

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



ANÁLISIS PROTEÓMICO Y METABOLÓMICO DE PLASMA EN  
PACIENTES CON SÍNDROME CORONARIO AGUDO

TESIS DOCTORAL:  
**CARLOS MARTÍNEZ LABORDE**

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

**MARÍA G. BARDERAS**  
**LUIS R. PADIAL**

Madrid, 2013

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**



**ANÁLISIS PROTEÓMICO Y METABOLÓMICO DE PLASMA EN  
PACIENTES CON SÍNDROME CORONARIO AGUDO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**  
**PRESENTADA POR**

**Carlos Martínez Laborde**

Bajo la dirección de los doctores  
María G. Barderas  
Luis R. Padial

**Madrid, 2012**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**



**ANÁLISIS PROTEÓMICO Y METABOLÓMICO DE PLASMA EN  
PACIENTES CON SÍNDROME CORONARIO AGUDO**

**TESIS DOCTORAL**

**Carlos Martínez Laborde**

**Madrid, 2012**





D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Eugenia González Barderas, Dra. en Bioquímica y Biología Molecular, por la Universidad Complutense de Madrid y Jefe del Laboratorio de Fisiopatología Vascul ar del Hospital Nacional de Parapléjicos y D. Luis Rodríguez Padial, Dr. en Medicina por la Universidad Complutense de Madrid y Jefe del Servicio de Cardiología del Hospital Virgen de la Salud.

CERTIFICAN:

Que Don Carlos Martínez Laborde, Licenciado en Química por la Universidad de Oviedo, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado: **“ANÁLISIS PROTEÓMICO Y METABOLÓMICO DE PLASMA EN PACIENTES CON SÍNDROME CORONARIO AGUDO”**, que presenta como Tesis Doctoral para obtener el grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

En Madrid, a 27 de Junio de 2012

Directores

Fdo: Dra. M<sup>a</sup> Eugenia González Barderas

Doctorando

Fdo; D. Carlos Martínez Laborde

Fdo: Dr. Luis Rodríguez Padial



A mis padres, por todo.



# Agradecimientos

Creo que me es imposible recordar a todas las personas a las que debería dar las gracias por su ayuda, sus consejos, su colaboración o sencillamente por su presencia en mi vida a lo largo de estos años. Personalmente creo que, en cierto modo, con esta Tesis Doctoral estoy culminando muchos años de estudio, de esfuerzo y de sacrificios. Todas las personas que durante todos estos años han formado, de un modo u otro, parte de mi vida son también parte de esta Tesis.

En primer lugar quisiera recordar a quienes fueron mis compañeros, durante mi primera experiencia como investigador, en el Biomedical Polymer Group del School of Pharmacy de la Universidad de Londres. A Siby por enseñarme los primeros días y ayudarme a conocer el laboratorio, a Antony por su ayuda y por sus conversaciones de fútbol de los lunes sobre su adorado Liverpool, a Helder, a Monzur y a Miriam. A todos ellos gracias por hacerme sentir como en casa. Especialmente quiero darle las gracias a nuestro jefe, Steve Brocchini, por su paciencia infinita cada vez que nos reuníamos por culpa de mi inglés durante mis primeras semanas allí, por su disposición en cada momento a ayudarme, porque su despacho era para todos nosotros como una parte más del laboratorio y sobre todo por poner una confianza ciega en mi trabajo, muchísimas gracias.

Aunque de manera indirecta al transcurso de mi Tesis Doctoral, también quiero recordar a todos mis compañeros de residencia y en especial a mis co-R Maryam y David porque tras cuatro años juntos y después de vivir (y aguantar) muchas cosas dentro y fuera del hospital serán para siempre mucho más que amigos. Y también a Isa por todas esas tardes de donuts y cotilleos cada vez que iba a pasar muestras por el cromatógrafo. En especial quiero agradecer al Dr. Serranillos, Manolo para toda la gente del laboratorio, por permitirme utilizar el cromatógrafo de gases para mis experimentos de metabolómica, aún cuando ya no era residente, ya que sin su ayuda y su confianza la mitad de esta Tesis Doctoral no habría sido posible.

De la misma manera, agradezco al Dr. Luis R. Padial por su compromiso con la investigación y su apoyo continuo a nuestro grupo y al Dr. José Moreu por su colaboración y por proporcionarme las muestras utilizadas en esta Tesis Doctoral.

Y por supuesto, guardo especial agradecimiento a todos mis compañeros del grupo de Fisiopatología Vascular del Hospital Nacional de Parapléjicos donde he hecho mi Tesis, Tatiana, Félix, Ana, Laura y a Fer, a todos ellos muchas gracias por su paciencia y por todo lo que me han enseñado de proteómica y de muchas otras cosas durante estos años. En particular quiero agradecer a Sergio y a Carmen su ayuda, sin la cual estoy seguro que no habría podido hacer esta Tesis, por sus consejos (científicos y no científicos) y por estar siempre dispuestos a ayudarme. Muy especialmente quiero agradecerle a nuestra jefa, Maru, por tener su despacho siempre abierto para mí, por perdonarme que le saturara una y otra vez su correo con mil emails y mil ideas y sobre todo por confiar en mí desde el primer día y por darme la oportunidad y la libertad que necesitaba para poder hacer esta Tesis, millones de gracias. Y a nuestras vecinas de la Unidad de Proteómica, a las dos Anas y a Gema por su paciencia picando mis geles e identificando manchas imposibles y a Vero también por su paciencia, sus explicaciones y su ayuda, de verdad muchas gracias.

No quiero olvidarme de los que durante dos meses fueron mis compañeros en laboratorio de Inmunología L-4 de la Fundación Jiménez Díaz. En primer lugar a Fernando Vivanco por permitirme trabajar en su laboratorio durante esas semanas. También a María, Aroa, Fer, Carlos, Bárbara, Marina, Irene y Gloria por hacerme sentir como uno más, muchas gracias.

Y finalmente quiero reservar el mayor agradecimiento a mis hermanas, Patricia y Ana, y sobre todo a mis padres. No hay manera en la que pueda expresar como os agradezco todo lo que me habéis dado a lo largo de toda mi vida. Si hoy estoy escribiendo los agradecimientos de mi Tesis Doctoral, es gracias a vosotros. No sé como agradeceros que hayáis sacrificado vuestra vida por nosotros tres pero mi carrera, mi Tesis y todo lo que haga el resto de mi vida será mi manera de recompensaros. Desde lo más profundo de mi corazón, muchísimas gracias.





# Índice

<b>Abreviaturas</b> .....	19
<b>Introducción</b> .....	23
1. Fisiopatología de la aterosclerosis .....	26
1.1.Inicio de la lesión aterosclerótica .....	26
1.2.Ruptura de la placa de ateroma y trombosis .....	29
2. Síndrome coronario agudo .....	31
2.1.Manifestaciones clínicas .....	31
2.2.Diagnóstico y tratamiento .....	33
2.3.Biomarcadores de uso clínico en SCA.....	34
2.3.1. Creatinquinasa y troponinas .....	35
2.3.2. Mioglobina .....	36
2.4.Potenciales Biomarcadores de uso clínico en SCA .....	37
2.4.1. Moléculas de adhesión.....	37
2.4.2. Biomarcadores de isquemia miocárdica .....	38
2.4.3. Biomarcadores de inflamación.....	39
2.4.4. Marcadores de activación plaquetaria .....	40
3. Proteómica.....	41
3.1.Técnicas de separación de proteínas .....	41
3.1.1. Electroforesis bidimensional (2-DE).....	41
3.1.2. Electroforesis capilar (CE).....	43
3.1.3. Cromatografía líquida (LC) .....	44
3.2.Espectrometría de masas .....	45
3.2.1. Tipos de fuentes de ionización .....	46
3.2.1.1.Ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI) .....	46
3.2.1.2.Ionización por electrospray (ESI).....	47
3.2.1.3.Ionización por láser inducida en superficie (SELDI) .....	47
3.2.2. Tipos de analizadores de masas .....	47
3.2.2.1.Cuadrupolo .....	47
3.2.2.2.Tiempo de vuelo .....	48
3.2.2.3.Analizador de resonancia iónica en ciclotrón con transformada de Fourier .....	48
3.2.2.4.Trampa de iones.....	48
3.2.2.5.Analizador Orbitrap .....	48
3.2.3. Detectores .....	49

3.3.Espectrometría de masas en tándem (MS/MS) .....	49
4. Metabolómica.....	51
4.1.Tipos de estudios metabolómicos.....	51
4.2.Flujo de trabajo metabolómico.....	52
4.2.1. Adquisición y preparación de la muestra.....	52
4.2.2. Separación y detección de metabolitos.....	52
4.2.3. Obtención y análisis de datos.....	53
4.3.Principales plataformas de análisis metabolómico .....	54
4.3.1. Resonancia magnética nuclear .....	54
4.3.2. Cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC-MS).....	55
4.3.3. Cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS).....	55
4.4.Estudios metabolómicos previos .....	56
<b>Objetivos</b> .....	59
<b>Materiales y Métodos</b> .....	63
1. Análisis proteómico del plasma .....	65
1.1.Selección de pacientes y obtención de las muestras .....	65
1.2.Depleción de las proteínas mayoritarias del plasma.....	67
1.3.Ecualización de las proteínas mayoritarias del plasma.....	69
1.4.Electroforesis bidimensional diferencial en gel (2D-DIGE).....	70
1.4.1. Marcaje de las muestras.....	70
1.4.2. Isoelectroenfoque (IEF) de plasma.....	72
1.4.3. Equilibrado.....	73
1.4.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).....	73
1.4.5. Tinción con plata .....	74
1.5.Análisis de imágenes .....	75
1.5.1. Análisis de Componentes Principales (ACP).....	77
1.5.2. Análisis de patrones.....	78
1.6.Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas.....	81
1.6.1. Identificación de proteínas mediante MALDI-TOF/TOF .....	81
1.6.1.1.Digestión de proteínas en gel y preparación de la muestra.....	81
1.6.1.2.Análisis mediante MALDI-MS(/MS) y búsqueda en la base de datos	81
1.6.2. Identificación de proteínas mediante SRM.....	83
1.6.2.1.Digestión de proteínas en gel y preparación de la muestra.....	83
1.6.2.2.Análisis mediante Monitorización de Reacción Seleccionada (SRM)	84
1.7.Validación de resultados .....	85
1.7.1. Inmunodetección o Western-Blot.....	85
1.7.2. Validación de proteínas mediante SRM .....	87

1.7.2.1. Digestión de proteínas en gel y preparación de la muestra .....	87
1.7.2.2. Análisis mediante Monitorización de Reacción Seleccionada (SRM) .....	87
2. Análisis metabolómico del plasma .....	89
2.1. Selección de pacientes y obtención de las muestras .....	89
2.2. Comparación entre diferentes reactivos de derivatización.....	89
2.2.1. Reactivos.....	90
2.2.2. Protocolo de derivatización de plasma .....	90
2.2.3. Análisis cromatográfico .....	91
2.3. Análisis metabolómico completo de plasma .....	92
2.3.1. Reactivos.....	92
2.3.2. Reacción de derivatización .....	92
2.3.3. Análisis cromatográfico .....	92
2.4. Análisis metabolómico de ácidos grasos en plasma .....	93
2.4.1. Reactivos.....	93
2.4.2. Reacción de transesterificación.....	93
2.4.3. Análisis cromatográfico .....	94
2.5. Identificación de metabolitos .....	95
2.6. Validación de resultados .....	96
2.6.1. Validación de resultados mediante GC/MS .....	97
<b>Resultados</b> .....	99
1. Análisis proteómico de plasma deplecionado en pacientes con SCASEST vs controles sanos .....	101
1.1. Depleción de las proteínas mayoritarias del plasma.....	101
1.2. Electroforesis bidimensional diferencial en gel (2D-DIGE).....	102
1.2.1. Análisis multivariante.....	103
1.2.2. Análisis de Componentes Principales (ACP).....	103
1.2.3. Análisis jerárquico .....	105
1.2.4. Análisis de grupos de K-medias.....	107
1.2.5. Identificación de las proteínas diferencialmente expresadas .....	108
1.2.6. Clasificación funcional de las proteínas .....	111
1.2.7. Validación de los resultados mediante inmunodetección .....	113
1.2.8. Validación de los resultados mediante SRM .....	115
2. Análisis proteómico de plasma ecualizado en pacientes con SCASEST vs controles sanos .....	118
2.1. Ecualización de las proteínas mayoritarias del plasma.....	118
2.2. Electroforesis bidimensional diferencial en gel (2D-DIGE).....	119
2.2.1. Análisis multivariante.....	119
2.2.2. Análisis de Componentes Principales (ACP).....	120

2.2.3.	Análisis jerárquico .....	120
2.2.4.	Análisis de grupos de K-medias .....	122
2.2.5.	Identificación de las proteínas diferencialmente expresadas .....	122
2.2.6.	Clasificación funcional de las proteínas .....	124
2.2.7.	Validación de los resultados mediante inmunodetección .....	125
2.2.8.	Validación de los resultados mediante SRM .....	127
3.	Análisis proteómico de plasma deplecionado en pacientes con SCACEST vs controles sanos .....	128
3.1.	Depleción de las proteínas mayoritarias del plasma .....	129
3.2.	Electroforesis bidimensional diferencial en gel (2D-DIGE) .....	129
3.2.1.	Análisis multivariante .....	129
3.2.2.	Análisis de Componentes Principales (ACP) .....	130
3.2.3.	Análisis jerárquico .....	131
3.2.4.	Análisis de grupos de K-medias .....	132
3.2.5.	Identificación de las proteínas diferencialmente expresadas .....	132
3.2.6.	Clasificación funcional de las proteínas .....	135
3.2.7.	Validación de los resultados mediante inmunodetección .....	136
3.2.8.	Validación de los resultados mediante SRM .....	137
4.	Análisis metabolómico de plasma en pacientes con SCACEST vs controles sanos .....	140
4.1.	Comparativa de reactivos de protección y derivatización .....	140
4.2.	Elección de metabolitos objeto de estudio .....	144
4.3.	Análisis metabolómico completo de plasma .....	144
4.3.1.	Huella dactilar del plasma ( <i>plasma fingerprinting</i> ) .....	147
4.3.2.	Análisis estadístico multivariante .....	148
4.4.	Análisis estadístico multivariante de plasma completo .....	149
5.	Análisis metabolómico de ácidos grasos en plasma de pacientes con SCASEST vs controles sanos .....	154
6.	Validación de resultados .....	158
6.1.	Validación de resultados mediante GC/MS .....	158
7.	Estudio de perfiles metabolómicos .....	159
	<b>Discusión</b> .....	163
1.	Análisis proteómico de plasma .....	166
1.1.	Análisis proteómico de plasma deplecionado en pacientes con SCASEST vs controles sanos .....	167
1.1.1.	Proteínas de transporte .....	168
1.1.2.	Proteínas de inflamación y respuesta inmune .....	171
1.1.3.	Proteínas de coagulación .....	173
1.1.4.	Proteasas .....	174

1.2. Análisis proteómico de plasma ecualizado en pacientes con SCASEST vs controles sanos.....	175
1.3. Análisis proteómico de plasma deplecionado en pacientes con SCACEST vs controles sanos.....	180
2. Análisis metabólico de plasma en pacientes con SCASEST vs controles sanos.....	184
2.1. Amino metabolitos.....	184
2.2. Ácidos orgánicos/hidroxílicos.....	186
2.3. Ácidos grasos .....	187
<b>Conclusiones</b> .....	191
<b>Bibliografía</b> .....	197
<b>Anexo</b> .....	219



# Abreviaturas

2D-DIGE	Electroforesis bidimensional en gel
2-DE	Electroforesis bidimensional
ACP	Análisis de Componentes Principales
AGL	Fracción libre de ácidos grasos en plasma
AI	Angina inestable
APCI	Ionización química dinámica
Apo AI	Apolipoproteína AI
Apo AIV	Apolipoproteína AIV
Apo E	Apolipoproteína E
Apo J	Apolipoproteína J
APS	Persulfato amónico
BSTFA	N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
BVA	Análisis de Variaciones Biológicas
CE	Electroforesis capilar
CE-MS	Electroforesis capilar unida a espectrometría de masas
CHAPS	[3-[(3-Colaamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
CK	Creatinquinasa
CKMB	Isoforma de la enzima Creatinquinasa específica de miocardio
CoA	Coenzima A
DIA	Análisis de diferencias dentro del gel
DTT	Ditiotreitol
EAC	Enfermedad arterial coronaria
ECG	Electrocardiograma
ECL	Quimioluminiscencia acentuada
EDA	Análisis de datos extendido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ESI	Electronebulización o electrospray
GC	Cromatografía de gases
GCxGC	Cromatografía de gases bidimensional
h.	Horas
HDL	Lipoproteína de alta densidad

H-FABP	Proteína de unión a ácidos grasos tipo corazón
HILIC	Cromatografía líquida de interacción
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HRBP	Proteína humana de unión a retinol
HUPO	“Human Proteome Organisation”
IAA	Iodoacetamida
IAM	Infarto agudo de miocardio
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular
iECA	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina
IEF	Isoelectroenfoque
IL	Interleuquina
IMA	Albúmina modificada por isquemia
IPG	Gradiente de pH inmovilizado
IT	Trampa iónica
LC	Cromatografía líquida
LCAT	Lecitin Acil Colesterol Transferasa
LDL	Lipoproteína de baja densidad
Lp-PLA2	Lipoproteína asociada a fosfolipasa 2
LTQ-FT-ICR	Trampa lineal-Resonancia iónica ciclotrón transformada de Fourier
m/z	masa/carga
MALDI	Desorción/ionización mediante láser inducida por matriz
MCP-1	Proteína quimiotáctica 1 de monocitos
M-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos
min.	Minutos
MM-LDL	Lipoproteína de baja densidad mínimamente oxidada
MMP	Metaloproteinasa
MPO	Mieloperoxidasa
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MSTFA	N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida
MudPIT	Tecnología multidimensional de identificación de proteínas
MW	Masa molecular
NF-kB	Factor nuclear kappa beta
NO	Óxido nítrico
oxLDL	Lipoproteínas de baja densidad oxidadas

p/v	Peso/Volumen
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Proteína C reactiva
PDGF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
PMF	Huella dactilar peptídica
PM	Peso molecular
Q	Cuadrupolo
QQQ	Triple cuadrupolo
RMN	Resonancia magnética nuclear
SCA	Síndrome Coronario Agudo
SCASEST	Síndrome Coronario Agudo sin Elevación del Segmento ST
SCACEST	Síndrome Coronario Agudo con Elevación del Segmento ST
SDS	Dodecil sulfato sódico
SELDI	Desorción/ionización mediante láser realizada por superficie
TEMED	N,N,N',N'-tetraetiletilendiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
TMCS	Trimetilclorosilano
Tn	Troponina
TOF	Tiempo de vuelo
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
UFLC	Cromatografía líquida ultra rápida
V	Voltios
VCAM-1	Proteína de adhesión a células vasculares
VDBP	Proteína de unión a Vitamina D
v/v	Volumen/Volumen
ZE	Electroforesis capilar



# **Introducción**



# Introducción

*El experimentador que no sabe lo que está buscando no comprenderá lo que encuentra.*

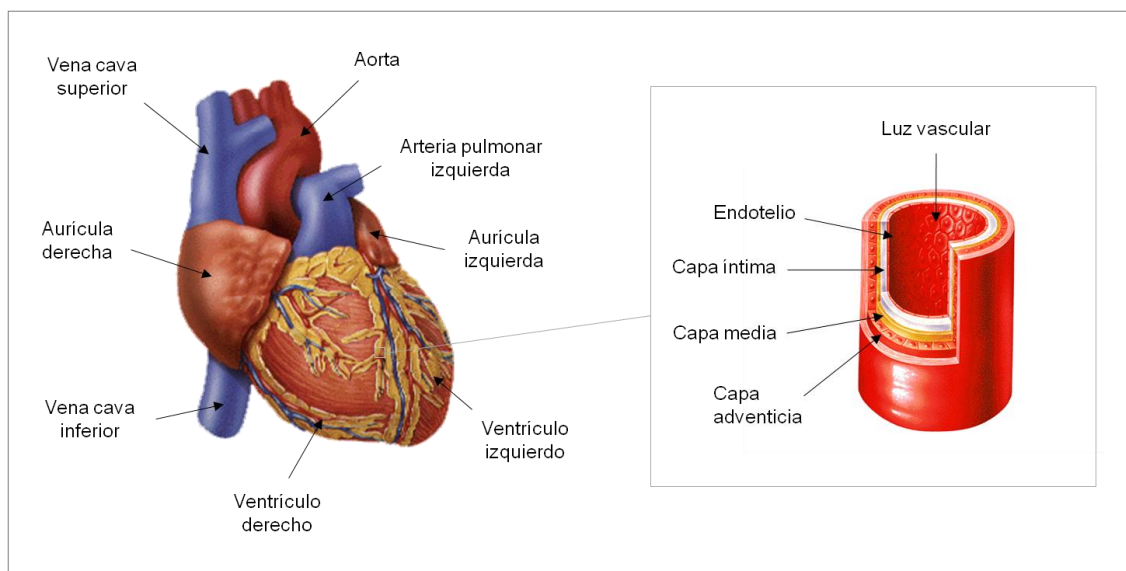
Claude Bernard

Los síndromes coronarios agudos (SCA) engloban a un conjunto de cuadros clínicos que incluyen la angina inestable (AI), el infarto agudo de miocardio (IAM) y la muerte súbita de causa cardíaca (MS). Estas tres patologías tienen su origen en un mismo proceso fisiopatológico en el que la placa arteriosclerótica complicada provoca el inicio de las manifestaciones isquémicas [1]. Normalmente, éste se debe a la aparición de una fisura en la cápsula fibrosa que provoca la liberación a la luz arterial de su contenido, altamente trombogénico, con la consecuente formación de un trombo y oclusión de la arteria coronaria, lo que conlleva una reducción aguda del flujo sanguíneo y de la oxigenación miocárdica [2-5]. A pesar de constituir la primera causa de muerte en los países desarrollados y de presentar una creciente prevalencia en los países en vías de desarrollo [6], no existe actualmente ningún biomarcador que permita detectar el proceso degenerativo que origina el SCA antes de que este se manifieste clínicamente [7, 8].

Los factores que contribuyen al desarrollo de una enfermedad cardiovascular son bien conocidos; sin embargo la mayor dificultad para su diagnóstico radica en que se trata de una enfermedad asintomática que se desarrolla de manera silenciosa y muy progresiva durante años o incluso décadas, de modo que cuando se presenta, el daño es muy avanzado e irreversible. Su elevada prevalencia unido a la falta de marcadores diagnóstico en la práctica clínica, denotan la necesidad de encontrar nuevos biomarcadores con valor clínico que permitan realizar un diagnóstico temprano de la enfermedad con el fin de instaurar las medidas correctoras necesarias lo antes posible, así como establecer una estratificación de riesgo cardiovascular individualizada para cada paciente.

## 1. FISIOPATOLOGÍA DE LA ATEROSCLEROSIS

El descenso del flujo sanguíneo y en consecuencia la disminución de la cantidad de oxígeno que llega al corazón cuando existe una oclusión parcial o total de la arteria coronaria lleva consigo la necrosis del tejido cardiaco que recibe un aporte deficitario de oxígeno. La formación del trombo es, sin embargo, el final de un proceso lento y progresivo que en la mayoría de los casos se ha desarrollado a lo largo de varias décadas, denominado aterosclerosis. En ésta, se produce una progresiva acumulación focal de material lipídico intracelular y extracelular, con formación de células espumosas y reacción inflamatoria en la capa íntima de la arteria (aterosis) junto con un progresivo endurecimiento de la pared arterial caracterizado por un aumento del número de miocitos, distrofia de la matriz extracelular y calcificación (esclerosis) [9, 10] (Figura I\_01).



**Figura I\_01.** Representación del corazón humano y de una arteria coronaria sana.

### 1.1. Inicio de la lesión aterosclerótica

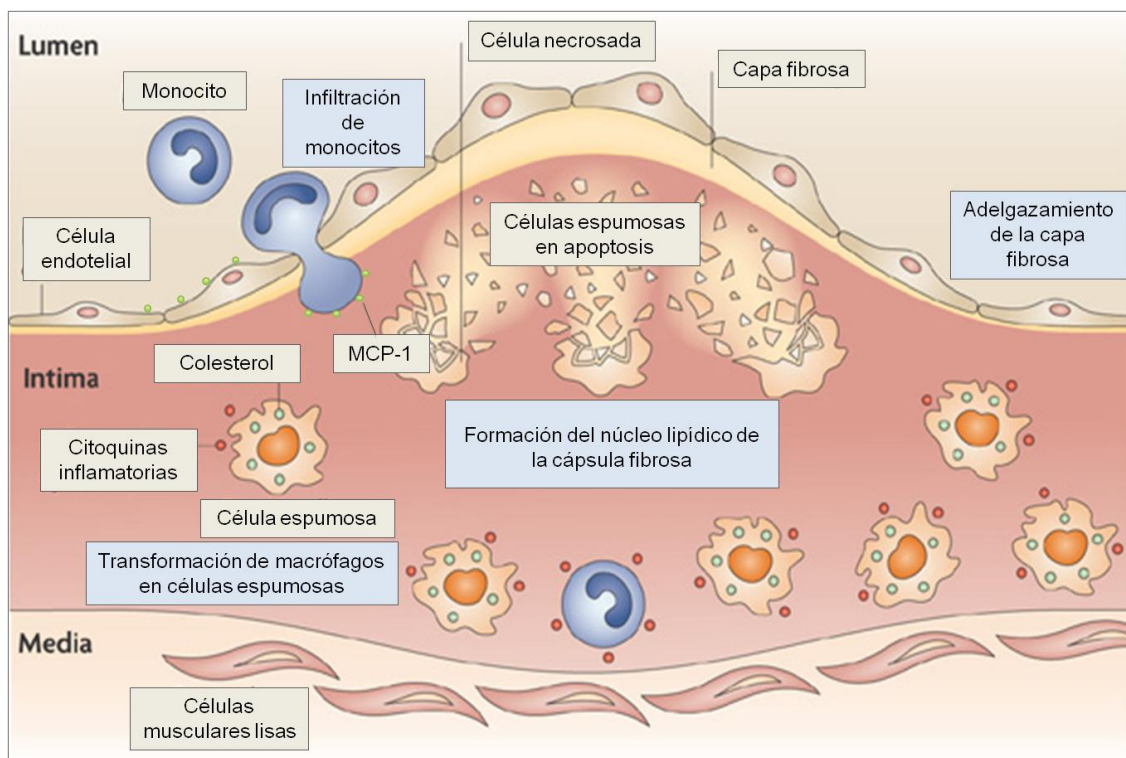
La aterosclerosis es una enfermedad crónica de muy lenta evolución en la que los cambios en la estructura de la pared arterial comienzan en la infancia mientras que el desarrollo de la placa puede llevar décadas, lo que hace que la enfermedad no se manifieste en forma de SCA hasta la cuarta o quinta década de vida [11]. El endotelio de los vasos sanguíneos es el encargado de regular el tono vascular, la actividad plaquetaria, la adhesión de leucocitos y la angiogénesis, mediante la producción de óxido nítrico (NO). La existencia de factores de riesgo cardiovascular provoca la

aparición de un estado particular de activación endotelial, denominado disfunción endotelial, en la que disminuye la biodisponibilidad de NO y aparece un fenotipo endotelial proinflamatorio que promueve aterosclerosis [12-16], se correlaciona con la progresión de la enfermedad [17] y predice los eventos cardiovasculares [18-24]. En condiciones fisiológicas normales, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que penetran en el espacio subendotelial son devueltas a la sangre circulante por un mecanismo de transporte inverso del colesterol, en el cual participan las lipoproteínas de alta densidad (HDL) [10, 25]. Sin embargo, como consecuencia de la disfunción endotelial, el aumento de la permeabilidad de la pared de los vasos origina un aumento en la penetración de las LDL en la pared vascular, que excede la posibilidad del sistema de transporte inverso del colesterol para devolverlo al torrente sanguíneo. Unido a esto, algunos factores de riesgo como la diabetes y el tabaquismo reducen la cantidad de lipoproteínas de alta densidad (HDL) circulantes disminuyendo aún más la eliminación de las LDL del espacio subendotelial. Además, este proceso puede verse empeorado en pacientes con diabetes, en los cuales la glicosilación de las LDL reduce el reconocimiento de estas lipoproteínas por los receptores de LDL, disminuyendo su eliminación [10, 26].

