínas implicadas en la apoptosis celular Bax y Bcl-2, mediante técnica de dot-blot. El análisis estadístico se realizó con el programa informático SPSS 16.0.

## **RESULTADOS**

Los niveles encontrados de TPI y LDH no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de músculo isquémico y el sano, ni tampoco al incubarlos con alprostadil, aunque la LDH mostraba una tendencia a aumentar su expresión con alprostadil en ambos grupos. La MDH presentó una disminución en el grupo I en las muestras basales ( $2.196 \pm 348$  UAD, grupo S vs  $644 \pm$

192 UAD, grupo I,  $p < 0,05$ ; UAD= Unidades Arbitrarias de Densitometría), sin presentar diferencias al incubar los tejidos con alprostadil. La PC estaba aumentada en el grupo I de forma basal, y tras la administración de alprostadil la expresión de PC aumentó en ambos grupos (basal:  $1,80 \pm 1,27$  UAD, vs  $3,16 \pm 2,25$  UAD; alprostadil:  $6,72 \pm 2,13$  UAD vs  $8,16 \pm 3,63$  UAD, grupo S vs grupo I, respectivamente,  $p < 0,05$ ). No hubo diferencias significativas en la concentración de lactato ni en la de piruvato. Tampoco se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en los niveles de Bax y Bcl-2, ni presentaron una variación significativa tras la administración de alprostadil.

### **CONCLUSIONES**

La reducción de MDH en el músculo isquémico sugiere una reducción del ciclo de Krebs. El alprostadil estimula la expresión de PC, es posible que el aumento de piruvato carboxilasa observado con alprostadil sea debido a un mecanismo de retroalimentación en respuesta a no aumento de la actividad del ciclo de Krebs. Este efecto de retroalimentación también se observó en el tejido sano, lo que sugiere que se potencia el mecanismo compensador observado en condiciones sin alprostadil. No se ha podido demostrar una mayor actividad apoptótica en el músculo isquémico.



## **10. SUMMARY**

### **THE EFFECT OF ALPROSTADIL ON ISCHEMIC SKELETAL MUSCLE CULTURES. COMPARATIVE PROTEOMIC STUDY WITH HEALTHY MUSCLE.**

#### **INTRODUCTION**

Peripheral arterial disease has a high prevalence in the population, mainly in patients older than 70 years, with an incidence of cardiovascular mortality of 2,5%. Alprostadil (PGE1) is an intravenous drug used in the treatment of critical ischemia of lower limbs, and it has vasodilator properties and inhibits platelet aggregation. Its endothelial effect is well known, but there is no knowledge about possible pleiotropic effects on skeletal muscle.

#### **HYPOTHESIS**

Alprostadil mediated vasodilation may lead to changes in the energetic metabolism of the skeletal muscle. In addition, alprostadil could have a direct effect on skeletal muscle (not vasodilation mediated) as a pleiotropic effect; this effect presumably would be different in the ischemic skeletal muscle compared to the healthy one. Finally, since apoptosis appears to play a role in the development of atherosclerosis, and there is recent evidence of the antiapoptotic effect of alprostadil, differences in the expression levels of the apoptosis markers in ischemic muscle tissue when compared with healthy one are expected, and a treatment with alprostadil could modify them.

## **OBJETIVOS**

The purpose of this study was to establish whether differences exist in energetic metabolism of ischemic skeletal muscle compared with healthy one, to determine the effect of alprostadil on energetic metabolism in skeletal muscle, to assess differences in its action on ischemic versus healthy muscle, to check for an increased apoptotic activity in ischemic muscle, and if alprostadil treatment modifies this activity in both types of muscle.

## **MATERIAL AND METHODS**

Tissue samples were obtained from 10 patients with irreversible ischemia that underwent an above-the-knee amputation, from both ischemic muscle (extensor digitorum brevis muscle, group I) and healthy muscle (quadriceps muscle at the amputation edge, group S). Tissues from both groups were cultured at baseline and with 5 ng of alprostadil. Proteomic expression of the following enzymes was analyzed: triose-phosphate isomerase (TPI), malate dehydrogenase (MDH), lactate dehydrogenase (LDH) and pyruvate carboxylase (PC). Their products, lactate and pyruvate were also determined by specific detection kits. To quantify apoptotic activity in both groups, proteins Bax and Bcl-2 levels, involved in cell apoptosis, were assessed by dot-blot technique. Statistical analysis was performed using SPSS 16.0 software.

## **RESULTS**

The TPI and LDH levels found showed no statistically significant differences between samples of ischemic and healthy muscle, nor upon incubation with alprostadil, although LDH showed a tendency to increase its expression with alprostadil in both groups. MDH levels were significantly lower in group I in baseline samples: ( $2.196 \pm 348$  AUD, group S vs  $644 \pm 192$  AUD, group I,  $p < 0,05$ ; AUD= Arbitrary Units of Densitometry), without differences after incubating tissues with alprostadil. PC levels

were increased in group I at baseline, and its expression increased in both groups after administration of alprostadil (baseline:  $1,80 \pm 1,27$  AUD, vs  $3,16 \pm 2,25$  AUD; alprostadil:  $6,72 \pm 2,13$  AUD vs  $8,16 \pm 3,63$  AUD, group S vs group I respectively,  $p < 0,05$ ). There were no significant differences in the concentration of lactate or pyruvate. Neither statistically significant differences were found in the Bax and Bcl-2 levels, and they showed no significant variation after administration of alprostadil.

## **CONCLUSIONS**

MDH reduction in ischemic muscle suggests a reduction of the Krebs cycle. Alprostadil stimulates the expression of PC, it is possible that the pyruvate carboxylase increase observed with Alprostadil is due to a feedback mechanism in response to non increased activity of the Krebs cycle. This feedback effect was observed also in healthy tissue, suggesting that the compensatory mechanism is enhanced in an Alprostadil-free environment. We could not demonstrate an increased apoptotic activity in ischemic muscle.