Todos estos hechos originan un aumento en el período en que permanecen las lipoproteínas dentro del espacio subendotelial, donde se someten a una oxidación leve, principalmente por las células endoteliales. Esto produce unas LDL mínimamente modificadas (MM-LDL), que junto al estrés oxidativo presente en el ambiente, la presencia de angiotensina II y la reducción de la fuerza de cizallamiento en las zonas con propensión a la aterosclerosis, son capaces de activar el factor nuclear kappa-B (NF- $\kappa$  B), factor de transcripción que aumenta la expresión de moléculas que participan en los pasos de captación de monocitos [10, 27]. Dichas moléculas se pueden dividir en dos grupos:

1. Moléculas de adhesión responsables del movimiento y de la adhesión de monocitos a la pared de los vasos, como la proteína de adhesión de células vasculares (VCAM-1), la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1) y la selectina E.
2. Moléculas quimioafines que provocan la entrada de monocitos en la pared de los vasos, como la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) y la interleukina-8 (IL-8).

Una vez en el espacio subíntimo, los monocitos se transforman en macrófagos, los cuales oxidan las MM-LDL a oxLDL. Este proceso se ve favorecido por la angiotensina II y por la glicosilación previa de las LDL. Los macrófagos captan estas ox-LDL en un proceso mediado por el factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF) y estimulado por angiotensina II. Los macrófagos así activados pueden estimular la expresión celular de enzima convertidora de angiotensina (iECA) y la síntesis de angiotensina II, lo que lleva a un ciclo de retroalimentación positiva. Además, debido a que no existe ningún mecanismo de saturación en los macrófagos, seguirán captando lípidos hasta convertirse en células espumosas que finalmente morirán y liberarán los lípidos que formarán el núcleo lipídico de la placa, junto con sustancias tóxicas, como enzimas, radicales libres y aniones superóxido [28].



**Figura I\_02.** Representación del desarrollo del proceso aterosclerótico. Los monocitos circulantes se unen a las células endoteliales mediante moléculas de adhesión (MCP-1) que son inducidas en respuesta a señales inflamatorias. En la capa íntima se diferencian rápidamente a macrófagos que fagocitan lípidos transformándose en células espumosas que, finalmente, entran en apoptosis y mueren. (Tabas I. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(1):36-46).

Los productos tóxicos lesionan el endotelio, que en algunas zonas puede ser incluso destruido y desaparecer. Los macrófagos y algunas plaquetas activadas, segregan factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que estimulan la proliferación y migración de las células musculares lisas de la capa

media. Esta fase proliferativa aumenta con el descenso de la molécula antiproliferativa NO y con el incremento de angiotensina II. Las células del músculo liso también secretan factores de crecimiento y, además, cubren el núcleo ateromatoso y producen proteínas de matriz (colágeno, elastina y proteoglicanos), que formarán la cubierta fibrosa [29].

## **1.2. Ruptura de la placa de ateroma y trombosis**

Una vez establecida la capa de fibrosis, ya se produce oclusión de la luz vascular, por lo que pueden aparecer las primeras manifestaciones isquémicas, dependiendo de la existencia o no de circulación colateral al vaso afectado. Las placas fibrosas más avanzadas, denominadas placas complicadas, muestran degeneración fibrocalcificada con lípidos intra y extracelulares, calcio, tejido fibroso, desechos necróticos, sangre extravasada y una capa de tejido fibroso [30]. La inestabilidad de la placa de ateroma está en parte determinada por factores locales, aunque factores sistémicos tales como infección, inflamación, autoinmunidad o influencia genética son también importantes [31]. Esta inestabilidad está dada por la probabilidad de la placa vulnerable a sufrir eventos tales como: calcificación, debilitamiento de la pared, fisura o rotura, hemorragia, ulceración y trombosis.

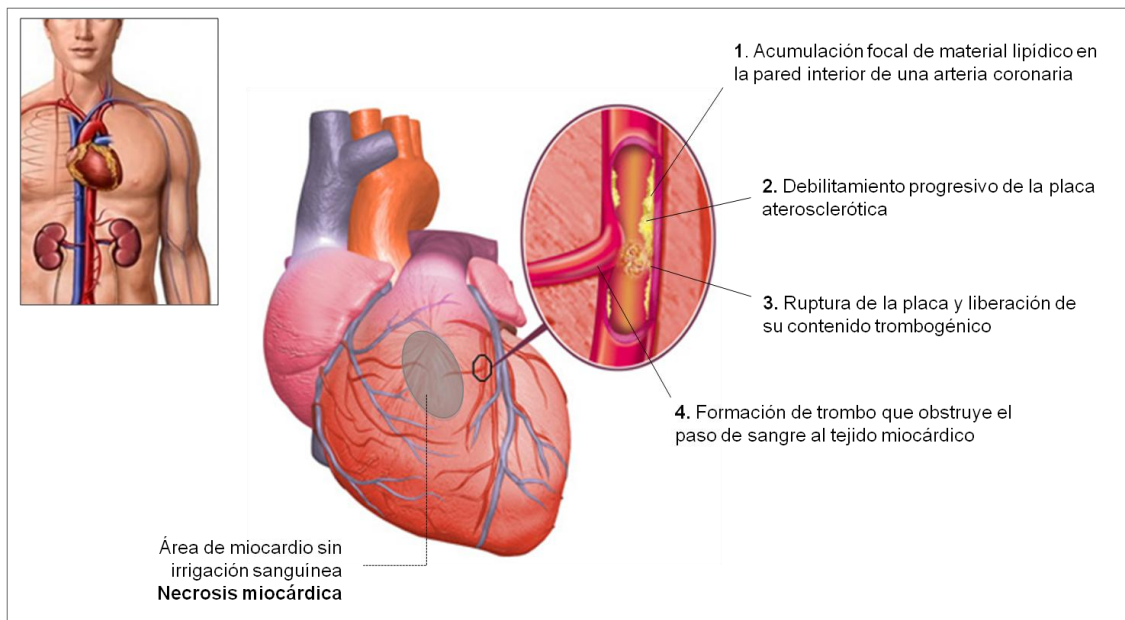
Diversos estudios han demostrado que las placas de ateroma con una mayor infiltración de macrófagos, linfocitos T, y células musculares lisas activadas tienen una alta predisposición a sufrir ruptura [30, 32-34] y la consideran como la lesión de más alto riesgo en la placa vulnerable [32]. La presencia de macrófagos en el núcleo de la placa constituye un papel fundamental en la formación de una placa vulnerable porque liberan citoquinas que causan inflamación de la pared vascular, producen factor tisular que lleva a un mayor reclutamiento de células y disminuyen la resistencia de la cápsula fibrosa a las fuerzas hemodinámicas a las que está sometida, con la consecuente ruptura y formación del trombo [35, 36].

Los factores de riesgo clásicos como el tabaquismo, la hipertensión arterial, la elevación de los niveles plasmáticos del colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDL), el descenso de los niveles plasmáticos del colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (HDL) y la diabetes favorecen las fracturas de la placa inducido por factores químicos y metabólicos.

Una vez que se produce rotura de la placa se vierten a la circulación los componentes

del núcleo lipídico cuyo contenido es altamente trombogénico, lo que junto con la exposición del factor tisular condicionan la formación local de trombina, la activación de plaquetas y la formación de fibrina [35].

En ese punto, la placa aterosclerótica progresa reorganizándose por trombosis sobreañadida, ya que el trombo recién formado es invadido por monocitos que liberan factor tisular que induce la formación de trombina, que es un potente activador de las plaquetas. Tanto la trombina como las plaquetas activan las células musculares lisas cercanas a la arteria en la que reside el trombo. Las células musculares lisas penetran el trombo y empiezan a sintetizar tejido conectivo, de forma que a los 8-10 días el trombo está rodeado de un endotelio disfuncionante. La formación del nuevo tejido conectivo continúa hasta que, a las 4-12 semanas, el endotelio se normaliza y es capaz de sintetizar NO, completándose el proceso de cicatrización [36].



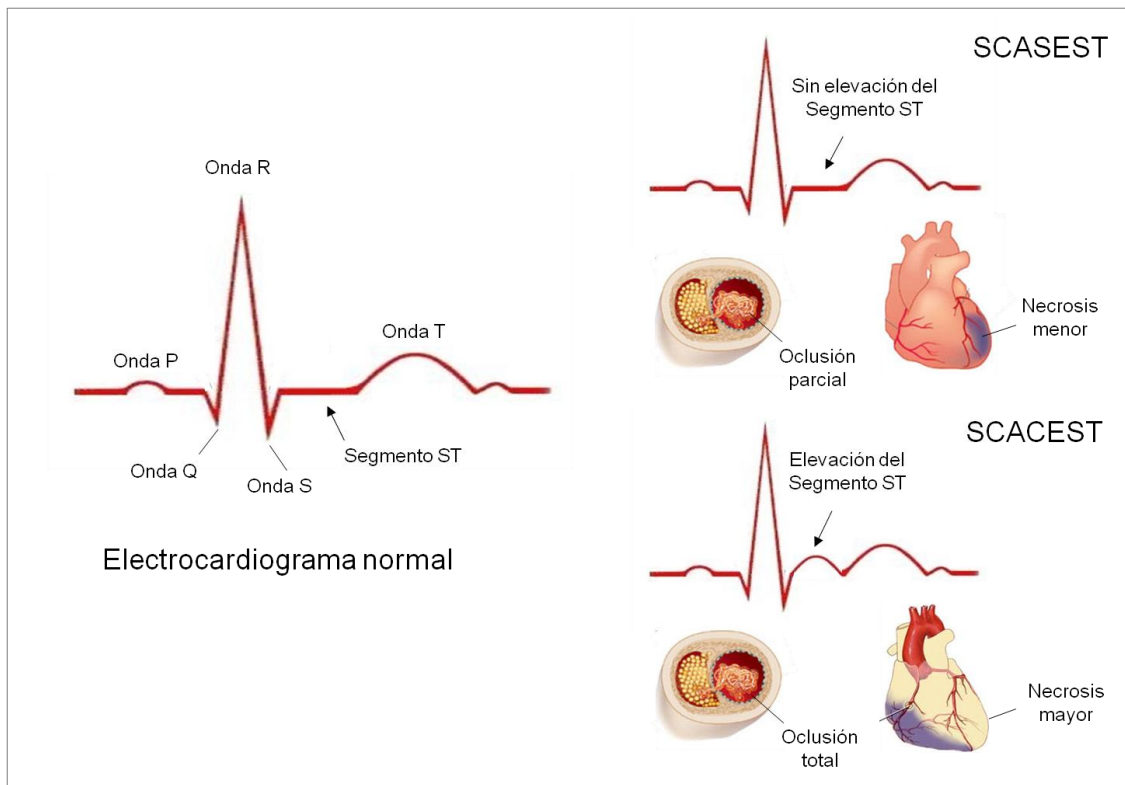
**Figura I\_03.** Secuencia de acontecimientos que llevan a la ruptura de la placa de ateroma y formación de un trombo con la consecuente necrosis del tejido miocárdico ante la falta de aporte sanguíneo debido a la obstrucción de la arteria.

## **2. SÍNDROME CORONARIO AGUDO**

Los SCA pueden clasificarse atendiendo a parámetros electrocardiográficos en dos grandes grupos: 1) Síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST (SCASEST) y 2) Síndrome coronario agudo con elevación del segmento ST (SCACEST) [37]. La presentación clínica de los diferentes SCA depende de la extensión y duración de la isquemia secundaria a la obstrucción del flujo coronario. Cuando la liberación de contenido aterosclerótico provoca la formación de un trombo no oclusivo o transitoriamente oclusivo puede tratarse de una AI o de un IAM no Q, no existiendo en ninguno de los dos casos elevación del segmento ST en el electrocardiograma (ECG). Por norma general, en la AI la oclusión temporal no dura más de 20 minutos y produce angina de reposo. En el IAM no Q, sin embargo, la interrupción de flujo coronario dura más tiempo, aunque el territorio distal del corazón puede estar protegido por circulación colateral desde otros vasos, limitando la isquemia y la extensión de miocardio necrosado. Cuando existe elevación del segmento ST en el electrocardiograma nos indica que se producirá un IAM con onda Q si no se restituye rápidamente el flujo coronario mediante trombolisis o angioplastia. En este caso, el trombo es oclusivo, la circulación colateral inexistente o insuficiente, la duración de isquemia es más prolongada y se produce una mayor necrosis de tejido miocárdico [37, 38] (Figura I\_04).

### **2.1. Manifestaciones clínicas**

Los SCA suelen cursar con una serie de síntomas y signos característicos, debidos en gran medida al descenso de flujo sanguíneo coronario y en consecuencia a la menor oxigenación del corazón. Uno de los síntomas más típicos que indican que el paciente puede estar sufriendo un SCA es la presencia de dolor torácico, definido como una sensación de opresión o ardor en el pecho de intensidad variable, con inicio gradual y duración mayor de 30 minutos. A su vez, estos síntomas pueden ir acompañados de signos característicos como confusión aguda, debilidad intensa, palidez y sudoración entre otros [37].



**Figura I\_04.** Representación esquemática de un electrocardiograma (ECG) normal. Cuando se produce una oclusión parcial del flujo coronario no existe elevación del segmento ST y la necrosis miocárdica es menor. Una oclusión total del flujo conlleva una mayor necrosis miocárdica y una elevación del segmento ST en el ECG.

En caso de que las circunstancias lo hagan posible, la anamnesis debe ir encaminada a definir las características, localización y factores precipitantes o atenuantes del dolor. Es necesario identificar los factores de riesgo cardiovascular que presenta el paciente, antecedentes de cardiopatía isquémica y antecedentes familiares de enfermedad arterial aterosclerótica. Del mismo modo, la exploración permitirá identificar signos de inestabilidad o urgencia vital, así como valorar la presencia de signos de dislipemia y/o arterioesclerosis (xantomas, xantelasmas, soplos arteriales) que aumentan la probabilidad de enfermedad coronaria. La exploración física debe ayudar también a identificar o descartar otros cuadros clínicos como disección de aorta (asimetría de pulsos, soplo de regurgitación aórtica), pericarditis aguda (roce pericárdico), taponamiento cardíaco (ingurgitación yugular y pulso paradójico) o neumotórax (asimetría de la auscultación pulmonar) [38].

## 2.2. Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico de un SCA se debe realizar evaluando de manera conjunta los datos obtenidos en la evaluación clínica, en el ECG y los resultados bioquímicos. El ECG es un componente indispensable dentro de la exploración básica inicial y ha de realizarse en los 5-10 minutos posteriores a la llegada del paciente al servicio de urgencias. Del mismo modo, los análisis bioquímicos deben incluir la determinación sérica de los niveles de troponina I (TnI) o troponina T (TnT) y de la enzima creatinquinasa (CK) y su isoenzima cardiaca (CK-MB), las cuales poseen una elevada sensibilidad y especificidad para el diagnóstico precoz de SCA. Pueden ser necesarios también los resultados de los análisis de hematología y coagulación, sobre todo en pacientes en tratamiento con anticoagulantes orales. Con todo ello, el objetivo será establecer un diagnóstico preciso en el menor tiempo posible, de modo que pueda establecerse un tratamiento de reperfusión adecuado, bien mediante métodos farmacológicos (trombolisis farmacológica) o mediante intervencionismo coronario percutáneo (angioplastia coronaria con o sin prótesis intracoronaria), lo que será vital para la supervivencia del paciente [39, 40].

Inicialmente, el tratamiento de un SCA debe incluir oxigenoterapia, especialmente cuando existe disminución de la saturación de oxígeno en sangre, para permitir la llegada de la mayor cantidad de oxígeno posible al corazón, y un tratamiento farmacológico que incluya la administración de antiagregantes (ácido acetilsalicílico, clopidogrel, prasugrel, ticagrelor, inhibidores de la glicoproteína IIb/IIIa, etc.), de anticoagulantes y de analgésicos para aliviar el dolor, además de terapia dirigida disminuir el consumo de oxígeno del miocardio ( $\beta$ -bloqueantes) [37]. Una vez superado el SCA, será necesario instaurar un tratamiento farmacológico a largo plazo y adoptar una serie de medidas destinadas a evitar la repetición del evento en el futuro.

El tratamiento farmacológico a largo plazo incluye una combinación de fármacos con distintos efectos [41]. Por un lado será necesario establecer un tratamiento antiagregante, el cual puede realizarse utilizando aspirina que actúa produciendo una acetilación de la enzima ciclooxigenasa, inhibiendo la formación de tromboxano  $A_2$ , que es un potente activador de las plaquetas y un vasoconstrictor coronario. También pueden utilizarse otros antiagregantes como clopidogrel, prasugrel o ticagrelor, que actúan a distintos niveles inhibiendo la activación plaquetaria [42, 43]. Junto con el

tratamiento antiagregante será necesario instaurar un tratamiento con agentes  $\beta$ -bloqueantes que bloquean reversiblemente los receptores  $\beta$ -adrenérgicos del corazón impidiendo que se unan las catecolaminas, con lo que se consiguen efectos cronótropo (frecuencia cardíaca) e inótropo (contractibilidad) negativos, disminución del consumo de oxígeno miocárdico y disminución de las arritmias [44, 45]. El uso de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (iECA) ha demostrado una disminución de la mortalidad a los 30 días y a largo plazo gracias a su efecto vasodilatador y a que disminuyen el remodelado patológico del corazón, al ser antifibróticos y mejorar la función endotelial [46, 47]. Por último el uso de estatinas (inhibidores de la enzima hidroximetilglutaril-CoA reductasa), como la atorvastatina y la simvastatina, entre otras, permiten el control del perfil lipídico del paciente después de un IAM en los que el nivel de colesterol LDL debe permanecer inferiores a 70-100 mg/dL. Estos fármacos tienen, además de su acción hipolipemiante, un efecto antitrombótico y antiinflamatorio y mejoran la función endotelial, lo que contribuye a disminuir el riesgo de futuros eventos coronarios agudos [48, 49].

Paralelamente al tratamiento farmacológico, será necesario que se produzcan modificaciones en los hábitos alimenticios del paciente, cuyo objetivo será controlar los niveles de colesterol LDL y glucosa en sangre, así como el mantenimiento de un peso adecuado. Será también necesaria la eliminación de hábitos que constituyan factores de riesgo cardiovascular conocidos, como el tabaquismo y el consumo excesivo de alcohol. Esta eliminación de hábitos perjudiciales debe ir acompañada de la introducción de nuevos hábitos destinados a mejorar el estado de salud global del paciente como el aumento gradual de la actividad física.

### **2.3. Biomarcadores de uso clínico en SCA**

Los trastornos bioquímicos que se producen en la cardiopatía isquémica son consecuencia de la hipoxia a la que se ve sometido el miocardio. Bajo estas condiciones, las células obtienen energía de la glucólisis anaerobia, cuyo resultado es la acumulación de lactato. Este exceso de lactato produce una situación de acidosis que conduce a la activación de enzimas proteolíticas, a la degradación de las proteínas estructurales responsables de la contractibilidad cardíaca, a la pérdida de la integridad de la membrana celular y, en último término, a la liberación de proteínas al intersticio intercelular y a la sangre debido a la muerte celular. En este proceso, las proteínas que primero aparecen en la circulación son las citoplasmáticas (mioglobina y creatinquinasa

citoplasmática), seguido de las proteínas mitocondriales (creatinquinasa mitocondrial) y las estructurales (troponinas y miosina).

### **2.3.1. Creatinquinasa y troponina**

La creatinquinasa (CK) y la troponina (Tn) son los dos únicos marcadores aceptados por la Sociedad Europea de Cardiología (ESC) y Asociación Americana de Cardiología (AHA) para el diagnóstico del infarto agudo de miocardio (IAM) junto con la isoenzima cardiaca de la creatinquinasa (CKMB) [50]. La medida de la actividad CKMB tiene una especificidad para lesión miocárdica (85%) superior a la de la CK total.

Hasta la aparición de marcadores más específicos, la determinación de los niveles séricos de CK ha sido el marcador más utilizado en el diagnóstico de las alteraciones miocárdicas y músculo-esqueléticas [51]. En el inicio de la necrosis miocárdica, la actividad catalítica de la CK puede detectarse aumentada en suero por encima del límite superior de su intervalo de referencia a partir de las 4-6 h del inicio de la sintomatología. Sin embargo, debido a que es una enzima presente en prácticamente todos los tejidos del cuerpo, existen muchas otras situaciones patológicas y no patológicas que pueden producir niveles de actividad elevados sin que exista daño miocárdico [52-54].

La actividad de la CK-MB puede detectarse aumentada en el plasma a partir de las 4-6 h del inicio de los síntomas de IAM y permanece elevada hasta las 24-36 h del inicio de los síntomas [24-26]. Al igual que ocurre con la CK, la medida de la actividad de la CK-MB tiene una insuficiente cardioespecificidad ya que, su concentración plasmática puede aumentar en las mismas condiciones que las mencionadas para la CK sin que exista lesión miocárdica [54]. En este sentido, la utilización del cociente *actividad CKMB/actividad CK total* permite mejorar la cardioespecificidad de la medida de CK-MB. De esta manera, un valor plasmático que sobrepase la proporción de CK-MB habitualmente hallada en el músculo esquelético puede considerarse como indicativo de liberación de la isoenzima desde el miocardio, aún cuando este cociente no ofrece la combinación de sensibilidad y especificidad diagnóstica necesarias para el diagnóstico del infarto de miocardio [51].

La troponina es una proteína liberada de los miocitos cuando tiene lugar un daño irreversible del miocardio. Se trata por lo tanto de una proteína altamente específica para el tejido cardíaco, que posee una gran especificidad para el diagnóstico clínico del

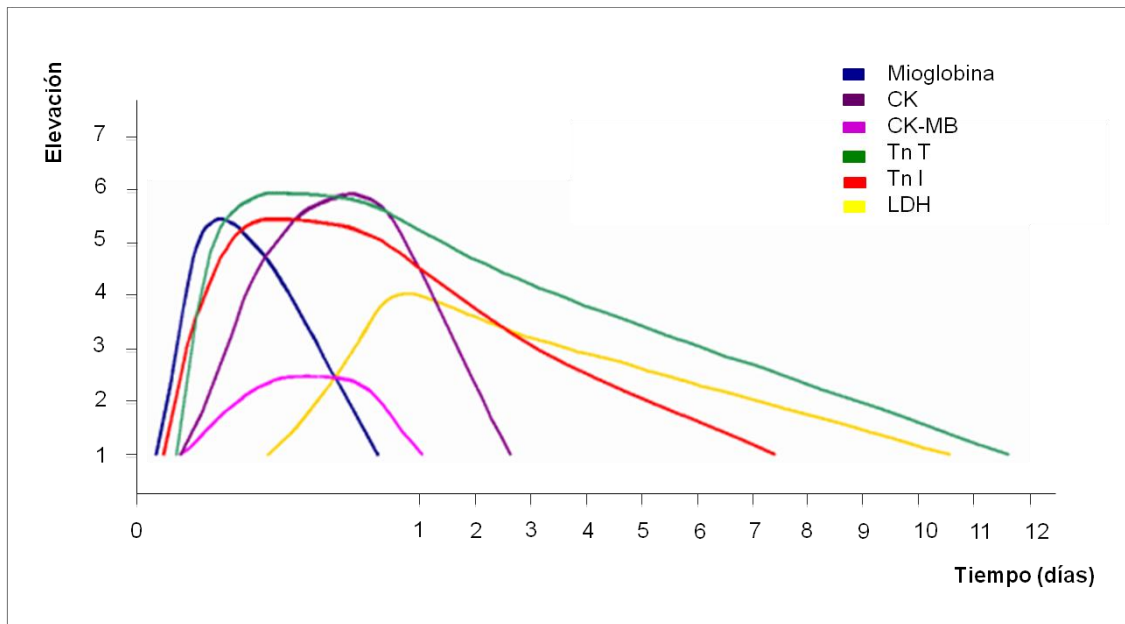
infarto de miocardio. Existen tres clases de troponina diferentes: la troponina C, la troponina I (TnI) y la troponina T (TnT), de las cuales únicamente la TnT y la TnI tienen interés en la práctica clínica, al poseer isoformas cardiospecíficas (TnTc y TnIc) con una secuencia de aminoácidos que permite distinguirlas de las musculo-esqueléticas [55].

Ante el inicio de la lesión miocárdica, la troponina se detecta en el plasma a partir de las 4-6 h del inicio de los síntomas. La cinética de liberación de TnTc y TnIc es diferente. La TnTc tiene un máximo inicial a las 12 h de los síntomas, manteniéndose estos niveles hasta las 48 h y un descenso gradual hasta los 10 días. La TnIc presenta una cinética semejante, pero con un máximo de menor magnitud [56] y un tiempo de retorno a la normalidad más corto que el de la TnTc pero que, al igual que ésta, depende de la extensión del IAM [57].

### **2.3.2. Mioglobina**

La mioglobina es una proteína citoplasmática de bajo peso molecular que se libera rápidamente a la circulación debido a alteraciones en la permeabilidad celular derivadas de la hipoxia tisular que comienza a sufrir el miocardio al inicio de la lesión. Esta precocidad en su liberación permite que puedan detectarse concentraciones elevadas de mioglobina partir de la primera o segunda hora de evolución del IAM. La mioglobina alcanza su máxima concentración en plasma entre las 6 y 12 h tras iniciarse el IAM, y desaparece de la circulación a las 12-24 h como consecuencia de su rápido aclaramiento renal. Precisamente, este aclaramiento renal es el que produce que también se encuentre elevada en pacientes con insuficiencia renal por la disminución de su aclaramiento [58], de modo que su eficiencia diagnóstica en este tipo de pacientes es baja [59].

La principal ventaja de la mioglobina reside en su elevada sensibilidad y valor predictivo negativo en las primeras horas del IAM [60, 61]. En consecuencia, midiendo la mioglobina puede descartarse eficazmente la necrosis miocárdica en las primeras 6 h del ingreso del paciente [62, 63]. No obstante, su escasa cardiospecificidad y su rápido aclaramiento renal hacen que su valor predictivo positivo sea escaso, y que un único valor aumentado no pueda utilizarse aisladamente en la toma de decisiones.



**Figura I\_05.** Perfil de elevación de los principales marcadores cardíacos clásicos de uso clínico. Desde el año 2000 la creatinquinasa (CK) y la troponina (Tn) son los dos únicos marcadores aceptados por la Sociedad Europea de Cardiología (ESC) y Asociación Americana de Cardiología (AHA) para el diagnóstico del infarto agudo de miocardio (IAM).

## 2.4. Potenciales biomarcadores de uso clínico en SCA

Como se ha descrito anteriormente, los criterios clínicos actuales para el diagnóstico del IAM establecidos por la Sociedad Europea de Cardiología (ESC) y la Asociación Americana de Cardiología (AHA) incluyen la determinación de niveles plasmáticos de troponina y CKMB, ambos biomarcadores de necrosis miocárdica [50]. Sin embargo, sus niveles plasmáticos no se elevan hasta 4-6 horas después de la aparición de los síntomas, lo cual produce, indudablemente, un retraso en el diagnóstico. Por esta razón, existe un elevado interés en el descubrimiento de nuevos biomarcadores que puedan detectar y/o descartar el infarto de miocardio de manera mucho más precoz tras el inicio de los síntomas.

### 2.4.1. Moléculas de adhesión

Las moléculas de adhesión juegan un papel fundamental en la entrada de monocitos hacia el interior de la pared vascular. Por ello, se han estudiado sus formas solubles plasmáticas para evaluar su posible utilidad como marcadores de riesgo de eventos cardiovasculares [64]. No se han obtenido, sin embargo, resultado similares entre los diferentes estudios que han evaluado la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), la molécula de adhesión a células vasculares (VCAM-1) y las selectinas E y P como posibles marcadores de riesgo cardiovascular [65-71]. Así, en un estudio desarrollado

por Mulvihill et al, la VCAM-1 junto con la proteína C-reactiva (PCR), fue un predictor de futuros eventos cardiovasculares en pacientes con SCA, mientras que no hubo correlación con ICAM-1, selectina E y selectina P [70]. Por su parte, Malik et al encontraron que ninguna de las cuatro moléculas mostraba evidencias de añadir valor pronóstico al proporcionado por los factores clásicos de riesgo cardiovascular [71].

#### **2.4.2. Biomarcadores de isquemia miocárdica**

Entre los nuevos marcadores de isquemia que se han estudiado en los últimos años, destacan la albúmina modificada por isquemia (IMA), la fracción libre de ácidos grasos en plasma (AGL), la proteína de unión a ácidos grasos tipo corazón (H-FABP) y los péptidos natriuréticos cardíacos. La IMA presenta una baja exactitud diagnóstica con un alto número de falsos positivos y una baja especificidad [72], lo que sugiere que deba ser considerada como un marcador de isquemia aguda no específica para la isquemia cardíaca [73, 74]. El alto valor predictivo negativo observado en algunos estudios indica que la IMA, sola o en combinación con otros marcadores, puede ser útil como marcador de cribado en SCA [75, 76].

Se ha observado que aunque la mayoría de los ácidos grasos libres en el suero están unidos a albúmina, la pequeña fracción de ácidos grasos que circula libre (AGL) aumenta bajo situaciones de isquemia [77]. Niveles elevados de AGL han demostrado ser un factor de riesgo en enfermedad cardíaca súbita, así como de mortalidad en los pacientes sometidos a angiografía coronaria [78]. Por el momento no está claro si los altos niveles de AGL son una causa o una consecuencia de procesos patológicos que subyacen a la enfermedad coronaria [79].

La H-FABP se ha propuesto como un marcador diagnóstico de IAM cuyas concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan 5-6 horas después del inicio del evento y vuelven a la normalidad en 36 horas [80]. En un estudio desarrollado por Erlikh y col. en pacientes con SCASEST, H-FABP se mostró como el mejor predictor de eventos coronarios durante un año de seguimiento entre los diferentes marcadores de necrosis miocárdica utilizados (FABP, TnIc y CK-MB) [81]. Nizeki y col. encontraron que los pacientes con elevación persistente de H-FABP tenían la mayor tasa de eventos cardíacos, incluyendo las muertes cardíacas y re-hospitalizaciones [82]. Finalmente, varios estudios sugieren que H-FABP predice la mortalidad a largo plazo después de un SCA, de manera independiente a otros factores de riesgo y otros marcadores [83-85].

Diversos estudios han demostrado que los niveles plasmáticos de los péptidos natriuréticos cardíacos (BNP, NT-proBNP y ANP) aumentan inmediatamente después de la tensión inducida por isquemia cardíaca [86-89] lo que les convierte en interesantes biomarcadores de posible aplicación clínica. Sin embargo, debido a que su eliminación es fundamentalmente por vía renal, se ha encontrado que la disminución del aclaramiento renal provoca elevaciones en sus concentraciones plasmáticas, por lo que se debe tener en cuenta la función renal del paciente al evaluar su potencial como biomarcador diagnóstico [90, 91].

#### **2.4.3. Biomarcadores de inflamación**

Entre los nuevos marcadores de inflamación estudiados en enfermedades cardiovasculares figuran citocinas, marcadores de estrés oxidativo y marcadores de degradación de la matriz extracelular. La proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) regula el reclutamiento de los monocitos a los tejidos donde hay una respuesta inflamatoria activa, como es el caso en las lesiones ateroscleróticas. Se ha encontrado que concentraciones plasmáticas elevadas de MCP-1 se han asociado con diferentes factores de riesgo cardiovasculares y con un mayor riesgo de desarrollar eventos cardiovasculares en el futuro [92, 93]. El valor de la interleucina-6 (IL-6), como marcador de riesgo cardiovascular requiere todavía estudios confirmatorios, lo que limita actualmente su aplicación clínica, aunque los resultados de los estudios realizados hasta la fecha muestran un importante valor predictivo de SCA [94-97]. La mieloperoxidasa (MPO), por su parte, al igual que la PCR, ha demostrado ser un predictor independiente de eventos cardiovasculares adversos [98, 99]. La lipoproteína asociada a fosfolipasa A2 (Lp-PLA2), junto con la PCR, es el mejor predictor de riesgo cardiovascular estudiado hasta la fecha [100-102]; por ello, la AHA indica que la Lp-PLA2 puede ser utilizada en la práctica clínica para mejorar la predicción del riesgo en los sujetos con riesgo cardiovascular intermedio [77].

Entre los marcadores de degradación de la matriz extracelular, se han encontrado valores séricos de matriz metaloproteinasas (MMP-2 y MMP-9) 2-3 veces más altos en pacientes con SCA que en sujetos control [103].

#### **2.4.4. Marcadores de activación plaquetaria**

El sCD40 y sCD40 ligando (sCD40L) se expresan en diversos tipos de células como plaquetas activadas, células endoteliales vasculares, monocitos y macrófagos. Varios estudios sugieren que los niveles elevados de sCD40L permiten identificar los pacientes con SCA con mayor riesgo de muerte e infarto de miocardio recurrente, independientemente de otros marcadores como la TnI y la PCR [104] y puede identificar a un subgrupo de pacientes que pueden beneficiarse de un tratamiento antiagregante plaquetario [105]. Otros estudios, sin embargo, han dado resultados contradictorios en relación con el valor pronóstico de sCD40L sugiriendo una ausencia de asociación entre sCD40L y el riesgo de muerte e infarto de miocardio recurrente según los resultados obtenidos en una gran cohorte de pacientes con SCA [106].

### **3. PROTEÓMICA**

La proteómica es la ciencia que estudia de manera dinámica el conjunto de proteínas expresadas por un organismo en un momento dado y bajo determinadas condiciones concretas de tiempo y ambiente, que se denomina proteoma [107, 108]. Los enfoques proteómicos clásicos para la identificación de biomarcadores de enfermedad se basan principalmente en el análisis comparativo de las proteínas expresadas en muestras biológicas de individuos sanos y pacientes enfermos para identificar proteínas que se expresan de manera diferencial mediante el uso combinado de la electroforesis bidimensional (2-DE) y la espectrometría de masas (MS). La necesidad del análisis de muestras biológicas cada vez más complejas ha llevado al desarrollo de nuevas técnicas de proteómica aleatoria (*shotgun proteomics*) en las que se emplean equipos híbridos que permiten la separación mediante cromatografía multidimensional de los componentes de la muestra y, posteriormente, se analizan las proteínas separadas mediante la espectrometría de masas en tándem (MS/MS). El desarrollo de estas técnicas ha facilitado la descripción de proteomas desconocidos, hasta el momento no accesibles a las técnicas proteómicas clásicas [109].

La identificación de nuevos biomarcadores transferibles a la práctica clínica es, en esencia, el objetivo final de la proteómica ya que su introducción permitiría ayudar a establecer un diagnóstico temprano de la enfermedad, podrían constituir nuevas dianas terapéuticas sobre la que desarrollar fármacos, o permitiría monitorizar la evolución del paciente frente a un tratamiento determinado y con ello poder establecer un correcto pronóstico.

#### **3.1. Técnicas de separación de proteínas**

El paso inicial para realizar el estudio proteómico de una determinada muestra biológica consiste en llevar a cabo la separación de la mezcla compleja de proteínas que constituyen la muestra a analizar antes de su identificación mediante MS. Las técnicas más utilizadas para llevar a cabo la separación son la electroforesis bidimensional, la electroforesis capilar y la cromatografía líquida (LC).

##### **3.1.1. Electroforesis bidimensional (2-DE)**

La electroforesis bidimensional (2-DE) es una técnica de separación de mezclas complejas de proteínas con gran capacidad resolutive que constituye la herramienta más empleada para el análisis y separación de los componentes del proteoma. A través de

dos electroforesis consecutivas aplicadas sobre la misma muestra, se consigue la separación de cientos o miles de proteínas en un único gel [110, 111].

Antes de realizar la primera electroforesis es necesario llevar a cabo una preparación correcta de la muestra ya que este paso será determinante para que la separación de las proteínas tenga lugar correctamente. En primer lugar, será necesario llevar a cabo la eliminación de todas las sustancias presentes en la muestra (sales, lípidos, ácidos nucleicos, etc.) que puedan interferir en el análisis. Posteriormente, se llevará a cabo una correcta solubilización de las proteínas. Este paso consiste en la eliminación de las interacciones no covalentes y de los puentes disulfuro presentes en las proteínas para facilitar su posterior separación. La inclusión en el tampón de solubilización de agentes caotrópicos como la urea y tiourea permiten la desnaturalización de las proteínas por ruptura de puentes de hidrógeno, dejando expuestos los residuos hidrofóbicos que son solubilizados por los agentes surfactantes encargados de mantener las proteínas en disolución, como es el caso del [3-[3-(colaamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato] (CHAPS), SDS y Tritón X-100. Los agentes reductores, como el ditioneitol (DTT),  $\beta$ -mercaptoetanol y las fosfinas, completan la desnaturalización proteica por ruptura de puentes disulfuro de los residuos de cisteínas y los mantienen reducidos. La inclusión de anfófilos, mejora la solubilidad de las proteínas en el tampón evitando que precipiten antes de llevar a cabo la primera dimensión [112].

En la primera separación electroforética, las proteínas se separan bajo la aplicación de un campo eléctrico en base a su punto isoelectrico (pI) en gradientes de pH inmovilizados (IPG) seleccionados en cada caso para obtener la máxima resolución del grupo de proteínas de interés. Al aplicarse la diferencia de potencial entre los dos electrodos, las proteínas migrarán hacia el cátodo o el ánodo hasta que alcancen el punto de la tira donde el pH corresponde a su punto isoelectrico y se detengan. Esta técnica fue desarrollada inicialmente en los años 70 por Kenrick & Margolis [113], Klose [114] y O'farrell [115], pero su uso se generalizó a partir de los años 80, tras la invención de un método para generar tiras de poliacrilamida con gradientes de pH inmovilizados que produjeron una clara mejorara en la reproductibilidad entre geles [116].

Una vez que las proteínas han sido separadas e inmovilizadas en tiras de poliacrilamida en función de sus pIs, es necesario realizar el equilibrado de las tiras que se realiza en dos pasos. En el primero se sumergen en un tampón de equilibrado con DTT para

romper los puentes disulfuro de las proteínas y mantenerlos reducidos y en el segundo paso se sumergen en tampón de equilibrado con iodoacetamida (IAA), que alquilará los grupos tiol reducidos para evitar su re-oxidación. La segunda electroforesis se realiza según el protocolo descrito por Laemmli [117] en geles de acrilamida en presencia de dodecil-sulfato sódico (SDS-PAGE). En este caso, las proteínas se van a separar según su peso molecular (PM), lo que condicionará el porcentaje de acrilamida a utilizar en la preparación de los geles en función del rango de PM que se quiera resolver.

Tras la segunda dimensión se pueden utilizar diferentes métodos de tinción con diferentes características de sensibilidad, linealidad, homogeneidad y reproducibilidad para la visualización de las manchas proteicas separadas [118]. Entre las posibles tinciones se encuentran el azul de Coomassie y el nitrato de plata, el cual presenta una alta sensibilidad, aunque se consigue un rango de detección lineal más amplio utilizando tinciones más actuales como Coomasie coloidal que tiene una sensibilidad mayor que el convencional o tinciones fluorescentes como el SYPRO Ruby [119, 120].

Finalmente, las imágenes de los geles teñidos con azul de Coomassie o nitrato de plata son digitalizadas mediante la utilización de un densitómetro y guardadas en archivos de imagen informáticos para poder ser analizadas por paquetes informáticos especializado, como PDQuest 2D Analysis Software (BioRad) con el que se realizará el procesamiento de las imágenes, la detección de las manchas proteicas, el emparejamiento de los puntos en los diferentes geles objeto de estudio y el análisis estadístico y cuantitativo final [119, 121, 122].

### **3.1.2. Electroforesis capilar (CE)**

La electroforesis capilar (CE) es una técnica de separación basada en la diferente velocidad de migración de las distintas especies cargadas bajo la acción de un campo eléctrico. La separación se lleva a cabo en un capilar de sílice fundido de diámetro muy pequeño donde se encuentra la disolución con los analitos a separar y el tampón o medio electrolítico encargado de conducir la corriente [123]. Se considera una técnica intermedia entre la electroforesis de zona clásica (ZE) y la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Utiliza el principio de la electroforesis capilar en solución libre en la que la separación de los analitos es muy rápida y con una reproducibilidad y sensibilidad mayor que la HPLC. En función del sistema de separación empleado se puede distinguir entre la electroforesis capilar de zona, el isoelectroenfoco capilar, la

isotacoforesis capilar y la cromatografía micelar electrocinética [124]. Su principal desventaja es que la mayoría de los tampones empleados no suelen ser suficientemente volátiles, lo que dificulta su acoplamiento con equipos de espectrometría de masas (CE-MS). No obstante, su gran poder de resolución la han convertido en una técnica muy utilizada para la búsqueda de nuevos biomarcadores en muestras biológicas, especialmente en orina [125].

### **3.1.3. Cromatografía líquida (LC)**

La cromatografía es una técnica de separación en la que los componentes de una mezcla compleja son separados en base a su diferente velocidad de desplazamiento al ser arrastrados por una fase móvil (líquida o gaseosa) a través de un lecho cromatográfico que contiene la fase estacionaria, la cual puede ser líquida o sólida. En el caso de la cromatografía líquida (LC) aplicada a mezclas de proteínas, estas se separan bajo diferentes principios según el soporte cromatográfico utilizado (intercambio iónico, fase reversa, afinidad, exclusión molecular, etc.) al ser arrastrados por una fase móvil líquida. La versatilidad de la LC permite que sea utilizada tanto como paso previo de la 2-DE para realizar un fraccionamiento previo de una mezcla compleja de proteínas o como paso posterior a la 2-DE [126-128]. El mayor potencial de la LC en el campo de la proteómica deriva del uso conjunto de un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas (LC-MS y LC-MS/MS) como ocurre en la tecnología multidimensional de identificación de proteínas (Multidimensional protein identification technology, MudPIT) [129]. La combinación de estas dos tecnologías está desplazando poco a poco al uso de técnicas de separación basadas en gel debido a su mayor rapidez, sensibilidad, reproducibilidad y aplicabilidad a un mayor tipo de muestras. Además, permite analizar mezclas de proteínas utilizando cantidades mucho más pequeñas de muestra que las técnicas basadas en gel gracias a la aparición de equipos HPLC que trabajan con volúmenes de muestra del orden de microlitos ( $10^{-6}$  L) y nanolitros ( $10^{-9}$  L).

### 3.2. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica en la que los átomos o moléculas de una muestra son ionizados, separados atendiendo a su relación masa/carga ( $m/z$ ) y finalmente detectados y registrados. Las ventajas de la MS incluyen una elevada sensibilidad, con límites de detección del orden de femtomoles ( $10^{-15}$  moles) y attomoles ( $10^{-18}$  moles), gran versatilidad que permite determinar la estructura de tipos de compuestos muy diversos, volátiles, no volátiles, polares y apolares, sólidos, líquidos y gases y una gran especificidad en la determinación del peso molecular debido a la posibilidad de medir exactamente su masa molecular así como obtener información a partir de los fragmentos iónicos del analito.

Un espectrómetro de masas está constituido por tres componentes fundamentales: una fuente de iones que ioniza y vaporiza las muestras, un analizador de masas que separa los iones generados en función de su relación  $m/z$  y un detector de iones, que genera señales proporcionales a la abundancia relativa de cada ion. Una vez obtenidas estas señales, un programa informático procesa los datos y genera gráficos de abundancia relativa de iones frente a  $m/z$  conocidos como espectros de masas (Figura I\_06).

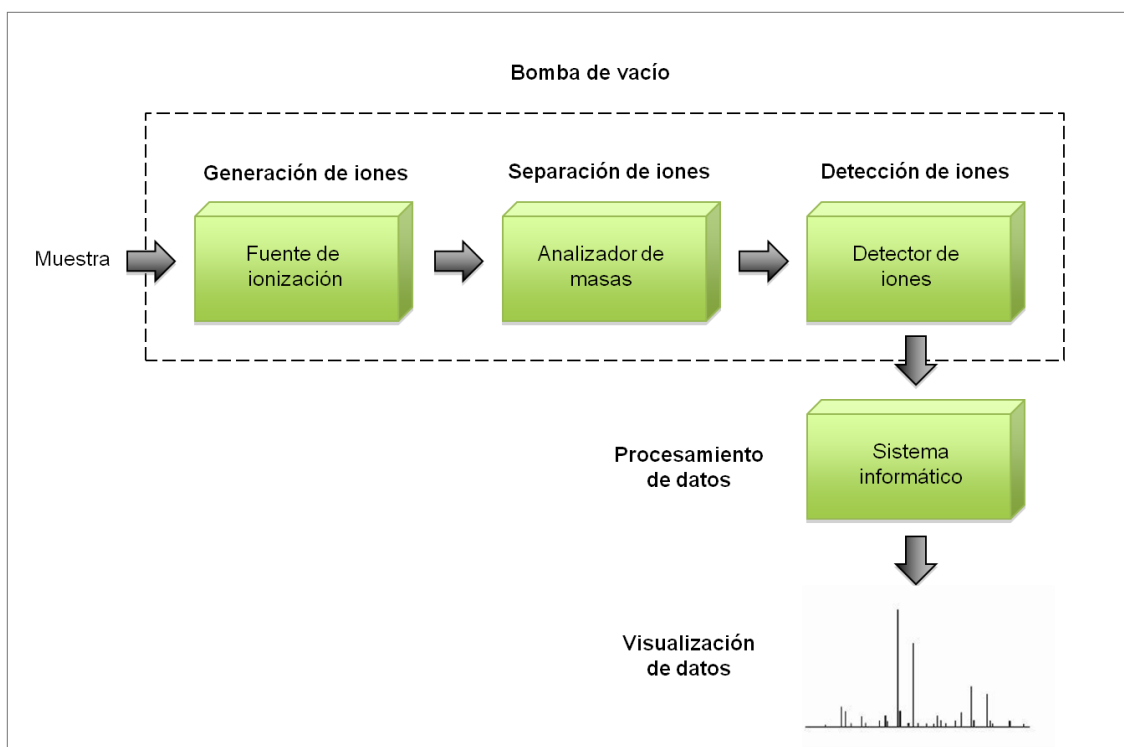


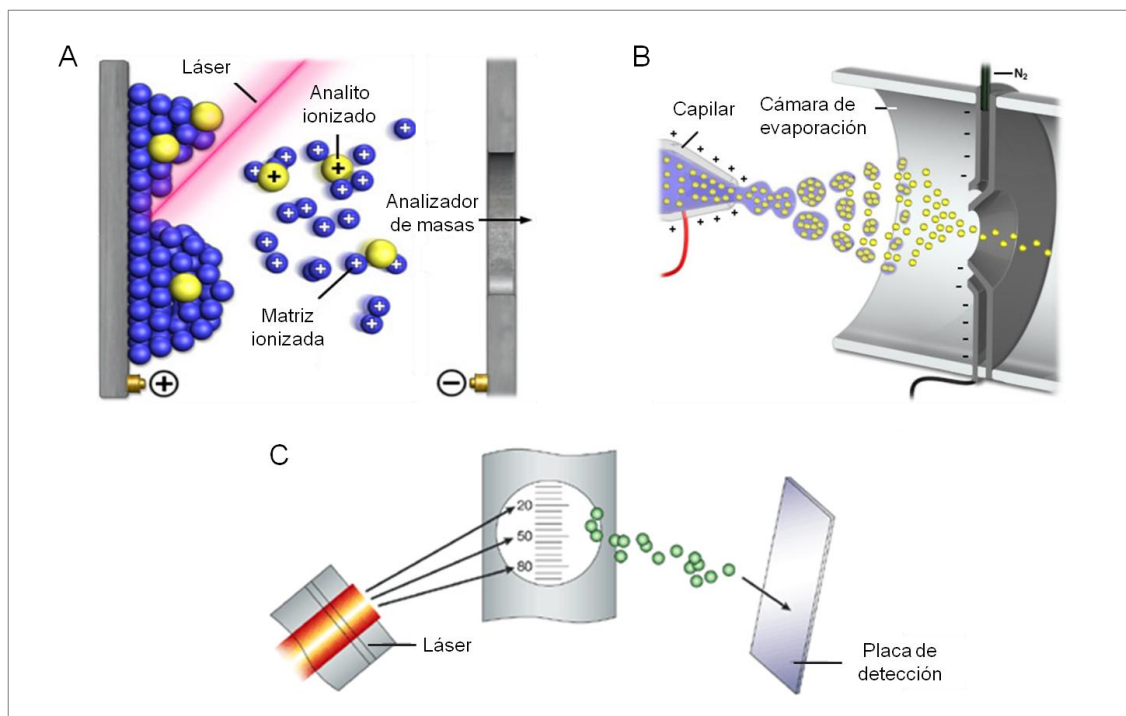
Figura I\_06. Esquema de los elementos que componen un espectrómetro de masas.

### 3.2.1. Tipos de fuentes de ionización

La fuente de iones es el elemento del espectrómetro de masas que se encarga de ionizar los compuestos que van a ser analizados. La elección del tipo de ionización viene determinada por la naturaleza de la muestra y la clase de información que se desea obtener. El aspecto de los espectros de masas obtenidos para diferentes especies moleculares depende en gran medida del sistema de ionización utilizado.

#### 3.2.1.1. Ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI)

En una fuente de ionización MALDI, la muestra se mezcla con la matriz en presencia de un disolvente orgánico sobre una placa metálica, de tal forma que ambas co-cristalizan cuando se evapora el disolvente. Esta placa metálica se introduce en la cámara de ionización del espectrómetro de masas y se somete a pulsos cortos de láser en alto vacío lo que provoca que la absorción de energía por parte de la matriz sea convertida en energía de excitación y en transferencia de protones a la muestra (ionización) dando lugar, normalmente, a especies monocargadas. Debido a los pulsos de láser, el área irradiada se calienta dando lugar a la desorción de los iones de fase sólida a fase gaseosa. La aplicación posterior de un campo eléctrico permite el movimiento de los iones generados hacia el analizador de masas [130, 131].



**Figura I\_07.** Esquema del funcionamiento de los diferentes tipos de fuentes de ionización. (A) Ionización/desorción láser asistida por matriz, (B) Ionización por electrospray y (C) SELDI.

### **3.2.1.2. Ionización por electrospray (ESI)**

En la ionización por electrospray (ESI), la muestra se disuelve en un tampón volátil y se hace pasar a través de un capilar metálico al que se aplica un alto potencial eléctrico. A la salida del capilar, la solución se dispersa en forma de spray formado por pequeñas gotas cargadas, las cuales se evaporan rápidamente bien por un proceso de desorción del campo eléctrico o de evaporación del solvente, liberando moléculas ionizadas en la fase gaseosa que son acelerados por el campo eléctrico hacia el analizador de masas [130-134].

La ESI constituye el mejor sistema de ionización cuando se acopla la cromatografía de líquidos (LC) o la electroforesis capilar (CE) con MS ya que permite analizar con gran sensibilidad numerosos compuestos no volátiles y termolábiles, con un intervalo de pesos moleculares muy amplio.

### **3.2.1.3. Ionización por láser inducida en superficie (SELDI)**

En la ionización por láser inducida en superficie (SELDI) un analito o grupo de analitos se fijan sobre la superficie de los pocillos situados en un chip en los que se ha dispuesto una fase sólida. Se pueden fijar por adsorción, reparto, interacciones electrostáticas o afinidad; posteriormente la superficie sólida se cubre con una sustancia que actúa de matriz y se somete a la acción del láser lo que provoca la absorción de energía por parte de la matriz que se convierte en energía de excitación transfiriendo protones a la muestra que se ioniza [131, 134]. Dado que se trata de dos sistemas de ionización muy similares, el SELDI-MS se utiliza normalmente para el análisis de proteínas de elevado peso molecular mientras que el MALDI-MS se aplica a proteínas y péptidos de menor peso molecular.

## **3.2.2. Tipos de analizadores de masas**

El analizador de masas es el componente del espectrómetro de masas encargado de separar los iones en función de su relación  $m/z$  y enfocar los iones separados al detector.

### **3.2.2.1. Cuadrupolo**

El analizador de cuadrupolo, está formado por cuatro barras paralelas, a las que se aplica un potencial de corriente continua y sobre el que se superpone un potencial de radiofrecuencia. Los iones que entran en su interior se someten al campo creado en ellas que actúa a modo de filtro para que sólo los iones con una determinada relación  $m/z$  lleguen al detector [130, 131, 135]. El analizador de cuadrupolo es uno de los más

extendidos, por su relativa sencillez y por poder ser acoplado a diferentes fuentes de ionización, incluida la ESI, para el análisis de proteínas y biomoléculas, así como por su bajo coste. Sus limitaciones se concretan en su intervalo de trabajo, en la imposibilidad de realizar análisis de alta resolución, y en la dificultad para la determinación exacta de las masas.

#### **3.2.2.2. Tiempo de vuelo**

En un analizador de tiempo de vuelo (time of flight, TOF), se mide el tiempo que necesitan los iones previamente acelerados por la acción de un campo eléctrico para recorrer una distancia determinada sin estar sometidos a un campo eléctrico y/o magnético [130-132]. Cuando se une a un sistema de ionización MALDI da lugar a equipos MALDI-TOF, muy utilizados en el análisis de biomoléculas dada su gran sensibilidad.

#### **3.2.2.3. Analizador de resonancia iónica en ciclotrón con transformada de Fourier**

Es un analizador que dispone de una celda de trampa de iones como elemento principal. Estas celdas están diseñadas aprovechando el fenómeno de resonancia iónica en ciclotrón por la que iones presentes en un campo magnético orbitan a una frecuencia que depende de su relación  $m/z$  y de la intensidad del campo magnético aplicado. La aplicación posterior de una señal eléctrica de frecuencia igual a la frecuencia de giro de la partícula hace que esta absorba energía y aumente su radio de giro. Cuando la mezcla de iones se excita unos milisegundos mediante una señal de frecuencia variable, los iones se sitúan próximos a las placas detectoras que recogen la señal que estos ofrecen [130]. Mediante una transformada de Fourier se obtienen los correspondientes espectros de masas.

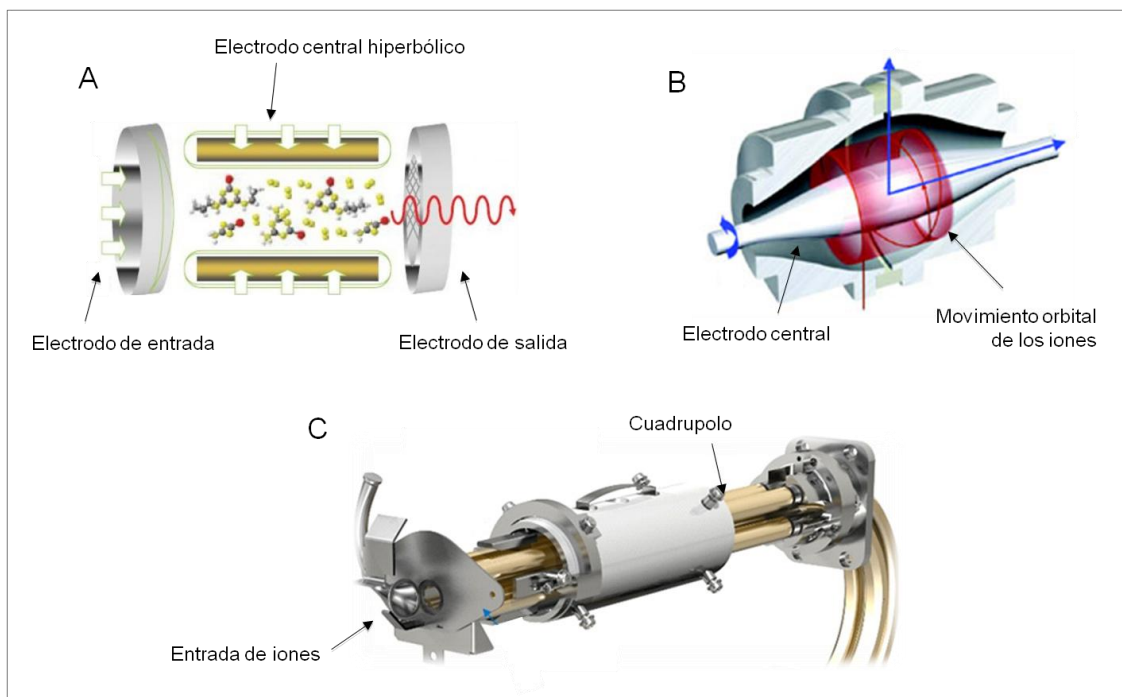
#### **3.2.2.4. Trampa de iones**

Un analizador de trampa de iones consta de un electrodo hiperbólico en forma de anillo central y otros dos electrodos colectores. Los iones procedentes de la fuente de ionización penetran a través de una rejilla en el electrodo colector y según su  $m/z$  y el campo aplicado, circulan en una órbita estable o se desestabilizan pasando al detector [130]. Los instrumentos de IT se caracterizan por tener una elevada sensibilidad pero con una resolución limitada y una relativamente baja capacidad de atrapar iones.

#### **3.2.2.5. Analizador Orbitrap**

El analizador orbitrap se basa en el principio de separación de los iones en un campo eléctrico oscilante alrededor de un electrodo de forma de huso. Presenta unas

prestaciones similares a un analizador de resonancia iónica en ciclotrón con transformada de Fourier, en términos de resolución y exactitud de la masa [136, 137].



**Figura I\_08.** Diagrama esquemático de las partes de varios analizadores de masas. (A) Trampa de iones, (B) Orbitrap y (C) Cuadrupolo.

### 3.2.3. Detectores

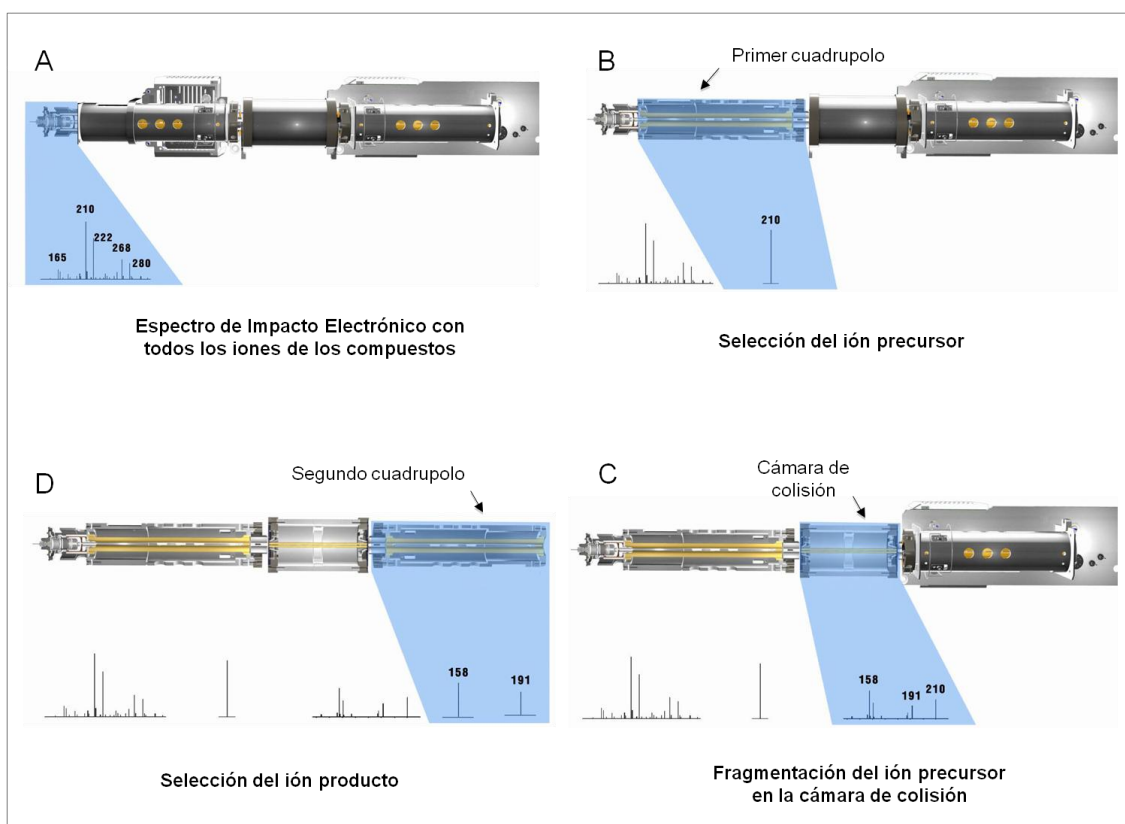
Dentro de un espectrómetro de masas, el detector es el componente encargado de proporcionar información sobre la abundancia de iones que salen del analizador de masas. Para ello, transforman el chorro de iones en una señal eléctrica que puede ser amplificada, almacenada y presentada mediante el sistema de tratamiento de datos de forma que se pueda interpretar. Los detectores han de tener una elevada sensibilidad, exactitud y resolución, un tiempo de respuesta corto, alta estabilidad, un amplio intervalo dinámico y un nivel de ruido bajo. Entre los detectores más utilizados destacan los fotomultiplicadores y la copa de Faraday.

### 3.3. Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

Se denomina espectrometría de masas en tándem (MS/MS) al acoplamiento de dos espectrómetros de masas unidos por una cámara de fragmentación. Se trata de uno de los espectrómetros más interesantes para la identificación de compuestos en mezclas complejas tanto en análisis proteómico como metabolómico [138-140].

En un análisis por espectrometría de masas en tandem (MS/MS), el primer espectrómetro de masas permite seleccionar un ión determinado entre los iones

producidos en el sistema de ionización al que se denomina ión precursor. Una vez seleccionado el ión precursor de interés, éste se introduce en la cámara de colisión donde por acción de un campo eléctrico adquiere una elevada energía cinética y colisiona con las moléculas del gas inerte contenido en la cámara. Como consecuencia de esta colisión, el ión se fragmenta de nuevo dando lugar a pequeños fragmentos denominados iones producto, los cuales entran en el segundo espectrómetro de masas. De entre los iones producto se elige uno que junto con el ión precursor seleccionado en el primer cuadrupolo dará lugar a la pareja ión precursor/ión producto característica de la molécula a analizar. En la Figura I\_09 se muestra el funcionamiento de un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo.



**Figura I\_09.** Esquema del funcionamiento de un triple cuadrupolo. El espectro de impacto electrónico (A) permite elegir el ión precursor que será aislado en el primer cuadrupolo (B), fragmentado en la cámara de colisión (C) y el ión producto seleccionado en el segundo cuadrupolo (D).

## 4. METABOLÓMICA

La metabolómica es la ciencia que estudia el conjunto de productos finales y subproductos de las diferentes vías metabólicas, denominados metabolitos, que existen en los seres humanos y otros sistemas vivos [141]. El término metaboloma fue utilizado por primera vez por Oliver y col. en 1998 para describir el conjunto de pequeñas moléculas que componen un organismo [142]. Los metabolitos endógenos que son típicamente estudiados en un análisis metabolómico incluyen ácidos orgánicos, aminoácidos, aminos, azúcares, esteroides, bases de ácidos nucleicos y otras sustancias que son intermediarios en el metabolismo celular. Esta gran diversidad de propiedades químicas de los metabolitos y los amplios rangos de concentración en los que pueden encontrarse en las muestras biológicas estudiadas, hace necesaria la utilización conjunta de varias técnicas de separación para abarcar completamente su estudio [143].

### 4.1. Tipos de estudios metabolómicos

Se pueden distinguir dos tipos de estudios metabolómicos, según se realice un enfoque dirigido o no dirigido a analizar un grupo de metabolitos determinado. Los estudios metabolómicos no centrados en un grupo determinado de metabolitos se denominan estudios de huella dactilar metabolómica (*metabolomic fingerprinting*) cuyo objetivo es identificar el mayor número de metabolitos posible en una muestra con el fin de clasificar los fenotipos asociados a un estado concreto, por ejemplo en el estudio de una enfermedad, basándose en un patrón de metabolitos. Pueden emplearse una amplia variedad de muestras biológicas con este fin, tales como orina, plasma/suero, tejidos/células, y la saliva. Este enfoque puede ser, además, utilizado como una herramienta de diagnóstico para evaluar el estado de enfermedad por la comparación de los perfiles metabolómicos de controles sanos y pacientes de enfermedades, o para monitorizar el éxito de un tratamiento particular [144]. Los estudios metabolómicos no dirigidos son, por lo tanto, los más interesantes y adecuados para el descubrimiento de nuevos biomarcadores. En el caso de los estudios metabolómicos dirigidos, conocidos normalmente como estudios de perfil metabolómico (*metabolomic profiling*), el enfoque se limita al estudio un conjunto predeterminado de metabolitos relacionados con una vía metabólica específica [145, 146]. En este enfoque, los metabolitos diana se seleccionan de antemano y se evalúan a través de métodos analíticos específicos. Los avances tecnológicos de los últimos años han permitido aumentar el número de metabolitos que se puede cuantificar de forma simultánea.

## **4.2. Flujo de trabajo en metabolómica**

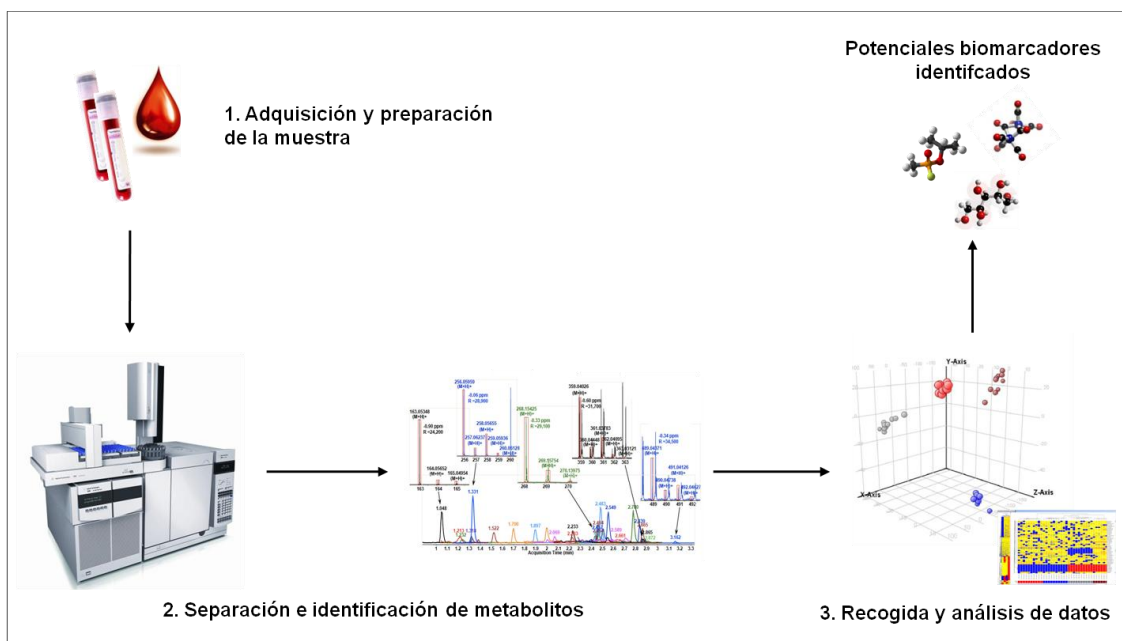
Un experimento metabolómico consta normalmente de tres partes: 1) adquisición y preparación de la muestra, 2) separación y detección de los metabolitos, 3) obtención y análisis de datos.

### **4.2.1. Adquisición y preparación de la muestra**

Los metabolitos se puede medir en una gran variedad de muestras diferentes como tejidos, fluidos biológicos (sangre, orina, saliva, líquidos extravasculares, etc.), y cultivos celulares [147]. En el transcurso de un análisis metabolómico de muestras biológicas humanas es necesario tener en cuenta que los niveles de muchos metabolitos pueden verse afectados por factores individuales tales como la edad, sexo, dieta, nivel de actividad, y la medicación [148]. La preparación de la muestra por lo general implica la extracción y enriquecimiento de los metabolitos en un disolvente orgánico en el caso de que estos sean extraídos de la muestra original o bien la eliminación de las proteínas y la matriz si el análisis metabolómico se realiza sobre la propia muestra. En general, cualquier paso previo de tratamiento de las muestras que se incluya antes de su análisis se traducirá en un cierto grado de pérdida de muestra por lo que es necesario seleccionar cuidadosamente el protocolo de preparación adecuado para limitar los pasos de pre-tratamiento y minimizar las pérdidas [149, 150].

### **4.2.2. Separación y detección de metabolitos**

Una vez realizada la preparación de la muestra será necesario, al igual que ocurre en la proteómica, llevar a cabo la separación y el análisis del conjunto de metabolitos que componen la muestra a estudiar. Como se indicó anteriormente, la gran variabilidad en las propiedades físico-químicas de los metabolitos tales como polaridad, solubilidad, y la volatilidad, así como la amplitud de su rango dinámico de concentraciones requiere el uso combinado de varias técnicas. Las dos principales plataformas de análisis utilizadas en metabolómica son la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (MS) [151, 152]. Ambas técnicas son capaces de llevar a cabo de manera reproducible la medición de un gran número de metabolitos en una muestra dada. El análisis detallado del conjunto de técnicas utilizadas en los estudios metabolómicos que derivan del uso de RMN y MS se realiza en el apartado 4.3.

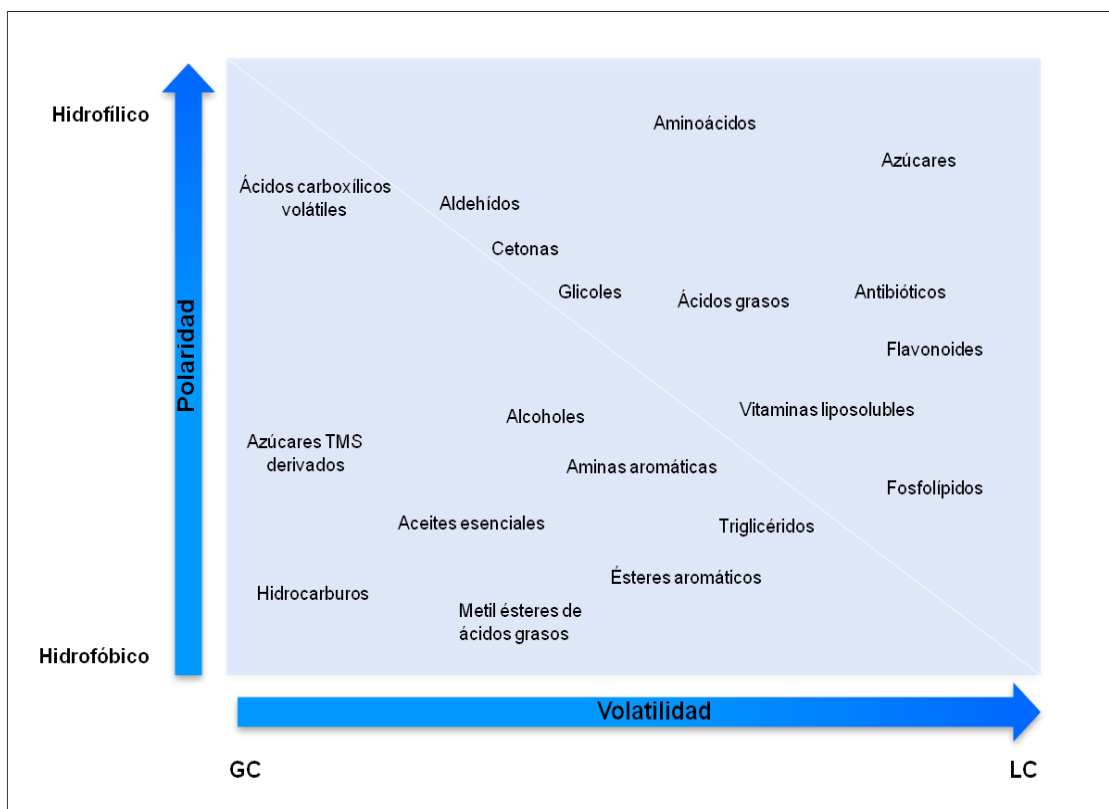


**Figura I\_10.** Esquema de las fases que componen un flujo de trabajo metabolómico.

#### 4.2.3. Obtención y análisis de datos

El análisis metabolómico de una muestra genera grandes cantidades de datos que requieren una correcta interpretación. Idealmente, los programas de análisis de datos deben ser capaces de eliminar el ruido de los espectros, identificar adecuadamente que metabolito corresponde a cada pico cromatográfico y realizar una correcta alineación de los picos correspondientes a un mismo compuesto en varias muestras sucesivas [153, 154]. Aunque existen varios programas comerciales libres disponibles para automatizar este proceso [155], generalmente la mayoría de equipos generan datos que pueden ser leídos sólo con programas propios del fabricante del instrumento. El reconocimiento de patrones que se obtienen en los estudios metabolómicos requiere el uso de herramientas estadísticas como el análisis de componentes principales (ACP) y el análisis discriminante para identificar el patrón espectral de cada grupo en estudio y las intensidades de los metabolitos en cada muestra. Después de la identificación y cuantificación de cada metabolito en la muestra debe realizarse un análisis estadístico multivariante para determinar que metabolitos se encuentran en diferente concentración entre los grupos experimentales. Es necesario considerar el error sistemático que puede ser introducido debido a pequeñas variaciones en las condiciones experimentales, en lo referente a la preparación de las diferentes muestras, e instrumentales, donde la pequeña variación de algún parámetro puede dar lugar a diferencias significativas. En muchos casos, el uso rutinario de estándares internos para normalizar los conjuntos de datos

permite conocer y contrarrestar, si existiera, errores de desviación instrumental como puede ser la variación en los tiempos de retención.



**Figura I\_11.** Las características físico-químicas de los metabolitos presentes en la muestras condicionan las técnicas necesarias para su determinación.

### 4.3. Principales plataformas de análisis metabolómico

#### 4.3.1. Resonancia magnética nuclear

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica de análisis espectroscópico en la que los núcleos atómicos de los compuestos a estudiar se alinean gracias a la aplicación de un campo magnético constante para posteriormente perturbar este alineamiento con el uso de un campo magnético alterno, de orientación ortogonal. El espectro de RMN resultante es una colección de picos a posiciones e intensidades diferentes y características de cada compuesto que permiten su identificación [156]. Entre las ventajas que presenta la RMN se encuentran su capacidad para detectar múltiples metabolitos en un solo experimento [157], el tratarse de una técnica que no destruye la muestra durante el análisis, a diferencia de la espectrometría de masas (MS), y que no requiere preparación previa de la muestra. Permite además, obtener información estructural que puede facilitar la identificación de un metabolito desconocido. Como desventajas de esta técnica figuran su baja sensibilidad y resolución

espectral, lo que supone su escasa capacidad para determinar metabolitos que se encuentran en baja concentración, lo que le ha restado interés para su aplicación en experimentos metabolómicos frente a las técnicas basadas en MS [158].

#### **4.3.2. Cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC-MS)**

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), empleando una ionización por electrospray (ESI) como fuente de ionización, constituye la plataforma más utilizada en la actualidad para el análisis metabolómico [159, 160]. Su popularidad se debe a su gran versatilidad, que permite el análisis de una amplia variedad de moléculas. Además, a diferencia de los que ocurre con la cromatografía de gases (GC), no es necesaria la volatilidad de la muestra por lo que su derivatización previa al análisis no es necesaria disminuyendo de esta manera las pérdidas de muestra secundarias a su pre-tratamiento. Los equipos LC-MS permiten una mayor cobertura de metabolitos, atendiendo a sus distintas características físico-químicas que los equipos de GC-MS (Figura I\_11). Recientemente, se ha desarrollado un nuevo tipo de LC llamado cromatografía hidrofílica de interacción (HILIC) que permite analizar los compuestos polares no analizables mediante la LC convencional [161]. A pesar de sus ventajas, HILIC tiene claras desventajas que incluyen una mala reproducibilidad, con variación en los tiempos de retención cuando se analizan múltiples muestras. El amplio rango de características físico-químicas de los metabolitos que pueden analizarse mediante LC ha hecho que surjan alternativas específicas para compuestos de determinada naturaleza como es el caso de la ionización química dinámica (APCI) para los compuestos no polares tales como lípidos. Los analizadores más comunes que se utilizan en los estudios metabolómicos son el cuadrupolo, la trampa iónica y el analizador de tiempo de vuelo (TOF). Otros tipos de analizadores que se pueden emplear son orbitrap, la resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier (FT-ICR) y el triple cuadrupolo (QQQ).

#### **4.3.3. Cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS)**

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) es una plataforma de uso común en la metabolómica y constituye una excelente elección para el análisis de compuestos volátiles tales como ácidos grasos y ácidos orgánicos. Debido a que la separación en GC se produce en función de sus diferentes puntos de ebullición, es necesario que los metabolitos a separar sean volátiles y estables térmicamente. En la mayoría de los casos, el conjunto de metabolitos presentes en una muestra no va a

cumplir estas condiciones por lo que es necesario realizar la derivatización previa de la muestra antes del análisis. Entre los reactivos de derivatización más utilizados se encuentran el BSTFA (N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida) y el MSTFA (N-metil(trimetilsilil)trifluoroacetamida) [149, 162-165]. La reacción de derivatización es un paso que puede dar lugar a la formación de productos secundarios que darán lugar a análisis cualitativos y cuantitativos erróneos. Por ejemplo, en el caso de los monosacáridos la derivatización conduce a múltiples picos perteneciente a cada compuesto individual del azúcar. Esto se evita mediante la introducción de un paso previo de oximación antes de sililación, que disminuye el número de picos obtenidos para cada monosacárido. A diferencia de lo que ocurre cuando se emplea LC-MS, la introducción de un paso de pre-tratamiento previo de la muestra puede resultar en la pérdida de parte de la muestra lo que constituye la principal desventaja de GC-MS.

Una de las más aspectos útiles cuando se usa la GC-MS para los estudios metabolómicos es la existencia de bibliotecas de espectros de masas que facilitan la labor de identificación de los metabolitos que componen la mezcla. La GC posee, además, un poder de resolución mucho mayor que la LC con tiempos de retención más robustos y reproducibles. Sin embargo, GC-MS tiene rango de masa limitada y el ion molecular a menudo no se detecta debido a la fragmentación, lo que dificulta la identificación de compuestos desconocidos. Recientemente, han surgido estrategias alternativas para mejorar la separación y la sensibilidad de mezclas complejas de metabolitos como los cromatógrafos de gases bidimensionales GCxGC, que separan las muestras complejas, desviando cada metabolito de una primera columna de CG a una segunda columna GC.

#### **4.4. Estudios metabolómicos previos**

Con el desarrollo de las técnicas de espectrometría de masas han aparecido los primeros estudios metabolómicos en el campo de las enfermedades cardiovasculares. Así se han descrito disminuciones en los niveles de ácido cítrico, 4-hidroxiprolina, ácido aspártico y la fructosa, y niveles aumentados de lactato, urea, glucosa, y valina de en plasma de pacientes con SCASEST mediante GC-MS [166]. En pacientes con PMI se identificaron mediante MS siete metabolitos alanina, ácido aminoisobutírico, hipoxantina, isoleucina/leucina, ácido malónico, treonina, y trimetilamina N-óxido elevados a los diez minutos del inicio de la isquemia y otro seis nuevos metabolitos 1-metilhistamina, colina, inosina, serina, prolina y la xantina a los 60 minutos [167].

En modelo animal de ratas con aterosclerosis, empleando cromatografía líquida ultra rápida acoplada a un espectrómetro de masas TOF (UFLC/MS-IT-TOF) fueron identificados 12 metabolitos como posibles marcadores biológicos en plasma y 8 en orina. La concentración de leucina, fenilalanina, triptófano, acetilcarnitina, butirilcarnitina, propionilcarnitina y espermina estaba disminuida en el plasma, y 3-O-metil-dopa, etil N-2-acetil-L-argininato, glucuronato, leucilprolina, N-6-(N-treonilcarbonil)-adenosina y ácido metil-hipúrico se vieron disminuidos en la orina [168].

Los cambios metabólicos asociados a la aterosclerosis también han sido investigados mediante RMN y GC-MS [169]. Así, se han descrito alteraciones en metabolitos tales como el glutamato, alfa-cetoglutarato, succinil CoA, 4-OH-prolina, 2-hidroxiacetato, la creatinina, el piruvato, oxalacetato, malato, glicolato y 2,3,4-trihidroxiacetato. Se han encontrado también posibles marcadores de isquemia como la glucosa, lactato, ácidos grasos libres, cuerpos cetónicos totales, 3-hidroxiacetato, piruvato, leucina/isoleucina y el glutamato cuyas concentraciones son más bajas en estados de pre-isquemia [169]. Igualmente se han descrito algunos metabolitos del ciclo del ácido cítrico disminuidos en la IAM [170].

Los perfiles metabolómicos basados en la MS cuantitativa también se utilizaron para estudiar la heredabilidad de la enfermedad coronaria prematura en personas no afectadas por enfermedad arterial coronaria (EAC), pero que tenían miembros de la familia afectados [171]. Se observó patrones de heredabilidad en los niveles de aminoácidos tales como arginina, ornitina, alanina, prolina, leucina/isoleucina, valina, glutamato/glutamina, fenilalanina y glicina y ácidos grasos libres, tales como araquidónico, linoleico palmítico, y acilcarnitinas. Esto indicaría que los procesos metabólicos podrían estar controlados genéticamente, lo que implicaría una correlación entre genotipo y fenotipo en las familias con EAC.

Por otra parte, un perfil metabolómico compuesto por dicarboxiacilcarnitinas obtenido mediante GC-MS fue predictivo de eventos cardiovasculares mayores en los pacientes y las diferencias más significativas persistieron después del ajuste por factores de riesgo de EAC [172]. Mediante RMN se estudiaron los cambios de 24 metabolitos preseleccionados en pacientes con fibrilación auricular. Se encontraron aumentados significativamente el beta-hidroxiacetato, aminoácidos cetogénicos y glicina, lo que

sugiere un papel patológico de los perfiles de cuerpos cetónicos en esta enfermedad [173].

## **Objetivos**



# Objetivos

*Daría todo lo que sé por la mitad de lo que ignoro*

René Descartes

El objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral consiste en establecer perfiles proteómicos y metabolómicos que nos permitan conocer más profundamente la fisiopatología del SCA mediante el estudio diferencial de proteínas y metabolitos en plasma de pacientes con SCA frente a controles sanos. Se trata de buscar nuevas dianas que puedan servir para ampliar el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en el SCA y al mismo tiempo poder descubrir nuevos biomarcadores de enfermedad que puedan ser utilizados con valor diagnóstico y/o pronóstico en la práctica clínica, para lo cual planteamos los siguientes objetivos concretos:

1. Estudiar la expresión diferencial de proteínas en plasma de pacientes con SCASEST frente a controles sanos mediante electroforesis bidimensional diferencial en gel (2D-DIGE) utilizando técnicas de depleción y ecualización de proteínas mayoritarias.
2. Identificar mediante espectrometría de masas (MS) las proteínas diferencialmente expresadas en plasma deplecionado y ecualizado de pacientes con SCASEST frente a controles sanos.
3. Estudiar la posible existencia de un perfil proteómico característico en plasma de pacientes con SCACEST mediante el estudio de expresión diferencial de proteínas frente a controles sanos mediante 2D-DIGE utilizando técnicas de depleción de proteínas mayoritarias.

4. Identificar mediante MS las proteínas diferencialmente expresadas en plasma deplecionado de pacientes con SCACEST frente a controles sanos.
5. Realizar un estudio metabolómico de plasma completo y de ácidos grasos en plasma de paciente con SCASEST frente a controles sanos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).
6. Identificar y conocer la implicación de los metabolitos expresados diferencialmente en plasma de pacientes con SCASEST en las diferentes rutas metabólicas del organismo para poder establecer su relación con el desarrollo del SCA.
7. Validar los resultados obtenidos en la identificación de proteínas diferencialmente expresadas mediante técnicas complementarias: inmunodetección y monitorización de reacción seleccionada (SRM).
8. Validar los resultados obtenidos en el estudio metabolómico diferencial mediante GC-MS.

## **Material y Métodos**



# Material y Métodos

*Todo nuestro conocimiento arranca del sentido, pasa al entendimiento  
y termina en la razón*  
Immanuel Kant

## 1. ANÁLISIS PROTEÓMICO DEL PLASMA

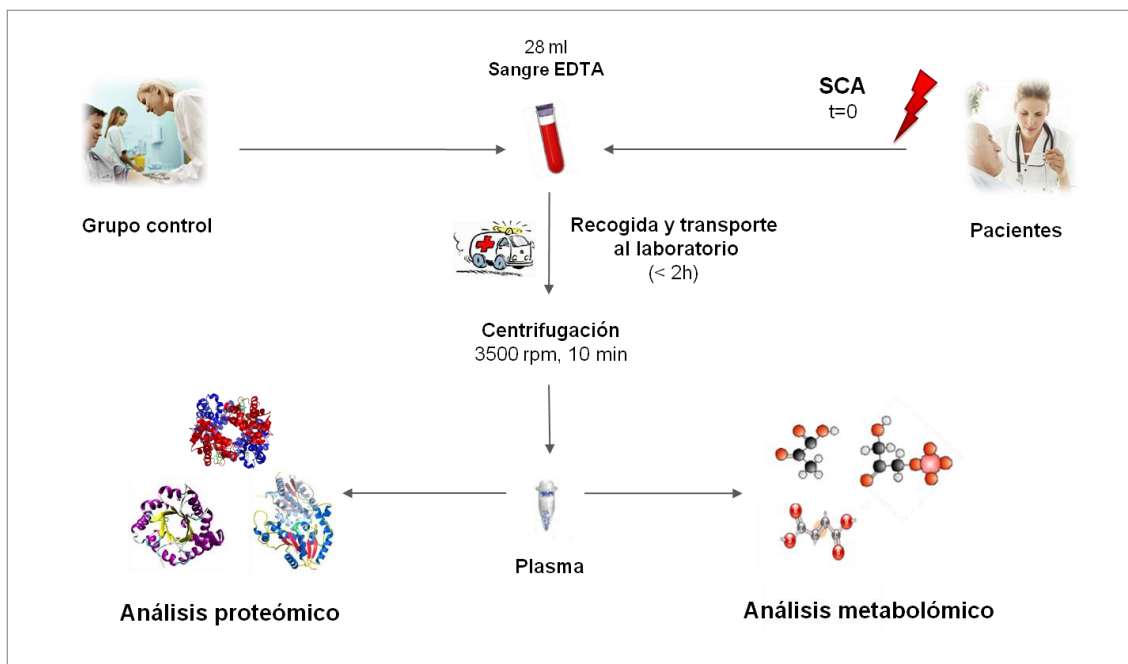
### 1.1. Selección de pacientes y obtención de las muestras

La selección de pacientes se realizó en el Servicio de Hemodinámica del Hospital Virgen de la Salud, SESCAM (Toledo). Se establecieron tres grupos experimentales; 1) pacientes con síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST en el electrocardiograma (SCASEST), 2) pacientes con síndrome coronario agudo con elevación del segmento ST en el electrocardiograma (SCACEST) y 3) controles sanos. La inclusión de los pacientes en cada uno de los grupos fue llevada a cabo por el Dr. José Moreu, Jefe del Servicio de Hemodinámica.

	Controles sanos (n=30)	Pacientes SCASEST (n=30)	Pacientes SCACEST (n=30)
<b>Datos personales</b>			
Media de edad	64.2 ± 11.5	68.3 ± 9.8	67.1 ± 8.7
Sexo % (Hombre/Mujer)	48/52	77/23	79/21
<b>Factores de riesgo</b>			
Fumadores	8%	28%	31%
Ex-fumadores	8%	24%	22%
Diabetes melitus	4%	16%	24%
Dislipemia	16%	67%	56%
Hipertensión	40%	64%	72%
Enfermedad renal	0%	10%	10%
<b>Datos bioquímicos</b>			
Colesterol total (mg/dL)	182 ± 37	165 ± 27	172 ± 28
LDL (mg/dL)	103 ± 36	99 ± 28	109 ± 31
HDL (mg/dL)	50 ± 12	49 ± 8	47 ± 9
Triglicéridos (mg/dL)	123 ± 50	144 ± 59	161 ± 43
<b>Antecedentes</b>			
SCA previos	0%	24%	12%
Estatinas	0%	48%	34%

**Tabla MM\_01.** Características basales de los individuos incluidos en el estudio en los tres grupos experimentales. Los datos cuantitativos de las variables bioquímicas se expresan como medias de grupo junto con su desviación estándar. El tratamiento con estatinas se refieren a tratamientos recibidos por el paciente, previos al evento actual.

Se tomaron como criterios de exclusión las enfermedades inflamatorias o tumorales, las alteraciones de la coagulación, la existencia de cardiopatías significativas sin relación con la enfermedad coronaria o sus factores de riesgo (valvulopatías, afectaciones pericárdicas o miocardiopatías), exceptuando la hipertrofia secundaria del ventrículo izquierdo debida a hipertensión, tratamientos crónicos, excepto el de cardiopatía isquémica y sus factores de riesgo, angiogramas coronarios normales, fracciones de eyección menores de 0.45, así como haber sufrido traumatismos mayores, eventos tromboembólicos, revascularizaciones o haber sido sometido a cirugía en los seis meses previos al inicio del estudio. Dentro del grupo control se incluyeron 30 voluntarios sanos con arterias coronarias normales y hasta dos factores de riesgo cardiovascular que acudieron al Servicio de Hemodinámica por diversas razones clínicas. Todos los voluntarios sanos y los pacientes presentaban una distribución de sexo y edad sin diferencias significativas entre ellos. El estudio se ha llevado a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki y cuenta con la aprobación del comité ético del Hospital Virgen de la Salud. Todos los pacientes y controles firmaron un consentimiento informado antes de su inclusión en el estudio.



**Figura MM\_01.** Representación del proceso de obtención y tratamiento de las muestras. En los pacientes con SCA la obtención de la muestra se hizo en el momento de producirse el evento ( $t=0$ ). En el grupo control la extracción de las muestras se llevó a cabo cuando el paciente acudió a la consulta de Hemodinámica. En todos los casos el procesamiento de la muestra se realizó en un tiempo inferior a 2 horas.

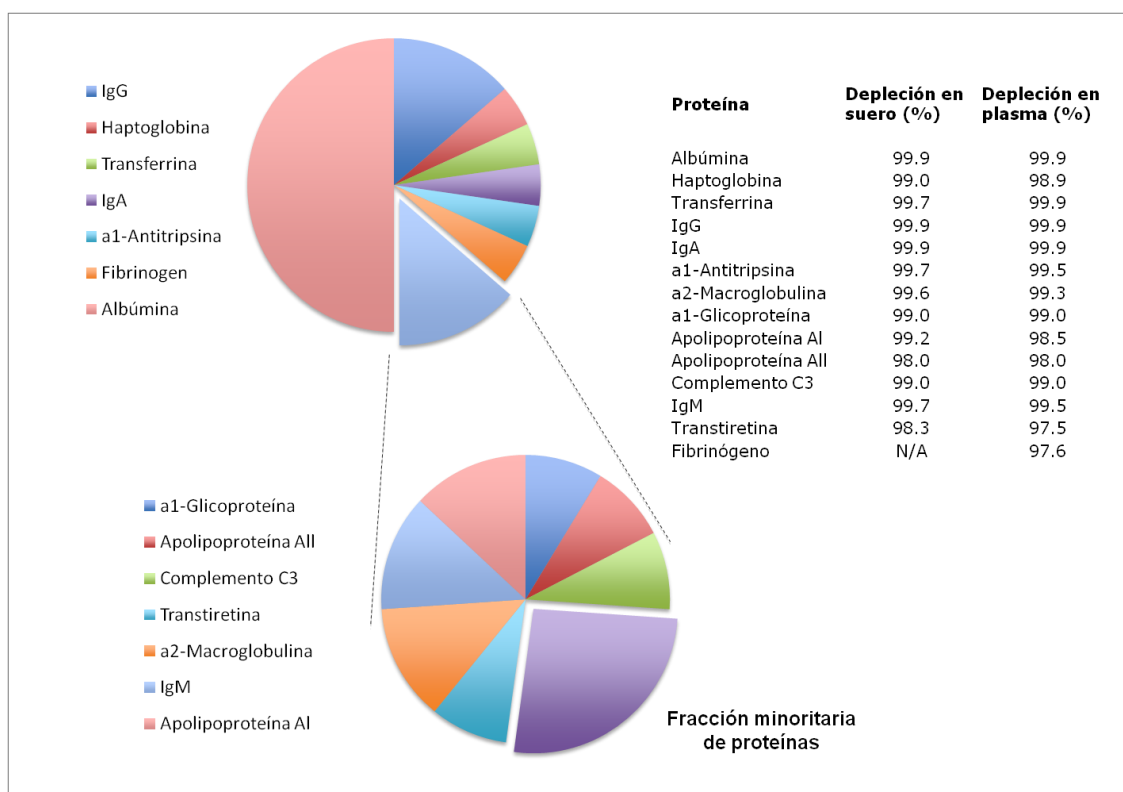
En todos los casos la recogida de muestra de los pacientes se realizó en un intervalo inferior a 12 horas tras producirse el evento coronario. Se recogieron 28 ml de sangre en tubos estériles de EDTA (BD Microtainer®) que fueron enviados inmediatamente al laboratorio de Fisiopatología Vascular del Hospital Nacional de Paraplégicos, SESCAM (Toledo) y procesados en un tiempo inferior a 2 h para evitar el deterioro de la muestra. Un tubo de 7 ml de cada una de las muestras se centrifugó a 1300xg (5810R, Eppendorf) durante 10 min a temperatura ambiente para obtener el plasma que se guardó en alícuotas de 500 µl a -80 °C hasta su estudio (Figura MM\_01).

## 1.2. Depleción de las proteínas mayoritarias del plasma

Para llevar a cabo la depleción de las proteínas mayoritarias del plasma, utilizamos el sistema *Multiple Affinity Removal System* (MARS, Agilent Technologies). Este sistema está basado en una columna de afinidad *Multiple Affinity Removal Column* (MARS Hu-14, 4,6mm x 50mm) capaz de retener entre un 97.5% y un 99% de las 14 proteínas más abundantes del plasma (Figura MM\_02) que constituyen el 94% del contenido proteico total, ya que contiene una serie de anticuerpos policlonales con especificidad para unirse a estas proteínas. Para realizar la depleción de proteínas mayoritarias se utilizaron además dos tampones comerciales (tampones A y B, Agilent Technologies). El tampón A, es un tampón fosfato de pH neutro indicado para realizar los pasos de carga de muestra, equilibrado y lavado de la columna, mientras que el tampón B, con urea y de pH ácido, está indicado para conseguir la elución de las proteínas mayoritarias retenidas.

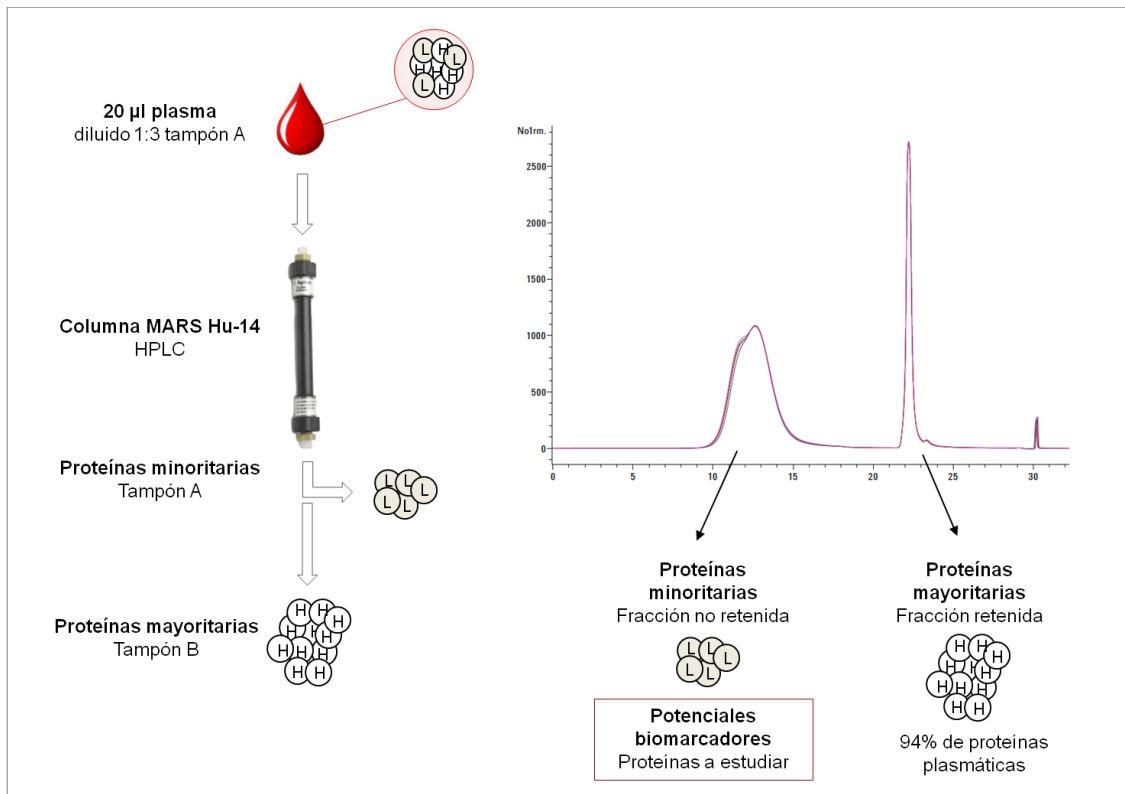
La depleción de las proteínas mayoritarias se llevó a cabo mediante cromatografía de alta eficacia (HPLC) con un cromatógrafo HPLC 1200 series (Agilent Technologies) dotado de un inyector manual (9725i, Agilent Technologies) y con un *loop* de 200 µl. Tanto la inyección de la muestra como los pasos cromatográficos seguidos se realizaron siguiendo las especificaciones de la casa comercial. Brevemente, 20 µl de plasma humano se diluyeron en una proporción 1:3 en tampón A (60 µl) y el plasma así diluido se inyectó en el sistema cromatográfico aplicando un flujo de 0,125 ml/min de tampón A durante los primeros 9.5 min. La fracción no retenida de proteínas, correspondiente a las proteínas minoritarias, eluyó entre los minutos 4.5 y 8. Esta fracción fue recogida y almacenada a -80°C hasta su estudio. Después del minuto 9.50 el flujo de fase móvil pasó a ser de 1 ml/min. En el minuto 11.50 se produjo un cambio de fase móvil hasta un

100% de tampón B manteniéndose el flujo de 1ml/min durante 4.5 min.



**Figura MM\_02.** La utilización de la columna MARS Hu-14 (Agilent Technologies) permite eliminar el 94% del contenido proteico total del plasma correspondiente a las 14 proteínas mayoritarias.

Este paso permitió la elución de la fracción retenida de proteínas, correspondiente a las catorce proteínas mayoritarias. Seguidamente, un nuevo cambio de fase móvil hasta un 100% de tampón A en el minuto 16 consiguió la regeneración de la columna, equilibrándola en un último paso cromatográfico de 9 min, completando un ciclo total de 25 min (Figura MM\_03). Tras cinco ciclos cromatográficos (equivalentes a 100 µl de plasma) las fracciones no retenidas de proteínas que fueron recogidas por separado se pasaron a tubos concentradores (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit 5KDa, Millipore), que fueron centrifugados a 2700xg (5810R, Eppendorf) durante 25 min. A continuación, se eliminaron los restos de tampón A, pasando las muestras concentradas a un tampón con bicarbonato amónico (AMBIC, 65 mM), para lo cual se realizaron 4 lavados en los mismos tubos concentradores. Cada uno de los ciclos de lavado consistió en añadir 4,5 ml de tampón AMBIC y repetir los pasos de centrifugación hasta dejar un volumen de 250-500 µl de muestra cada vez. Las muestras concentradas contenidas en el nuevo tampón bicarbonato se cuantificaron por el método de Bradford [174]. Una vez realizada la cuantificación, las muestras fueron dializadas durante 24 h en una tampón de EDTA 0,1 mM y posteriormente liofilizadas durante 15-18 h.



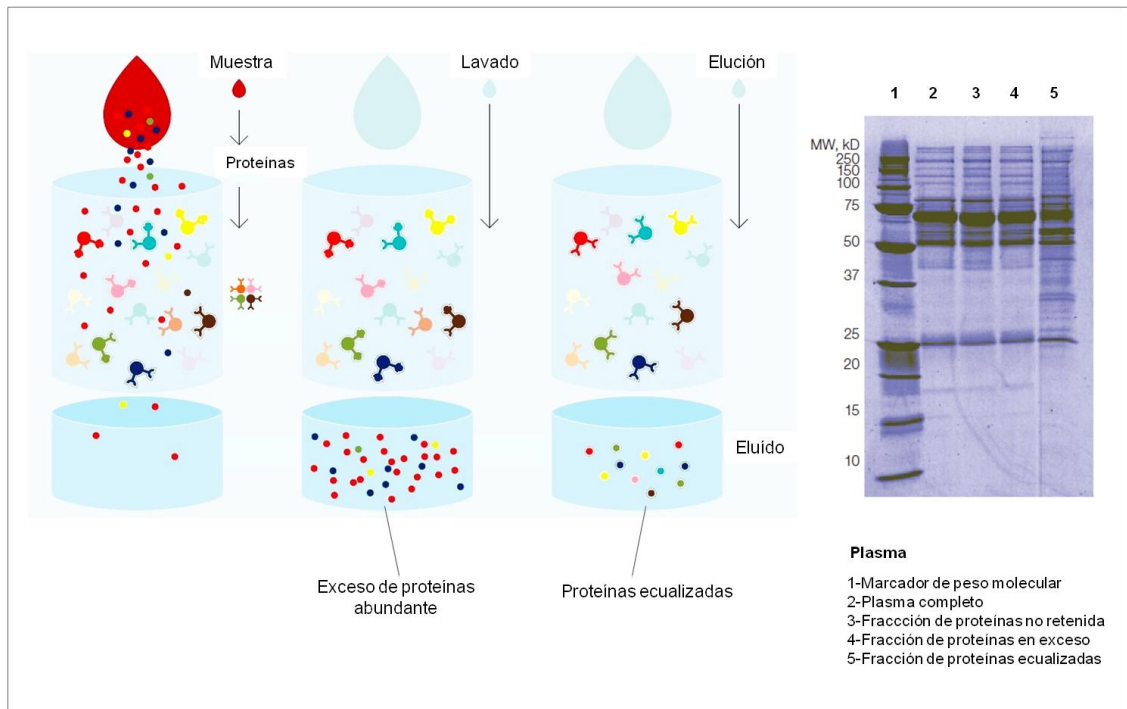
**Figura MM\_03.** Esquema representativo del proceso de depleción de proteínas mayoritarias del plasma utilizando una columna MARS Hu-14 (Agilent Technologies) en un sistema HPLC 1200 series (Agilent Technologies). 20 µl de muestra diluidos 1:3 con tampón A se inyectaron en la columna. La fracción de proteínas mayoritarias (H) interacciona con los anticuerpos de la columna quedando temporalmente retenidas mientras que las proteínas minoritarias (L) fueron eluidas.

### 1.3. Ecuación de las proteínas mayoritarias del plasma

La tecnología ProteoMiner (BioRad) permite la ecuación de las proteínas presentes en una muestra mediante su unión selectiva a hexapéptidos específicos, que actúan de ligandos para las proteínas de las muestras (Figura MM\_04). Esta tecnología permite por tanto reducir el rango dinámico de concentración en diversos tipos de muestras, como plasma y suero, disminuyendo la concentración de las proteínas más abundantes y enriquecerlas en proteínas menos abundantes, de cara a una identificación de estas últimas, como paso previo a un posterior análisis proteómico ya que estas proteínas menos abundantes son potencialmente de gran interés para el descubrimiento de nuevos biomarcadores de enfermedad.

La columna de ecuación se centrifugó en primer lugar durante 1 min a 1000xg para eliminar el líquido que contienen. Posteriormente se añadieron 200 µl de tampón de lavado, se rotaron 5 min y se centrifugaron durante 1 min a 1000xg. Se cargaron 200 µl de plasma de la muestra y se mantuvo rotando durante 2 h a temperatura ambiente para permitir la unión de las proteínas a sus hexapéptidos específicos. Para eliminar el

exceso de proteína se hicieron dos lavados consecutivos, el primero con tampón de lavado y el segundo con agua desionizada con 200 µl en cada caso. A continuación se llevó a cabo la elución de las proteínas enlazadas a los hexapéptidos añadiendo 20 µl de los reactivos de elución 1, 2, 3 y 4 a la columna. En cada caso la adición de reactivo se realizó por duplicado, con una suave agitación de 10 min y recogiendo el eluido tras 1 min de centrifugación a 1000xg. Finalmente todas las fracciones eluidas se recogieron en un mismo tubo eppendorf y fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.



**Figura MM\_04.** Esquema representativo del proceso de equalización de proteínas mayoritarias del plasma utilizando la tecnología ProteoMiner (BioRad). Mediante la unión selectiva de las proteínas a sus hexapéptidos específicos se consigue la disminución del rango dinámico de concentración permitiendo enriquecer la muestra de las proteínas menos abundantes.

## 1.4. Electroforesis bidimensional diferencial en gel (2D-DIGE)

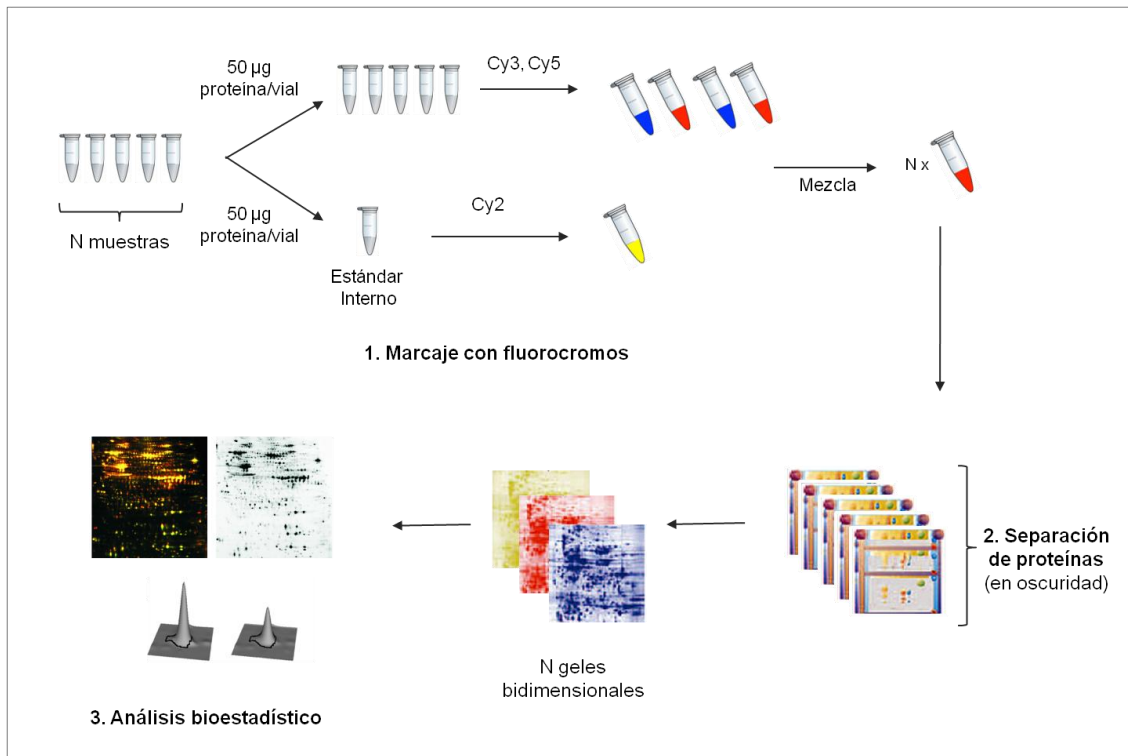
### 1.4.1. Marcaje de las muestras

Previo al marcaje, todas las muestras fueron procesadas con el kit comercial 2D Clean-up (GE Healthcare) para eliminar posibles impurezas que interfirieran en su análisis tales como detergentes, sales, lípidos y ácidos nucleicos. Para ello, a un máximo de 100 µg de proteína se le añadieron 300 µl de solución precipitante y se incubó en hielo durante 15 min. Posteriormente, se añadieron 300 µl de solución co-precipitante, se vorteseó la mezcla y se centrifugó a 21000xg (5810R, Eppendorf) durante 10 min. Tras la centrifugación se eliminó el máximo posible de sobrenadante intentando no tocar el *pellet* de proteínas visible y se repitió el procedimiento de centrifugación, esta vez con

un pulso breve, para eliminar la mayor cantidad posible de sobrenadante. A continuación se añadieron, nuevamente, 40  $\mu\text{l}$  de co-precipitante y se repitió el paso de centrifugación y de eliminación de sobrenadante. Por último, se añadieron sobre el *pellet* 20  $\mu\text{l}$  de agua miliQ, 1 ml de tampón de lavado (previamente almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  al menos durante 1 h) y 5  $\mu\text{l}$  de aditivo de lavado. Tras vortesear la mezcla se mantuvieron los viales a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1 h, tiempo durante el cual se vortesearon brevemente a intervalos de 15 min. Transcurrido ese tiempo se observó un precipitado blanco en el vial y se repitió el paso de centrifugación (14000xg, 10 min) eliminándose tanto sobrenadante como sea posible. El *pellet* de proteínas obtenido mediante este procedimiento fue resuspendido en 15  $\mu\text{l}$  de tampón mínimo de DIGE (urea 7 M, tiourea 2M, 4% p/v CHAPS y Tris 3 M) para obtener una concentración final de 8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Se comprobó posteriormente que el pH de cada muestra estaba comprendido entre 8.0 y 9.0 mediante varillas indicadoras de pH *Neutralit* (pH 5.0-10.0). Es necesario que las muestras se encuentren en este intervalo de pH para que la reacción de marcaje se produzca adecuadamente por lo que este paso resulta fundamental.

En el kit comercial del reactivo 2D-DIGE (GE Healthcare), los fluorocromos se suministran como polvo sólido por lo que deben ser previamente reconstituidos en dimetilformamida anhidra (Sigma-Aldrich), originando una solución madre de concentración 1 mM, que será posteriormente diluida con dimetilformamida anhidra hasta la concentración de la solución de trabajo (400 pmol/ $\mu\text{l}$ ). Tras resuspender las muestras que se incluyeron en el experimento se prepararon alícuotas de 50  $\mu\text{g}$  (10  $\mu\text{l}$ ) de cada muestra, a las que se añadieron 400 pmol (1  $\mu\text{l}$ ) del fluorocromo correspondiente (Cy3 o Cy5, según el diseño experimental).

Además se debe preparar un control interno que incluya todas las muestras del experimento, para lo cual se ponen en un único tubo 50  $\mu\text{g}$  de cada una de ellas y esta mezcla se marcó con Cy2 (añadiendo 400 pmol del fluorocromo por cada 50  $\mu\text{g}$  de muestra que se quieran marcar). Las muestras se incubaron en hielo durante 30 min en oscuridad, para permitir la reacción de marcaje, que se detuvo posteriormente añadiendo 1  $\mu\text{l}$  de lisina 10 mM por cada 50  $\mu\text{g}$  de muestra e incubando de nuevo en hielo durante 10 min y en oscuridad (Figura MM\_05).



**Figura MM\_05.** Resumen esquemático del protocolo de electroforesis bidimensional diferencial en gel (2D-DIGE).

#### 1.4.2. Isoelectroenfoque (IEF) de plasma

Las diferentes muestras de controles y pacientes, una vez marcadas con los fluorocromos correspondientes fueron combinadas según el diseño experimental previsto obteniéndose finalmente cinco viales con 150  $\mu\text{l}$  de proteína cada uno (50  $\mu\text{l}$  control + 50  $\mu\text{l}$  paciente + 50  $\mu\text{l}$  estándar interno). A cada muestra se añadieron 7  $\mu\text{l}$  de anfólitos (IPG Buffer pH 4-7, GE Healthcare) y 4,5  $\mu\text{l}$  de ditiotreitól (DTT, BioRad) como agente reductor. El volumen de tampón de rehidratación utilizado en cada caso depende del tamaño de la tira gradiente de pH inmovilizado (IPG, GE Healthcare) que se quiera utilizar. Así, para rehidratar tiras de 24 cm las muestras se resuspendieron en un volumen final de 450  $\mu\text{l}$ . Con esta mezcla se rehidrataron las correspondientes tiras IPG de intervalo de pH 4-7, durante la noche en una bandeja de rehidratación (Immobiline DryStrip Reswelling Tray, GE Healthcare). Tras la rehidratación pasiva, se eliminó el exceso de líquido dejando escurrir las tiras brevemente sobre un papel de filtro y a continuación se colocaron en una bandeja especial de cerámica (Ettan IPGphor ceramic strip holders, GE Healthcare) que, a su vez, se situó en una unidad "Ettan IPGphor 3" (GE Healthcare) donde se llevó a cabo el IEF a 20°C. El programa de IEF utilizado para las muestras de plasma para tiras de 24 cm fue el siguiente: 30 min a 500

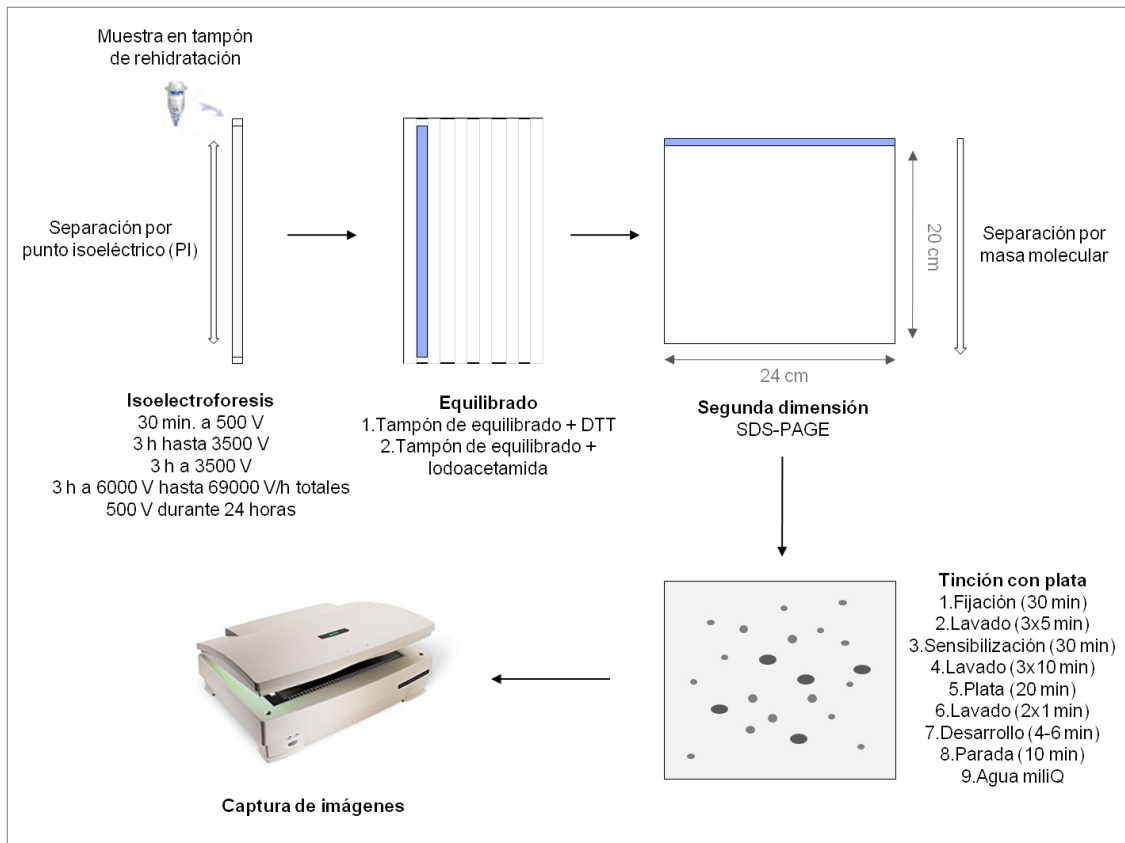
V, 3 h hasta 3500 V (en gradiente), 3 h a 3500 V, 3 h a 6000 V (en gradiente), hasta 69000 V/h totales y 500 V durante 24 horas. (Figura MM\_06).

#### **1.4.3. Equilibrado**

Una vez finalizado el IEF, las tiras IPG fueron equilibradas en un tampón de equilibrado (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, urea 6 M, 87% v/v glicerol, 2% p/v SDS y trazas de azul de bromofenol) [175] antes de llevar a cabo la separación de las proteínas mediante SDS-PAGE. Este proceso de equilibrado de las tiras se realizó en dos pasos. En el primero, se añadió al tampón de equilibrado previamente descrito un 1% p/v de DTT para mantener el estado reducido de las proteínas desnaturalizadas. Las tiras se mantuvieron en esta solución durante 20 min en agitación a temperatura ambiente y seguidamente se eliminó el tampón lavando las tiras con abundante agua miliQ. A continuación, se realizó el segundo paso en el que se añadió un 2,5% p/v de iodoacetamida (IAA, BioRad) al tampón de equilibrado para evitar una posible re-oxidación de las proteínas previamente reducidas en el paso anterior. De nuevo las tiras se mantuvieron en esta solución durante 20 min en agitación y se realizó un lavado final con agua miliQ. En este punto las tiras estaban listas para la segunda dimensión.

#### **1.4.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)**

La segunda dimensión se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Laemmli [117] con algunas modificaciones. Para aumentar la reproductibilidad se usó el sistema de electroforesis “Ettan DALTsix” (GE Healthcare) para la polimerización de los geles que permite polimerizar seis geles simultáneamente. Para llevar a cabo esta segunda dimensión se emplearon geles de 24 x 20 cm al 10% de acrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) para las muestras de plasma. Para ello, se empleó Tris-HCl 1.5 M pH 8,8, SDS 10% (p/v) y agua miliQ para obtener la concentración de acrilamida deseada en cada caso. Se añadieron también APS y TEMED (BioRad) como catalizadores de la reacción de polimerización. Una vez preparados los geles, cada tira IPG se colocó horizontalmente sobre el extremo superior del gel, evitando que quedaran burbujas atrapadas entre la tira y la superficie del gel. La electroforesis tuvo lugar a 25°C, aplicando en primer lugar 5 W/gel durante 20 min, seguido de 1 W/gel durante toda la noche en presencia de “*running buffer*” 1X (Tris 25mM, Glicina 0,2M, SDS 3 mM).



**Figura MM\_06.** Resumen de la electroforesis bidimensional convencional (2DE) utilizada en la preparación de geles destinados a la identificación de las proteínas.

Una vez que se completó la segunda dimensión los geles fueron digitalizados utilizando un escáner de fluorescencia (Typhoon 9400 Variable Mode Imager, GE Healthcare) que permite obtener las imágenes emitidas por cada fluorocromo por separado (aplicando las longitudes de onda de excitación y emisión específicas de cada fluorocromo) con una resolución de 100  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, las imágenes fueron tratadas con el programa “*DeCyder Differential Analysis Software*” (GE Healthcare), versión 7.0. Este análisis fue realizado en la Unidad de Proteómica del Hospital Nacional de Parapléjicos (Toledo).

#### 1.4.5. Tinción con plata

Para la identificación de las proteínas que se encontraron diferencialmente expresadas en el experimento 2D-DIGE, se prepararon geles bidimensionales que fueron teñidos con plata. Para ello, una vez finalizada la segunda dimensión, se utilizó el *kit* comercial *Silver Staining Protein* (GE Healthcare) basado en el método de Heukeshoven y Dernick [176] para la tinción de los geles. Durante cada etapa del protocolo de tinción los geles permanecieron sumergidos en 250 ml/gel de la correspondiente solución, en recipientes de tamaño adecuado, que se mantuvieron en agitación a lo largo de todo el

proceso sobre un agitador orbital.

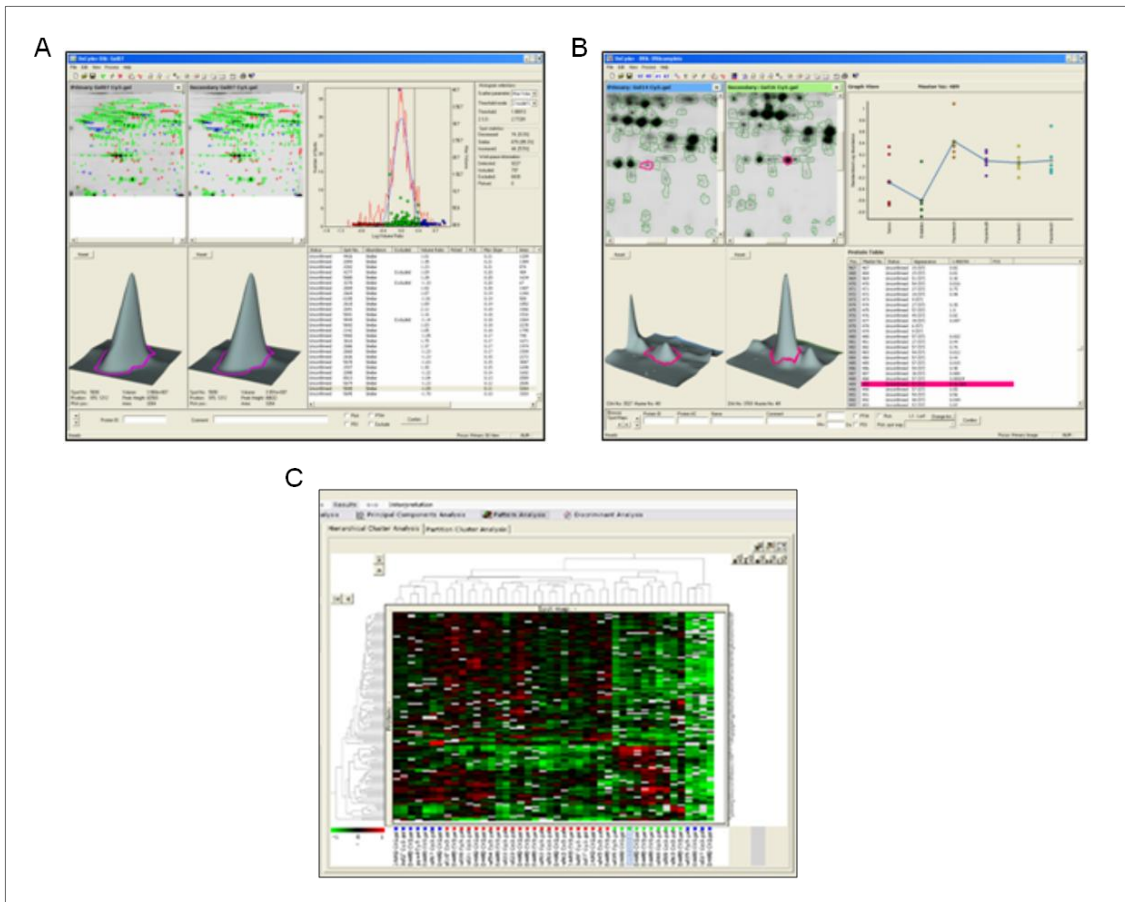
Al finalizar la electroforesis, los geles se sumergieron en solución de fijación (30% v/v etanol y 10% v/v ácido acético) durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con agua miliQ antes de aplicar la solución de sensibilización (30% v/v Etanol, 5% p/v tiosulfato sódico y 6.8% p/v acetato sódico) durante 30 min, tras lo cual se volvieron a realizar otros 3 lavados con agua miliQ de 10 min cada uno. Seguidamente, los geles se incubaron 20 min con una solución de nitrato de plata 2.5% p/v en agitación y finalmente, tras dos lavados de 1 min con agua miliQ, se incubaron los geles con una solución de desarrollo que contenía 2.5% (p/v) carbonato sódico y 37% (p/v) formaldehído, el cual fue añadido justo antes de usar. Con este último paso se consiguió el revelado de las manchas proteicas. Idealmente este paso de la tinción debe durar entre 4 y 6 min pero en función de la concentración de proteína utilizada el tiempo necesario puede variar. Una vez finalizado el revelado, este se detuvo incubando los geles durante 10 min con solución de parada (1.46% p/v EDTA- Na<sub>2</sub>). Tras este período de tiempo los geles se conservaron en agua miliQ hasta la digitalización de las imágenes.

Las imágenes de los geles fueron digitalizadas utilizando un densitómetro (*GS-800™ Calibrated Densitometer*, BioRad) y el programa MagicScan 5.1. Tras la digitalización, todos los geles empleados se almacenaron en bolsas de plástico con agua miliQ a 4 °C.

### **1.5. Análisis de imágenes**

En primer lugar, utilizando el módulo de análisis diferencial en gel (DIA, *Differential In-gel Analysis*) se detectaron y cuantificaron las manchas proteicas de las tres imágenes (Cy2, Cy3, Cy5) correspondientes a cada gel. Para ello, el programa utiliza un algoritmo para la detección de las manchas basado en la co-detección de las tres señales fluorescentes (2 muestras y 1 control interno) lo que permite diferenciar las señales de manchas verdaderas de los artefactos del gel. Por su parte, la cuantificación se basa en el cálculo de las relaciones entre las señales fluorescentes Cy3/Cy2 y Cy5/Cy2, lo que permite tener un valor de intensidad de fluorescencia normalizado para cada mancha. Una vez completada esta fase, los datos generados mediante el módulo DIA fueron importados al módulo de análisis de variación biológica (BVA, *Biological Variation Analysis*), que permitió el emparejamiento de las manchas detectadas entre las imágenes de los diferentes geles del experimento para obtener después datos estadísticos sobre los

niveles de expresión de las manchas en los diferentes grupos de estudio. En este análisis se consideró que existía variación cuando los niveles de expresión estaban alterados en  $\pm 50\%$  y dicha variación se consideró estadísticamente significativa cuando se encontraba dentro del intervalo de confianza del 95% ( $p < 0.05$ ) determinado por la prueba *t-Student*. Por último, los datos contenidos en los archivos generados por el módulo BVA se analizaron en el módulo de análisis de expresión diferencial (EDA *Extended Data Analysis*) que con el cual se realizó el análisis de componentes principales (ACP).



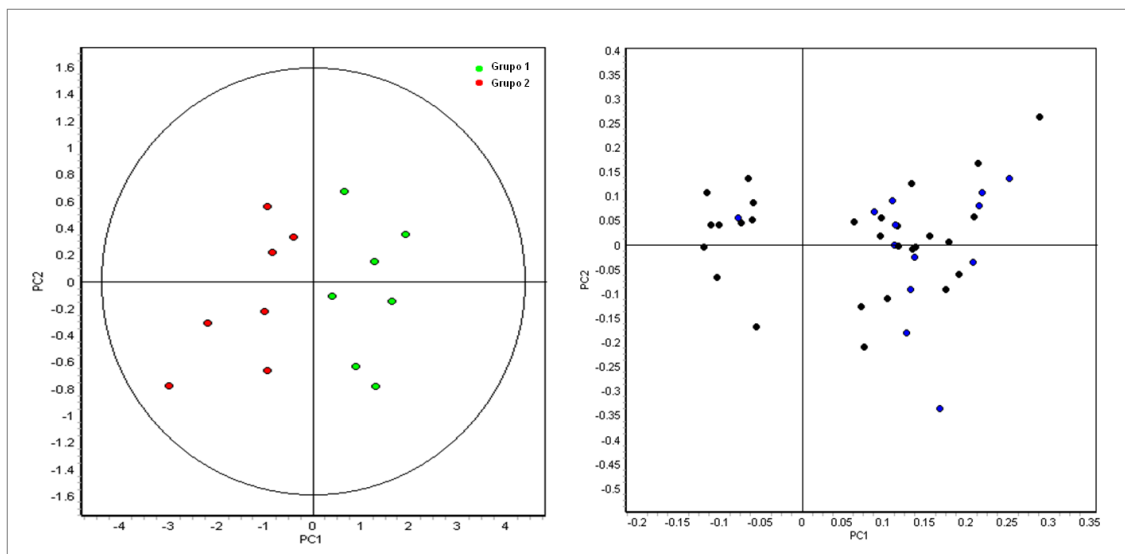
**Figura MM\_07.** Representación del proceso de análisis mediante el programa DeCyder Differential Analysis Software v. 7.0 (GE Healthcare). **(A)** Detección de manchas en el módulo DIA. **(B)** Emparejamiento de las manchas en el módulo BVA. **(C)** Ejemplo de análisis jerárquico en el módulo EDA.

### 1.5.1. Análisis de Componentes Principales (ACP)

El análisis de componentes principales (ACP) es un método estadístico cuyo objetivo es la simplificación y reducción de la dimensionalidad de un conjunto de datos con numerosas variables, de tal manera que los datos transformados mantengan las características básicas de los datos iniciales sólo con una pequeña pérdida de información [177]. Por tanto, se trata de encontrar una serie de componentes capaces de explicar la mayor parte de la varianza total de las variables originales. De esta forma se obtiene una imagen simplificada del conjunto de datos inicial, que sigue describiéndolos en su mayor parte, pero que resulta mucho más sencilla a la hora de interpretarlos.

Para realizar el ACP partimos de una matriz de datos ( $X$ ) con  $N$  filas (observaciones) y  $K$  columnas (variables). Esta matriz se representa en un espacio con tantas dimensiones como variables ( $K$  dimensiones), en donde cada variable representaría un eje de coordenadas. Cada observación se representaría como un punto en ese espacio multidimensional, formando una nube de puntos. Sobre este espacio, el ACP define nuevas variables que recogen la mayor parte de la información (que identificamos con la varianza) contenida en las variables originales. Cada nueva variable sería un nuevo eje de coordenadas en el cual el valor de cada observación sería la proyección del punto sobre dicho eje [178]. El ACP buscará los ejes más adecuados, que serán aquellos sobre los que se proyecte una mayor cantidad de varianza. Estos ejes (que llamaremos componentes principales) serán una combinación lineal de las variables originales y deben ser independientes entre sí. El valor de la proyección de cada observación en el nuevo eje de coordenadas se conoce como “puntuación” (score). Normalmente, un único componente principal es insuficiente para representar un conjunto grande de datos, por lo que suelen calcularse dos o más. El primero de ellos es el que recogerá la mayor parte de la información (varianza), el segundo recogerá la segunda mayor parte y así sucesivamente. La representación de las proyecciones de las observaciones en los nuevos ejes de coordenadas (componentes principales) se conoce como “gráfico de puntuación” (*score plot*). Pero el ACP no sólo nos aporta información sobre las observaciones, sino también sobre las variables. Los “valores de contribución” (*loadings*) proporcionan una perspectiva de la influencia de las variables originales en los componentes principales. Estos valores se representan en el “gráfico de contribución” (*loading plot*), que nos indica qué variables están correlacionadas, cuáles son influyentes y cuáles son responsables de los patrones detectados en las

observaciones (Figura MM\_08). De este modo, cuando la correlación es directa, las variables se agrupan en la misma región del “gráfico de contribución” y cuando están inversamente correlacionadas se sitúan en cuadrantes opuestos. La distancia con el origen del gráfico también influye (cuanto más alejada respecto del origen, más impacto tiene la variable sobre el modelo). Es necesario tener en cuenta que este tipo de análisis es extremadamente sensible a la presencia de “valores extremos o atípicos” (conocidos como “valores fuera de control” o “*outliers*”), observaciones extremas que no encajan en el modelo de componentes principales calculado. Se trata de casos complicados, ya que pueden alterar los resultados del ACP, pero también pueden ser muy interesantes si lo que se está buscando son datos marcadamente diferentes. Los valores extremos o atípicos son fáciles de detectar, ya que el “gráfico de puntuación” muestra una elipse que representa un intervalo de confianza del 95% para las observaciones que se ajustan a la normalidad multivariante. Podemos aceptar que las observaciones que aparecen fuera de la elipse no se ajustan a la distribución normal y serán consideradas “valores extremos o atípicos”.



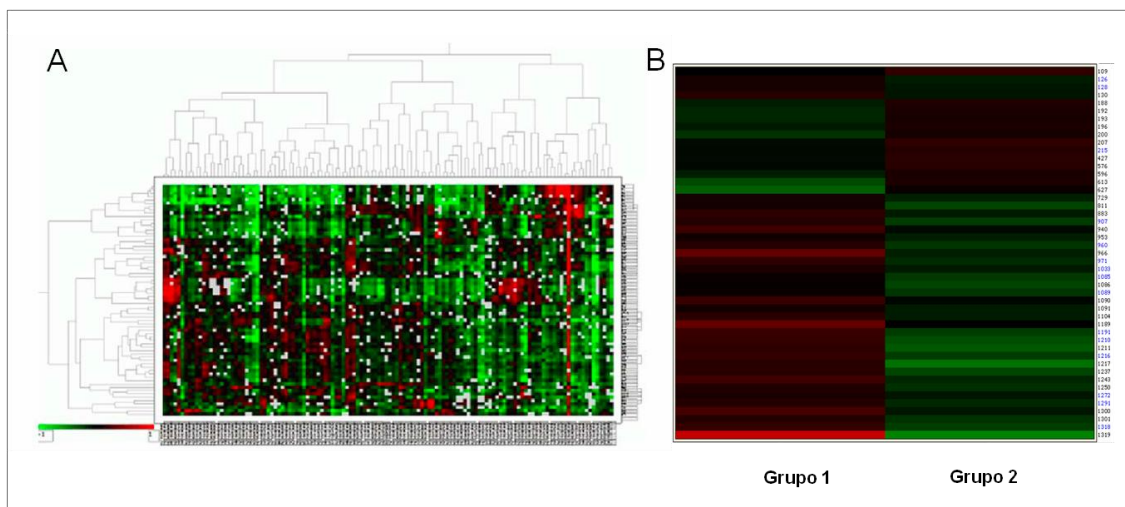
**Figura MM\_08.** Ejemplo de los resultados obtenidos en un ACP calculados tomando como variables las manchas proteicas. En el “gráfico de puntuación” (*score plot*, a la izquierda) se muestran los individuos y en el “gráfico de contribución” (*loadingplot*, a la derecha) aparecen representadas las manchas proteicas.

### 1.5.2. Análisis de Patrones

El análisis de patrones (análisis de grupos o análisis de “cluster”) es una clasificación no supervisada que se basa en varias técnicas estadísticas multivariantes [178-180]. Se dice que un método de clasificación es “no supervisado” cuando se desconoce el número de clases en que es razonable dividir las observaciones, así como a que clase pertenece

cada observación. Su finalidad, por tanto, es dividir un conjunto de observaciones o datos en grupos, de forma que los perfiles de los objetos en un mismo grupo sean muy similares entre sí y distintos de los perfiles de los objetos de grupos diferentes. Se trata pues de un proceso para agrupar objetos similares, para lo cual es necesario definir la similitud. Existen varios métodos matemáticos para estimar la similitud, dos de los cuales se incluyen en el análisis de patrones con el módulo EDA de DeCyder: la distancia Euclídea, que da más importancia a las medidas (en valores absolutos) de las variables y el coeficiente de Pearson, en el que tiene más valor la tendencia que las medidas de las variables.

- **Análisis de grupos jerárquico:** Se denomina método jerárquico porque crea una jerarquía entre las clases que se construyen a partir de las observaciones. De este modo, dado un conjunto de datos inicial donde cada elemento es una clase, se genera un árbol jerárquico (o dendrograma) agrupando en cada etapa las dos clases ubicadas a mínima distancia.

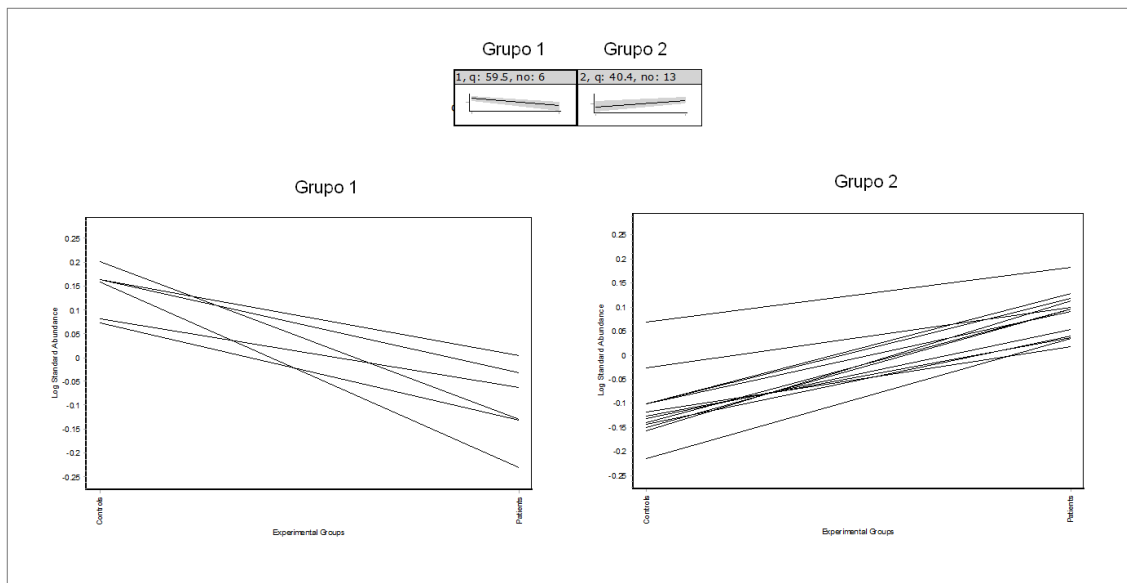


**Figura MM\_09.** Ejemplos de análisis de grupos jerárquico. (A) Las manchas proteicas (eje horizontal) se representan frente a las muestras (eje vertical). (B) Las manchas proteicas (eje horizontal) se representan frente a los grupos experimentales (eje vertical).

El programa nos permite realizar simultáneamente la ordenación jerárquica de las muestras y de las manchas proteicas, de modo que obtenemos los resultados en forma de dos dendrogramas que delimitan un espacio bidimensional en el que se representa un diagrama de calor. Se trata de un sistema de coordenadas que representa las muestras o los grupos experimentales en el eje vertical y las manchas proteicas en el eje horizontal, de modo que cada coordenada del diagrama muestra mediante una escala de colores el nivel de expresión de una mancha proteica en una muestra o grupo experimental

concreto. La escala de colores que va del verde (expresión disminuida) al negro (sin cambios de expresión) y al rojo (expresión aumentada), se representa en la esquina inferior izquierda de cada diagrama (el color gris aparece cuando una mancha está ausente en una muestra).

- **Análisis de grupos de k-medias:** Es una herramienta diseñada para asignar los objetos a un número predeterminado de grupos (*clusters* o categorías), “K”, cuyas características no se conocen aún pero que se basan en un conjunto de variables especificadas, de modo que cada objeto pertenezca a una única categoría (Figura MM\_10). El número predeterminado de grupos o categorías “K” puede ser un valor que le indiquemos al programa (si tenemos alguna noción del número de categorías en que deberían agruparse datos), aunque DeCyder tiene una opción que le permite estimar el número óptimo de grupos a calcular. El objetivo de este algoritmo es poner cada objeto en una categoría dependiendo de la similitud, que para este tipo de análisis en DeCyder siempre se mide mediante la distancia Euclídea. La calidad de los grupos encontrados se estima mediante el valor “q”, que varía del 1 al 100 (siendo 100 la mejor puntuación posible).



**Figura MM\_10.** Ejemplo de la representación de los resultados obtenidos tras la clasificación de los datos mediante el algoritmo de k-medias o los mapas autoorganizativos con el módulo EDA del programa DeCyder.

## **1.6. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas**

El análisis por espectrometría de masas de los digeridos enzimáticos de las manchas proteicas se llevó a cabo en la Unidad de Proteómica del Hospital Nacional de Parapléjicos, SESCAM (Toledo).

### **1.6.1. Identificación de proteínas mediante MALDI-TOF/TOF.**

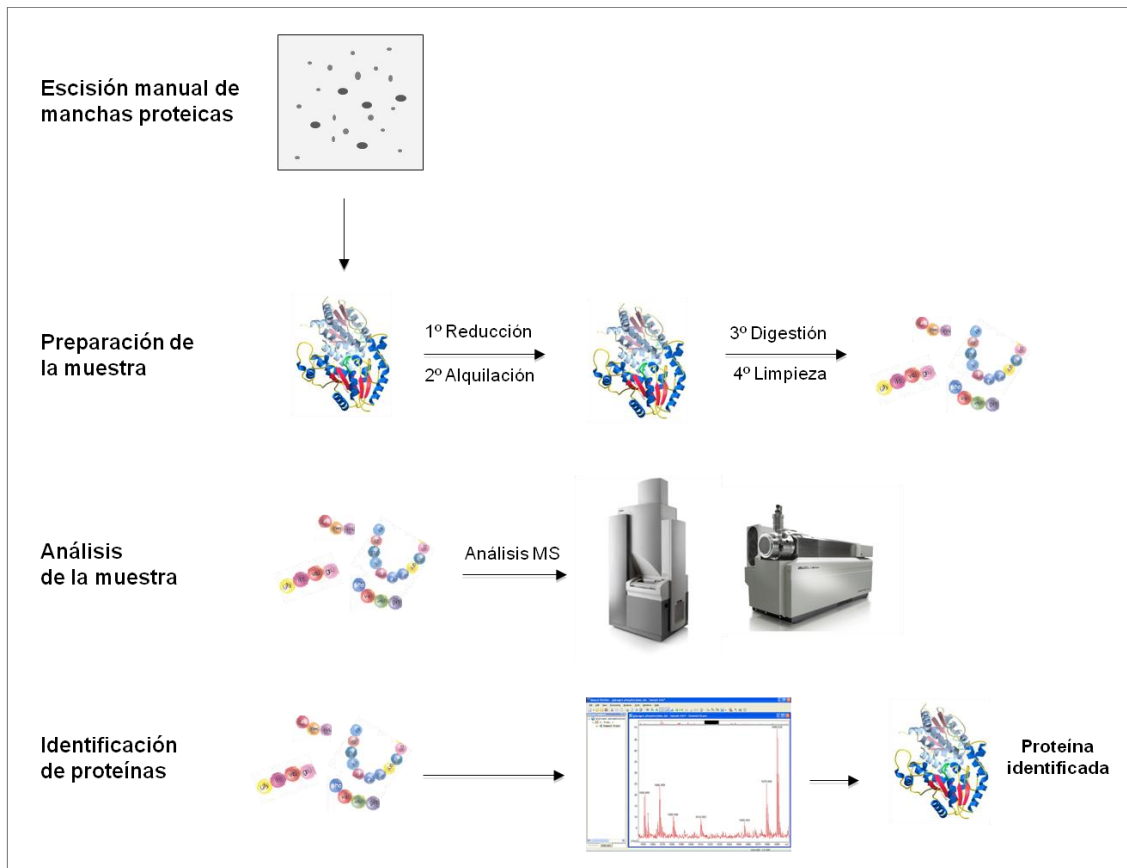
#### **1.6.1.1. Digestión de proteínas en gel y preparación de la muestra**

Las manchas proteicas de los geles 2-DE empleados para la identificación de las proteínas diferencialmente expresadas obtenidas mediante 2D-DIGE, se cortaron manualmente y se digirieron automáticamente utilizando un digester *Ettan Digester* (GE Healthcare). El protocolo de digestión utilizado fue el desarrollado por Schevchenko y col. [181] con ligeras modificaciones: los fragmentos de gel se redujeron con DTT 10 mM (Sigma Aldrich) en bicarbonato de amonio 50 mM (99% de pureza; Scharlau) y se alquilaron con IAA 55 mM (Sigma Aldrich) en bicarbonato de amonio 50 mM. Los fragmentos de gel fueron posteriormente lavados con bicarbonato de amonio 50 mM en metanol al 50% (grado HPLC, Scharlau) y acetonitrilo al 70% (grado HPLC, Scharlau) y secados a vacío en un *Speedvac Savant DNA120* (Thermo Fisher). A continuación, se agregó tripsina de cerdo modificada (grado de secuenciación; Promega, Madison, WI, Estados Unidos) a una concentración final de 20 ng/μl en bicarbonato de amonio 20 mM a las piezas de gel seco y la digestión se llevó a cabo a 37°C durante la noche. Por último, se añadieron acetonitrilo acuoso al 60% y ácido trifluoroacético (TFA) acuoso al 0.5% (99,5% de pureza; Sigma Aldrich) para realizar la extracción peptídica.

#### **1.6.1.2. Análisis mediante MALDI-MS (/MS) y búsqueda en la base de datos**

Una vez finalizada la digestión, una alícuota de 0,5 μL de cada solución de digestión fue depositada mediante el método de capa fina en una placa MALDI 384 Opti-TOF 123x81 mm (AB Sciex) y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió el mismo volumen de matriz, ácido α-ciano-4-hidroxycinnámico (Sigma Aldrich) en acetonitrilo acuoso al 60% y TFA acuoso al 0,5%, en todas las muestras en la placa MALDI. Los espectros de MS y MS/MS se obtuvieron en modo automático utilizando un espectrómetro de masas 4800 Plus MALDI-TOF/TOF (AB Sciex). Los espectros fueron adquiridos en el modo de iones positivos con un láser Nd:YAG de 355 nm de longitud de onda y a una frecuencia de 200 Hz obteniéndose entre 1000 a 2000

espectros individuales por término medio para cada proteína. Para el análisis de fragmentos de iones en TOF/TOF, los precursores fueron acelerados a 8 kV en la fuente 1, y seleccionados en la puerta de entrada de iones. Los iones fragmento generados por la colisión de los precursores con el aire de la cámara de colisión (CID) fueron acelerados a 15 kV en la fuente 2 y sus masas fueron analizadas después de pasar por el reflector de iones. El análisis automatizado de los datos de masas se realizó mediante el programa informático “4000 Series Explorer” versión 3.5.3 (AB Sciex). La calibración interna del espectrómetro de masas MALDI-TOF se realizó con dos iones de autólisis de tripsina  $m/z = 842.510$  y  $m/z = 2211.105$ . Para MALDI-TOF/TOF, las calibraciones se realizaron con espectros de iones fragmento obtenidos de “Glub-fibrinopéptido” (4700 Cal Mix, AB Sciex). Los datos procedentes del análisis MALDI-MS y MALDI-MS/MS se combinaron mediante el programa “GPS Explorer” versión 3.6 que permite la realización de búsquedas no redundantes en la base de datos de proteínas *Swissprot* 56.2 utilizando el programa MASCOT 2.2 (MatrixScience) [182], con una tolerancia de 50 ppm en el precursor, tolerancia de 0,6 Da para el fragmento y permitiendo la pérdida de un lugar de corte. Los espectros MALDI-MS(/MS) y los resultados de la búsqueda en la base de datos se analizaron en detalle utilizando el programa anterior. Para datos combinados de MS y MS/MS, las identificaciones fueron aceptadas cuando el intervalo de confianza (I.C.%) del programa “*GPS Explorer*” fue del 95% o superior. Ya que las probabilidades de las proteínas y los iones obtenidos mediante motores de búsqueda diferentes no pueden ser comparadas directamente, se utilizó el programa “*GPS Explorer*” para calcular este I.C.% a fin de combinar los resultados de búsquedas de bases de datos de MS y MS/MS. El valor de este coeficiente significa que la probabilidad de que la coincidencia observada en un evento aleatorio es inferior al 5%. Para espectros PMF, las identificaciones también fueron aceptadas cuando los I.C.% fueron 99% o superiores.



**Figura MM\_11.** Resumen esquemático del protocolo de identificación de proteínas seguido por la Unidad de Proteómica del Hospital Nacional de Parapléjicos.

## 1.6.2. Identificación de proteínas mediante SRM

### 1.6.2.1. Digestión de proteínas en gel y preparación de la muestra

Las manchas proteicas se redujeron incubándolas con DTT 100 mM (Sigma Aldrich) en bicarbonato de amonio 50 mM (99% de pureza; Scharlau) durante 30 min a 37°C. Después de la reducción, se llevó a cabo la alquilación de las proteínas con IAA 0.55 M (Sigma Aldrich) en bicarbonato de amonio 50 mM durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó bicarbonato de amonio 50 mM, acetonitrilo acuoso al 15% (grado LC-MS, Scharlau) y por último tripsina porcina (Promega) a una relación final de 1µg de tripsina:proteína 50µg. La digestión se mantuvo a 37°C durante la noche, tras lo cual se añadió ácido fórmico al 2% (99,5% de pureza; Sigma Aldrich) y las muestras se limpiaron empleando columnas *Pep-Clean* (Pierce), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los digeridos trípticos fueron secados en vacío en un *Speed-vac Savant DNA120* (Thermo Fisher) y resuspendidas en acetonitrilo al 2% y ácido fórmico al 2% previo a su análisis mediante MS.

### 1.6.2.2. Análisis mediante Monitorización de Reacción Seleccionada (SRM)

El sistema LC-MS/MS consiste en un sistema TEMPO nano LC (AB Sciex) en combinación con un muestreador automático nano LC. Se realizaron dos inyecciones repetidas de 4.5 µl para cada muestra usando una fase móvil (2% de agua, ACN/98%, 0,1% FA) con un caudal de 10µl/min durante 5 min. Los péptidos se cargaron en un cartucho de micro-precolumna (AcclaimPepMap 100 C18, 5 µm, 100Å; 300 µm x 5mm) para conseguir la preconcentración y desalinización de la muestra. La columna cromatográfica empleada fue una C18 (Onyx 150x0.1mm monolítico, Phenomenex) utilizando una fase móvil A (98% de H<sub>2</sub>O/2% de ACN, 0,1% FA) y una fase móvil B (98% ACN/2% de H<sub>2</sub>O, 0,1% FA). Los péptidos se eluyeron a un caudal de 300 nl/min con el siguiente programa de gradientes; las condiciones iniciales del 5% de fase móvil B, aumentó a 40% de B durante 40 min, de 40% a 95% de B durante 1 min y 95% de B durante 4 min, volviendo a las condiciones iniciales (5% B) en 2 min y su mantenimiento durante 14 min más.

El análisis LC-MS/MS se realizó en un sistema AB/MDS Sciex 4000 QTRAP con la fuente Q Nano SprayII (AB Sciex). El TEMPO nano LC y el 4000 QTRAP fueron controlados por el programa *Analyst* v.1.5.1.

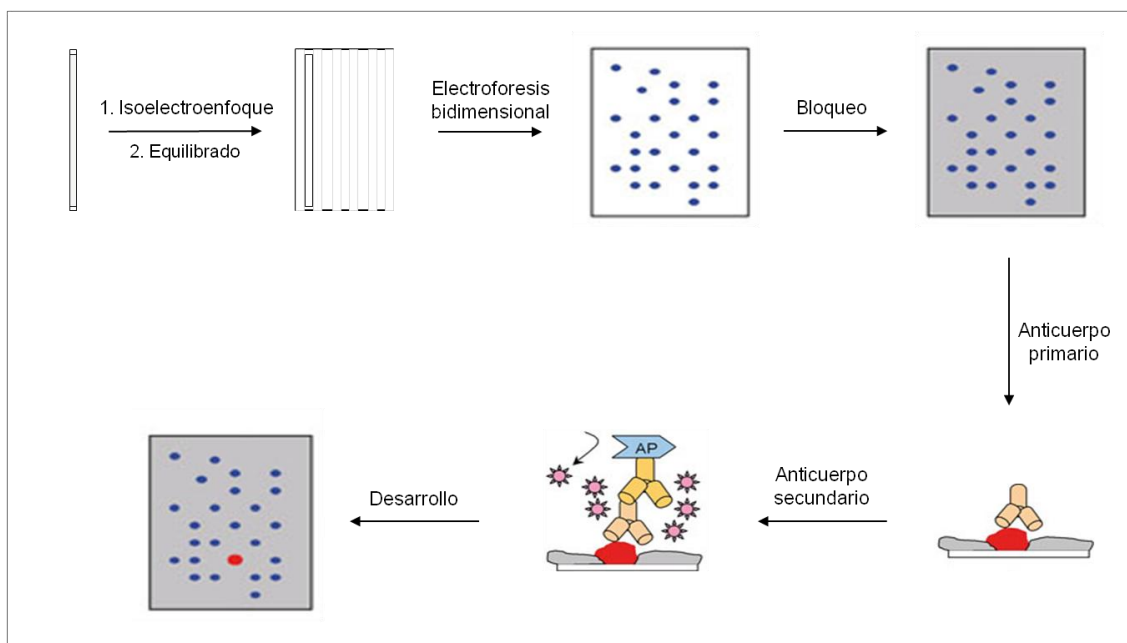
Todos los datos de MS y MS/MS se obtuvieron en modo de iones positivos. Se empleó un voltaje de *spray* de iones de 2800V y un *declustering* de 80V. El interfaz de nano flujo se calentó a 150°C y la fuente de gas y gas cortina se estableció en 20 psi, empleándose nitrógeno en ambos casos. Se programó un método de adquisición dependiente de información (IDA) con un análisis completo del MS (EMS), realizado en 4000 uma/s para el perfil de iones, seguido de un experimento de resolución de MS mejorado (ER) a 250 uma/s. El experimento ER permitió el reconocimiento del estado de carga más utilizado por los criterios de la IDA para seleccionar iones precursores y para estimar la energía de colisión de fragmentos de ellos. El programa de análisis utilizado creó archivos que incluían todos los datos de los espectros. Estos archivos fueron procesados por el programa ProteinPilot TM 2.0.1 (Applied Biosystems/MDS Sciex) el cual generó automáticamente listas de picos que se buscaron en la base de datos *Swissprot* versión 2010\_08 utilizando el programa MASCOT versión 2.2.

## 1.7. Validación de resultados

### 1.7.1. Inmunodetección o Western-Blot

Para la validación de algunas de las proteínas encontradas diferencialmente expresadas en el análisis 2D-DIGE, se emplearon grupos independientes de muestras de controles sanos y pacientes con SCASEST o pacientes con SCACEST, según cual fuese el grupo de proteínas a validar. Previamente a realizar la inmunodetección, todas las muestras fueron cuantificadas mediante el método de Bradford [174]. Para el caso de las inmunodetecciones unidimensionales, 20 µg de proteínas de cada una de las muestras se mezclaron con tampón de carga (SDS al 10%, glicerol al 87%, 2-mercaptoetanol al 5%, azul de bromofenol al 0,002% y Tris-HCl 0,5 M pH 6.8) y se calentaron a 95°C durante 5 min antes de aplicarlas en los pocillos del gel.

A continuación, se realizó la electroforesis SDS-PAGE utilizando diferentes porcentajes de acrilamida/bisacrilamida (entre el 8 y el 15% de acrilamida), en función de la masa molecular esperada de la proteína a analizar. La electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes se realizó según el protocolo descrito por Laemmli [117], en minigeles SDS-PAGE de 9x7 cm, usando el sistema de electroforesis “mini-PROTEAN3” y/o “mini-PROTEAN-Tetra” (BioRad). Las electroforesis se llevaron a cabo aplicando un voltaje inicial de 80V durante 5-10 min, seguido de un amperaje constante de 25 mA/gel durante 40 min.



**Figura MM\_12.** Esquema de la técnica de inmunodetección bidimensional utilizada para la validación de algunas proteínas que se encontraron diferencialmente expresadas en los experimentos 2D-DIGE.

En el caso de las inmunodetecciones bidimensionales (Figura MM\_12), las electroforesis se efectuaron empleando en este caso tiras IPG de 7 cm de intervalo de pH 4-7. Las electroforesis se llevan a cabo empleando el sistema “mini-PROTEAN3” y/o “mini-PROTEAN-Tetra” (BioRad), en las mismas condiciones descritas en el apartado 1.4. Una vez finalizada la electroforesis, se llevó a cabo la inmovilización de proteínas sobre membranas de nitrocelulosa (BioRad) mediante transferencia semiseca (BioRad) durante 30 min a 20 V, utilizando tampón de transferencia (Tris 25mM, glicina 151.8 mM y metanol al 20% v/v). A continuación, las membranas de nitrocelulosa se tiñeron sumergiéndolas en una solución de Rojo Ponceau S (Sigma) al 0.2% en ácido tricloroacético 30% (p/v) y ácido sulfosalicílico al 30% (p/v) durante 5 min, tras lo cual se lavan con agua destilada para eliminar el exceso de colorante y se tomó una imagen digitalizada de cada membrana con el densitómetro (GS-800 Calibrated Densitometer, BioRad). Para comprobar el rendimiento de la transferencia los geles se tiñeron con azul de Coomassie. Una vez inmovilizadas las proteínas en las membranas de nitrocelulosa, estos se bloquean en una solución de leche en polvo desnatada 7.5% (p/v) en PBS/Tween20 0.1% durante toda la noche a 4°C. Tras el bloqueo, todos los pasos posteriores se realizan a temperatura ambiente y en agitación. Las membranas se lavaron tres veces durante 10 min con tampón de lavado PBS/Tween20 0.1% (v/v). A continuación las membranas se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo primario específico para la proteína que queremos detectar, diluido a la proporción deseada en PBS/Tween20 0.1% (v/v). Tras realizar otros tres lavados de 10 min en el tampón de lavado, las membranas se incubaron durante 45 min a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con la enzima peroxidasa, diluido nuevamente en PBS/Tween20 0.1% (v/v) a la concentración adecuada. Finalmente, se repitieron los tres lavados de 10 min y se reveló utilizando el método quimioluminiscente basado en la oxidación del luminol por acción del peróxido de hidrógeno, catalizado por la peroxidasa de rábano (ECL Western blotting Detection Reagents, GE Healthcare). Las imágenes obtenidas se digitalizan nuevamente (GS-800 Calibrated Densitometer, BioRad) y se densitometraron utilizando el programa Quantity One (BioRad) para cuantificar el nivel de expresión de las proteínas (unidades arbitrarias de densitometría). El estudio estadístico de los datos obtenidos se realizó aplicando el test *t-Student*, considerándose estadísticamente significativas las diferencias con un valor  $p < 0.05$ .

Proteína	Anticuerpo primario casa comercial	Dilución	Tiempo de incubación	Anticuerpo secundario casa comercial	Dilución	Tiempo de incubación
Fibrinógeno gamma	Abcam	1:20000	1 hora	-	-	-
Hemopexina (SCASEST)	Abcam	1:2000	1 hora	True blood conejo eBioscience	1:1000	45 minutos
Apolipoproteína E	Abcam	1:500	1 hora	IgG antigoat donkey HRP Abcam	1:2000	45 minutos
Antitrombina III (SCASEST)	Abcam	1:2000	1 hora	True blood ratón eBioscience	1:1000	45 minutos
Alfa-1-antiquimiotripsina	Abcam	1:2000	1 hora	True blood ratón eBioscience	1:1000	45 minutos
Apolipoproteína AI	Policlonal	1:50000	1 hora	True blood conejo eBioscience	1:1000	45 minutos
Complemento C4	Abcam	1:50	1 hora	True blood conejo eBioscience	1:10000	45 minutos
Factor XIII de coagulación	Abcam	1:1000	1 hora	True blood conejo eBioscience	1:10000	45 minutos
Clusterina	Abcam	1:1000	1 hora	True blood ratón eBioscience	1:1000	45 minutos
Antitrombina III (SCACEST)	Abcam	1:2000	1 hora	True blood ratón eBioscience	1:1000	45 minutos
Hemopexina (SCACEST)	Abcam	1:200	1 hora	True blood conejo eBioscience	1:10000	45 minutos
Kallistatina	Abcam	1:2000	1 hora	True blood conejo eBioscience	1:10000	45 minutos

**Tabla MM\_02.** Lista de proteínas validadas por inmunodetección. Se indican los anticuerpos primarios y secundarios, las casas comerciales, las diluciones utilizadas y los tiempos de incubación empleados en cada caso.

## 1.7.2. Validación de proteínas mediante SRM

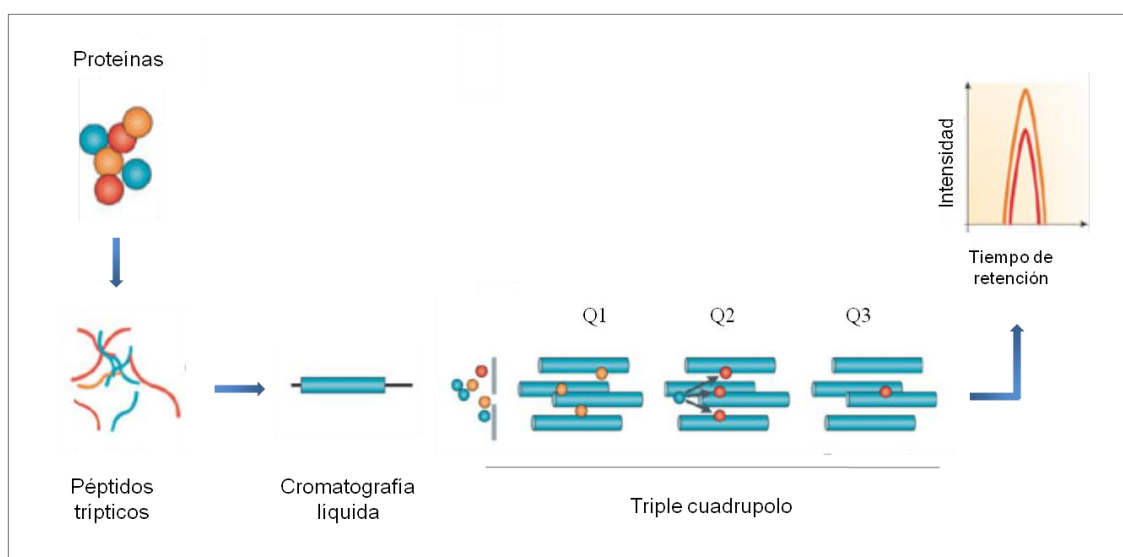
### 1.7.2.1. Digestión de proteínas en gel y preparación de la muestra

La digestión se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Schevchenko et al. [181], con ligeras modificaciones: los fragmentos de gel fueron incubados con DTT 10 mM (Sigma Aldrich) en bicarbonato amónico 50 mM (99% de pureza; Scharlau) durante 30 min a 56°C para llevar a cabo la reducción. Posteriormente, se alquilaron con IAA 55 mM (Sigma Aldrich) en bicarbonato de amonio 50 mM durante 20 min a temperatura ambiente. Los fragmentos de gel se lavaron con bicarbonato amónico 50 mM en metanol al 50% (gradiente HPLC, Scharlau), con acetonitrilo (gradiente, HPLC, Scharlau) y se secaron en un *Speed-vac Savant DNA120* (Thermo Fisher). A continuación se agregó tripsina porcina modificada (grado secuenciación, Promega, Madison, WI, EEUU) a una concentración final de 20 ng/μl en bicarbonato de amonio 20 mM. Después de la digestión a 37°C durante la noche, los péptidos se extrajeron con acetonitrilo acuoso al 60% y 0,1% de ácido fórmico (99,5% de pureza, Sigma Aldrich) y las muestras se resuspendieron en agua con 2% de ácido fórmico (FA) y 2% ACN.

### 1.7.2.2. Análisis mediante Monitorización de Reacción Seleccionada (SRM)

El sistema LC-MS/MS consistía en un nano LC TEMPO (AB Sciex) combinado con un muestreador automático nano LC y acoplados a un triple cuadrupolo modificado (LC-

MS/MS 4000 QTRAP, AB Sciex). Se hicieron tres inyecciones para cada muestra (4  $\mu$ l conteniendo 8  $\mu$ g de proteína) usando fase móvil A (2% ACN/98% H<sub>2</sub>O, 0,1% FA) con un flujo de 10  $\mu$ l/min durante 5 min. Los péptidos se cargan en un cartucho de micro-precolumna (AcclaimPepMap 100 C18, 5  $\mu$ m, 100Å; 300  $\mu$ m x 5 mm) para preconcentrar y desalinizar las muestras. La cromatografía líquida de fase reversa se realizó en una columna C18 (Onyx Monolithic C18, 150 x 0,1 mm., Phenomenex) en gradiente de fases A y B (98% ACN/2% H<sub>2</sub>O, 0,1% FA). Los péptidos se eluyeron con un flujo de 900 nl/min, siguiendo los siguientes pasos: de 2% a 15% de fase B durante 2 min, de 15% a 30% de fase B durante 18 min, de 30% a 50% de fase B durante 5 min, de 50% a 90% de fase B durante 2 min y finalmente el 90% de fase B para regenerar la columna durante 3 min.



**Figura MM\_13.** Esquema de la técnica monitorización de reacción seleccionada (SRM). En el primer cuadrupolo Q1 se selecciona el péptido precursor que será fragmentado en la cámara de colisión (Q2). La elección de un péptido producto de entre los generados en la cámara de colisión permitirá establecer la transición péptido precursor/péptido producto característica de cada proteína.

La columna se regeneró con un 2% de fase B durante 15 min adicionales. El espectrómetro de masas fue configurado para funcionar en modo de iones positivos con voltaje de spray de ionización de 2800V y a una temperatura de calentador de interfaz de nano-flujo de 150°C. La fuente y la cortina de gas se establecieron a 20 y 10 psi, respectivamente utilizándose nitrógeno en ambos casos. La energía de la colisión fue optimizada para obtener la máxima eficiencia de transmisión y sensibilidad para cada transición de SRM. El algoritmo *IntelliQuan* incluido en el programa *Analyst* 1.4.5 se utilizó para calcular las abundancias basándose en las áreas de pico después de integración.

## **2. ANÁLISIS METABOLÓMICO DEL PLASMA**

### **2.1. Selección de pacientes y obtención de las muestras**

Análogamente a lo descrito en el apartado 1.1., la selección de pacientes y la obtención de muestras para el análisis metabolómico del plasma se realizó en el Servicio de Hemodinámica del Hospital Virgen de la Salud (Toledo). Se establecieron dos grupos experimentales; 1) pacientes con síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST en el electrocardiograma (SCASEST) y 2) controles sanos. La inclusión de los pacientes en cada uno de los grupos fue llevado a cabo por el Dr. José Moreu, Jefe del Servicio de Hemodinámica. Los criterios clínicos de exclusión fueron los mismos que los considerados para el análisis proteómico del plasma. Todos los voluntarios sanos incluidos en el grupo control, así como los pacientes con SCASEST presentaban una distribución de sexo y edad sin diferencias significativas entre ellos (Tabla 1). En todos los casos la recogida de muestra de los pacientes se realizó en un intervalo inferior a 12 horas tras producirse el evento coronario. Se recogieron 28 ml de sangre en tubos estériles de EDTA (BD Microtainer<sup>®</sup>) que fueron enviados inmediatamente al Laboratorio de Fisiopatología Vascular del Hospital Nacional de Parapléjicos (Toledo) y procesados en un tiempo inferior a 2 horas para evitar el deterioro de la muestra. Todas las muestras fueron centrifugadas a 1300xg (5810R, Eppendorf) durante 10 min a temperatura ambiente para obtener el plasma que se guardó en alícuotas de 500 µl a -80 °C hasta su estudio metabolómico. El estudio se ha llevado a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki y cuenta con la aprobación del comité Ético del Hospital Virgen de la Salud (Toledo).

### **2.2. Comparación entre diferentes reactivos de derivatización**

De manera rutinaria, la preparación de una determinada muestra biológica para su análisis mediante GC/MS consta de dos pasos: en el primero, se pretende proteger los grupos carbonilo de las moléculas para evitar la formación de productos secundarios que disminuirían el rendimiento de la reacción de derivatización y afectarían al análisis cuantitativo de la muestra. Para este primer paso, los reactivos más ampliamente utilizados en la bibliografía son el hidrocloreto de hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OHHCl}$ ) y el hidrocloreto de metoxiamina ( $\text{CH}_3\text{ONH}_2\text{HCl}$ ) [164, 183-185]. El segundo paso necesario para la preparación de la muestra supone llevar a cabo una reacción de derivatización que consiste en proteger los grupos polares presentes y que son los

responsables de sus elevados puntos de ebullición, consiguiendo por tanto disminuir estos, y que dichos compuestos sean analizables mediante GC/MS. Para este segundo paso, los reactivos más ampliamente utilizados, gracias a su alto rendimiento de derivatización, son el N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida con el 1% trimetilclorosilano (BSTFA+1% TMCS) y N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida con el 1% trimetilclorosilano (MSTFA+1% TMCS) [164, 183-185]. En ambos caso el 1% de trimetilclorosilano actúa como catalizador favoreciendo la reacción de derivatización.

Para encontrar cual era la mejor combinación de reactivos para el primer y segundo paso de derivatización, se llevó a cabo un experimento previo al análisis metabolómico de las muestras, en el que se utilizaron las cuatro combinaciones posibles de los reactivos anteriormente descritos. Se empleó en todos los casos el método desarrollado por Moritz et al. [186] con pequeñas modificaciones, manteniendo siempre las condiciones experimentales y cambiando exclusivamente, en cada caso, los reactivos de derivatización empleados.

### **2.2.1. Reactivos**

El N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida con el 1% trimetilclorosilano (BSTFA+1% TMCS) se obtuvo de Supelco. El N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida con el 1% trimetilclorosilano (MSTFA+1% TMCS), el hidrocloreuro de hidroxilamina, el hidrocloreuro de metoxiamina, el acetonitrilo, y la piridina se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El agua miliQ ultrapura utilizada fue producida por un sistema Milli-Q ReagentWater System (Millipore).

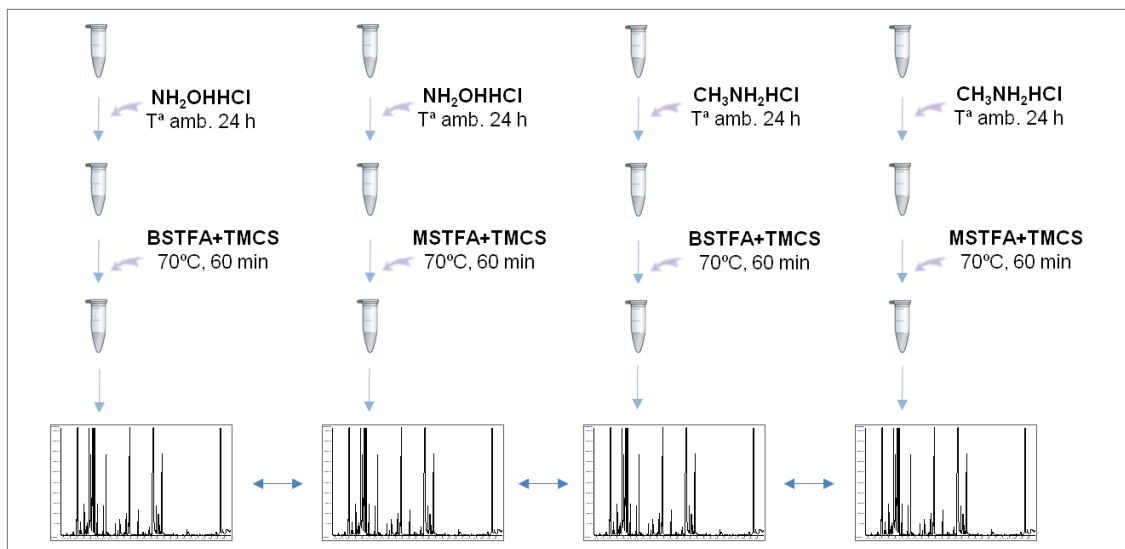
### **2.2.2. Protocolo de derivatización de plasma**

A 50 µl de plasma se añadieron 50 µl de acetonitrilo. La mezcla se vorteseó energicamente durante 30 s. y se centrifugó a 12000xg (5810R, Eppendorf) durante 10 min para precipitar las proteínas. 75 µl del sobrenadante se transfirieron a un tubo eppendorf de 1,5 ml y se llevó a sequedad calentando a 70°C la muestra en un termobloque (Thermomixer comfort, Eppendorf) durante 1h. Para llevar a cabo la protección de los grupos carbonilo, se añadieron 40 µl de hidrocloreuro de metoxiamina o hidrocloreuro de hidroxilamina (20 mg/ml) en piridina y la mezcla se vorteseó energicamente durante 1 min. La reacción se dejó durante 24 h a temperatura ambiente con agitación orbital. Transcurrido este tiempo, la reacción de derivatización se llevó a

cabo añadiendo 20  $\mu\text{l}$  de BSTFA + 1% TMCS o MSTFA+1% TMCS a cada muestra. La mezcla se vorteseó durante 30 s. y la reacción se mantuvo durante 60 min a 70°C en un termobloque (Thermomixer comfort, Eppendorf). Una vez finalizada esta, la muestra se centrifugó de nuevo a 12000xg durante 10 min para precipitar cualquier posible resto que pudiera interferir en el análisis. Se recogieron 50  $\mu\text{l}$  de sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf de 1,5 ml y esta muestra se inyectó en el GC/MS (FiguraMM\_14).

### 2.2.3. Análisis cromatográfico

El equipo utilizado para el análisis metabólico de plasma fue un cromatógrafo de gases 6890N (Agilent Technologies) unido a un detector de masas de cuadrupolo simple 5975c (Agilent Technologies). La columna cromatográfica utilizada fue una HP-5MS (5% fenilmetilsiloxano de 30m x 250 $\mu\text{m}$  x 0,25 $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies). El programa de temperaturas utilizado fue el siguiente: temperatura inicial de 60°C, seguido de una rampa de 5°C/min hasta alcanzar 285 °C, temperatura que se mantuvo durante 2 min completando así un ciclo cromatográfico de 47 min. La inyección de la muestra (1 $\mu\text{l}$ ) se realizó en modo *splitless*, es decir sin fraccionamiento de la muestra previo a entrar en la columna, utilizando helio como gas portador a un flujo constante de 1.5 ml/min. La temperatura del inyector y de la interfase fueron 230 y 290°C respectivamente. La adquisición se realizó en modo SCAN con un voltaje de impacto electrónico de 70 eV, la temperatura de la fuente de iones fue de 230°C y se escaneó un rango de masas entre 50-600 u a una relación de 0,99 scan/s (Tabla MM\_03).



**Figura MM\_14.** La comparación directa de los resultados obtenidos utilizando las cuatro combinaciones posibles de reactivos de derivatización permitió encontrar los reactivos idóneos para el análisis metabólico del plasma.

## **2.3. Análisis metabólico completo de plasma**

### **2.3.1. Reactivos**

El N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida con el 1% trimetilclorosilano (BSTFA+1% TMCS) se obtuvo de Supelco. El hidrocloreto de metoxiamina, el acetonitrilo, el pentadecanoato de metilo y la piridina se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El agua miliQ ultrapura utilizada fue producida por un sistema Milli-Q ReagentWater System (Millipore).

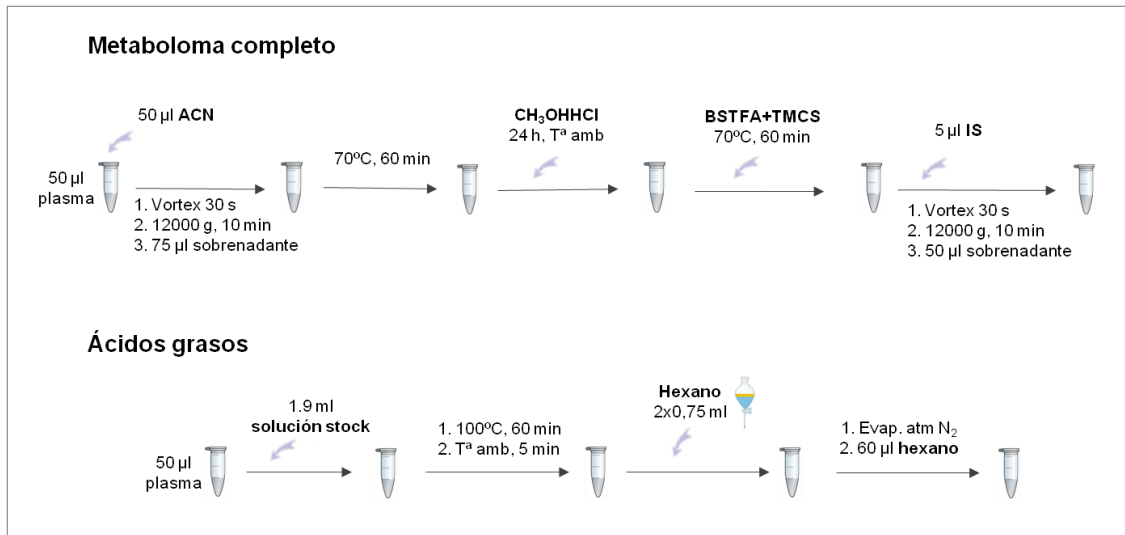
### **2.3.2. Reacción de derivatización**

Siguiendo las condiciones de reacción establecidas en el método desarrollado por Moritz y col. [186] y explicadas detalladamente en el apartado 2.2.2. de Material y Métodos, procedimos a llevar a cabo el análisis metabólico completo de plasma empleando como reactivos de derivatización el hidrocloreto de metoxiamina y BSTFA+1%TMCS. Brevemente, a 50 µl de plasma se añadieron 50 µl de acetonitrilo. La mezcla se vorteseó y centrifugó a 12000xg (5810R, Eppendorf) durante 10 min para precipitar las proteínas. 75 µl del sobrenadante se llevaron a sequedad calentando a 70°C la muestra en un termobloque (Thermomixer comfort, Eppendorf) durante 1h. Se añadieron 40 µl de hidrocloreto de metoxiamina (20 mg/ml) y la reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 h. Finalmente, se añadieron 20 µl de BSTFA + 1% TMCS y la reacción se mantuvo durante 60 min a 70°C. Una vez finalizada esta, se añadieron 5 µl de pentadecanoato de metilo (10 ppm) utilizado como estándar interno y la muestra se centrifugó de nuevo a 12000xg (5810R, Eppendorf) durante 10 min para precipitar cualquier posible resto que pudiera interferir en el análisis. Se recogieron 50 µl de sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf de 1,5 ml y esta muestra se inyectó en el GC/MS (Figura MM\_15).

### **2.3.3. Análisis cromatográfico**

Las condiciones experimentales del cromatógrafo de gases y del espectrómetro de masas para el análisis metabólico completo de plasma fueron las mismas que se describieron en el apartado 2.2.3. de Material y Métodos. Brevemente, el programa de temperaturas fue el siguiente: temperatura inicial de 60°C, seguido de una rampa de 5°C/min hasta alcanzar 285 °C, temperatura que se mantuvo durante 2 min completando así un ciclo cromatográfico de 47 min. La inyección de la muestra (1µl) se realizó en modo *splitless* utilizando helio como gas portador a un flujo constante de 1.5 ml/min. La temperatura del inyector y de la interfase fueron 230 y 290°C respectivamente. La

adquisición se realizó en modo SCAN con un voltaje de impacto electrónico de 70 eV, la temperatura de la fuente de iones fue de 230°C y se escaneó un rango de masas entre 50-600 u a una relación de 0,99 scan/s. (Tabla MM\_03).



**Figura MM\_15.** Comparativa de los protocolos de preparación de la muestra para el análisis metabolómico completo de plasma y de ácidos grasos en plasma.

## 2.4. Análisis metabolómico de ácidos grasos en plasma

### 2.4.1. Reactivos

Todos los reactivos utilizados para el análisis metabolómico de ácidos grasos en plasma, cloruro de acetilo, el estándar interno (pentadecanoato de metilo), metanol y hexano fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. El agua miliQ ultrapura utilizada fue producida por un sistema *Milli-Q Reagent Water System* (Millipore).

### 2.4.2. Reacción de transesterificación

El proceso de preparación de la muestra para llevar a cabo el análisis metabolómico de ácidos grasos consiste en una reacción de transesterificación que se realizó siguiendo el método descrito por Lepage y Roy [187] con pequeñas modificaciones. Para cada sesión de trabajo se preparó solución stock de reactivos nueva. Esta solución stock incluye 1,7 ml de metanol, 100 µl de cloruro de acetilo y 100 µl de una disolución de 100 ppm de estándar interno. Brevemente, 50 µl de plasma se combinaron con 1.9 ml de solución de stock en un eppendorf de rosca de 2 ml que fue calentado a 100 °C durante 60 min en un termobloque (Thermomixer comfort, Eppendorf). Posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 5 min, se añadieron 0,75 ml de hexano y se vortesearon enérgicamente durante 30 s. Este proceso de extracción fue repetido en dos ocasiones.

Tras cada una de ellas se recogió el sobrenadante con la ayuda de una pipeta Pasteur y se combinaron los tres extractos en un nuevo eppendorf que fue llevado a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno. El residuo seco obtenido, se redisolvió con 60  $\mu$ l de hexano quedando listo para su análisis (Figura MM\_15).

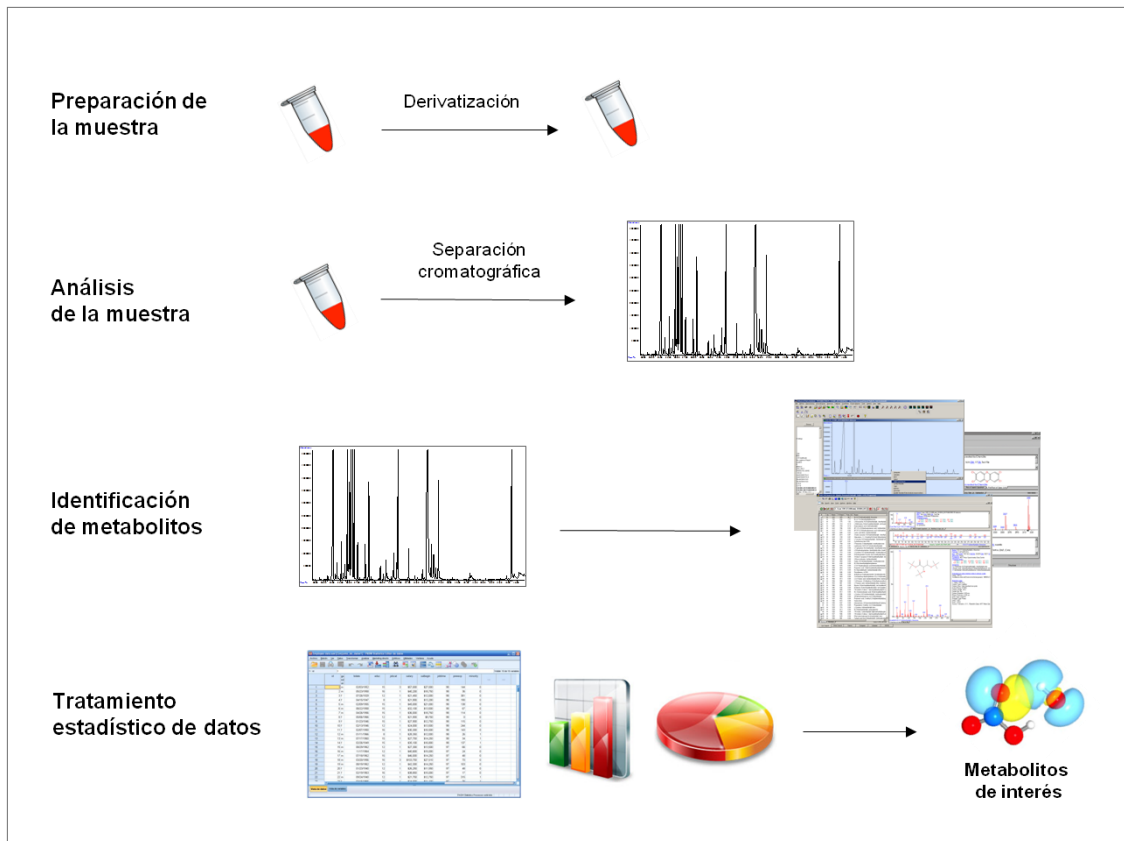


Figura MM\_16. Resumen esquemático del protocolo empleado para la identificación de metabolitos.

### 2.4.3. Análisis cromatográfico

El equipo y la columna cromatográfica utilizados para el análisis de ácidos grasos en plasma fue el mismo que el descrito en el apartado 2.2.3. El programa de temperaturas utilizado en un análisis cromatográfico debe establecerse en función de la naturaleza de los metabolitos a separar. En este caso, la rampa de temperaturas fue la siguiente: 1 min a una temperatura inicial de 130°C seguido de una rampa de 4°C/min hasta alcanzar 178°C, después una rampa más suave de 1°C/min hasta alcanzar 225°C y finalmente una rampa de 40°C/min hasta alcanzar 245°C, temperatura que se mantiene durante 13 min completándose así un ciclo cromatográfico de 45 min. La inyección de la muestra (1  $\mu$ l) se realizó en modo *split* con una relación de 7,5:1. Se utilizó helio como gas portador a un flujo de 2.7 ml/min. La temperatura del inyector y de la interfase fueron 230 y 300°C respectivamente. La adquisición se realizó en modo SCAN con un voltaje de impacto

electrónico de 70 eV, la temperatura de la fuente de iones fue de 230°C y se escaneó un rango de masas entre 50-600 u a una relación de 0,99 scan/s.

	Comparativa reactivos	Metaboloma completo	Ácidos grasos
<b>CG 6890N</b>			
Temperatura de inyección	250°C	250°C	260°C
Volumen de inyección	1 µl	1 µl	1 µl
Modo de inyección	Splitless	Splitless	Split 7,5:1
Flujo de gas portador	Helio (1.5 ml/min)	Helio (1.5 ml/min)	Helio (2.7 ml/min)
Gas saver	On	On	On
Flujo Gas saver	20 ml/min, 3 min	20 ml/min, 3 min	20 ml/min, 3 min
Temperatura del detector	280°C	280°C	280°C
Temperatura del horno	60°C, 5°C/min hasta 285°C, 2 min	60°C, 5°C/min hasta 285°C, 2 min	130°C 1min, 4°C/min hasta 178°C, 1°C/min hasta 225°C, 40°C/min hasta 245°C, 13 min
<b>MSD 5975c</b>			
Modo de adquisición	Scan (50-600 u)	Scan (50-600 u)	Scan (50-600 u)
Relación scans	0.99 scans/s	0.99 scans/s	0.99 scans/s
Signal data rate	20 Hz	20 Hz	20 Hz
Energía de impacto	70 eV	70 eV	70 eV
Temp. interfase	290°C	290°C	300°C
Temp. cuadrupolo	150°C	150°C	150°C
Temp. de la fuente	230°C	230°C	230°C
Retraso de fase móvil	4.90 min	4.90 min	0 min

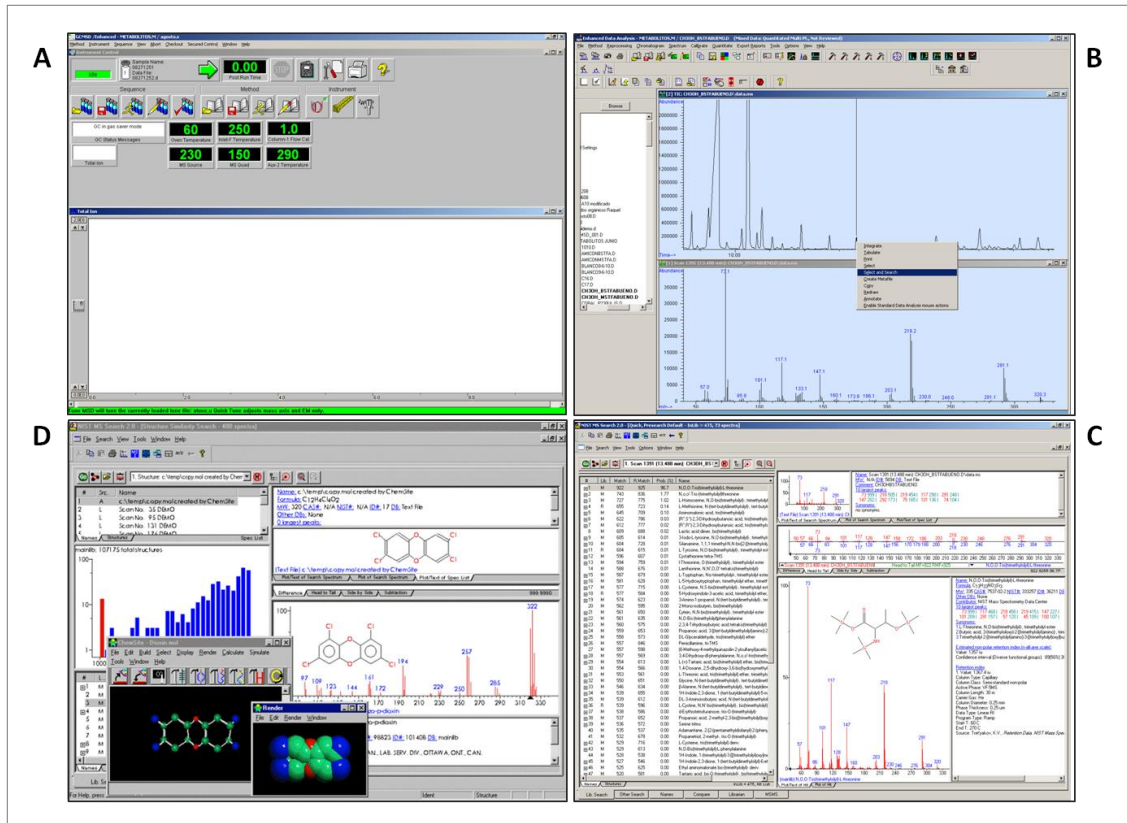
**Tabla MM\_03.** Resumen de las condiciones experimentales utilizadas en el cromatógrafo de gases y en el espectrómetro de masas para el análisis cualitativo y cuantitativo de metabolitos en plasma.

## 2.5. Identificación de metabolitos

Independientemente del tipo de análisis metabolómico realizado, el manejo de los cromatogramas obtenidos de cada muestra inyectada en el equipo se realizó utilizando el programa ChemStation (Agilent Technologies) y la identificación de los diferentes metabolitos se llevó a cabo por comparación directa de los espectros de masas de cada uno de ellos con los espectros de masas contenidos en la librería NIST 2.0 (National Institute of Standards and Technology) (Figura MM\_17).

Inicialmente, se llevó a cabo un análisis cualitativo para la identificación de metabolitos por búsqueda directa en librería de espectros. Para ello, se realizaron adquisiciones en modo SCAN, que consiste en hacer barridos entre dos masas (ej. 50-500 u.) para tener una información total de la muestra a analizar. Una vez obtenidos estos cromatogramas, los espectros de masas de cada uno de los picos cromatográficos fueron comparados con los espectros de masas contenidos en la librería espectral NIST 2.0. Se consideraron como identificados todos aquellos metabolitos cuya puntuación de identificación fuese

igual o superior a 60. Posteriormente, para poder encontrar los metabolitos que estaban alterados en el conjunto de muestras del grupo de pacientes con SCASEST frente al grupo control, se llevó a cabo la comparación entre los perfiles cromatográficos de ambos grupos. Para ello, se utilizaron las áreas bajo la curva normalizadas de cada pico cromatográfico empleando el pentadecanoato de metilo como estándar interno. El posterior análisis estadístico de las áreas normalizadas para cada metabolito identificado empleando el programa SPSS v15.0 permitió identificar los metabolitos alterados.



**Figura MM\_17.** Representación del proceso de identificación de metabolitos mediante el programa ChemStation (Agilent Technologies). **(A)** Selección de las condiciones experimentales que se van a aplicar en cada método. **(B)** Módulo de análisis de datos en el cual se puede activar el motor de búsqueda de metabolitos en la base espectral NIST 2.0. **(C)** Resultados obtenidos en la base espectral NIST 2.0 para el metabolito elegido. **(D)** Módulo de información del metabolitos identificados.

## 2.6. Validación de resultados

Para llevar a cabo la validación de los metabolitos cuyas concentraciones se encontraron significativamente variadas se eligió un nuevo grupo de muestras de 15 pacientes con SCASEST y 15 controles sanos, diferentes al empleado en los experimentos previos, y las muestras fueron analizadas mediante GC/MS.

### 2.6.1. Validación de resultados mediante GC/MS

Las muestras empleadas durante el proceso de validación fueron derivatizadas según el protocolo descrito previamente en el apartado 2.2.2. de Material y Métodos. Brevemente, a 50 µl de plasma se añadieron 50 µl de acetonitrilo. La mezcla se vorteseó energicamente durante 30 s, se centrifugó a 12000xg (5810R, Eppendorf) durante 10 min y 75 µl del sobrenadante se transfirieron a un tubo eppendorf de 1,5 ml que se llevó a sequedad calentando a 70°C la muestra en un termobloque (Thermomixer comfort, Eppendorf) durante 1 h. La muestras se derivatizaron añadiendo 40 µl de hidrocloreuro de metoxiamina (24 h, temperatura ambiente) y 20 µl de BSTFA + 1% TMCS (60 min a 70°C). La muestra se centrifugó de nuevo a 12000xg (5810R, Eppendorf) durante 10 min y se recogieron 50 µl de sobrenadante. Esta muestra se inyectó en el GC/MS (Figura MM\_15).

De manera análoga, las condiciones experimentales del cromatógrafo de gases y del espectrómetro de masas fueron las mismas que se describieron en el apartado 2.2.3. de Material y Métodos. Brevemente, el programa de temperaturas fue el siguiente: temperatura inicial de 60°C, seguido de una rampa de 5°C/min hasta alcanzar 285 °C, temperatura que se mantuvo durante 2 min completando así un ciclo cromatográfico de 47 min. La inyección de la muestra (1 µl) se realizó en modo *splitless* utilizando helio como gas portador a un flujo constante de 1.5 ml/min. La temperatura del inyector y de la interfase fueron 230 y 290°C respectivamente. La adquisición se realizó en modo SCAN con un voltaje de impacto electrónico de 70 eV, la temperatura de la fuente de iones fue de 230°C y se escaneó un rango de masas entre 50-600 u a una relación de 0,99 scan/s (Tabla MM\_03).



## **Resultados**



# Resultados

*Duda siempre de ti mismo, hasta que los datos no dejen lugar a dudas*

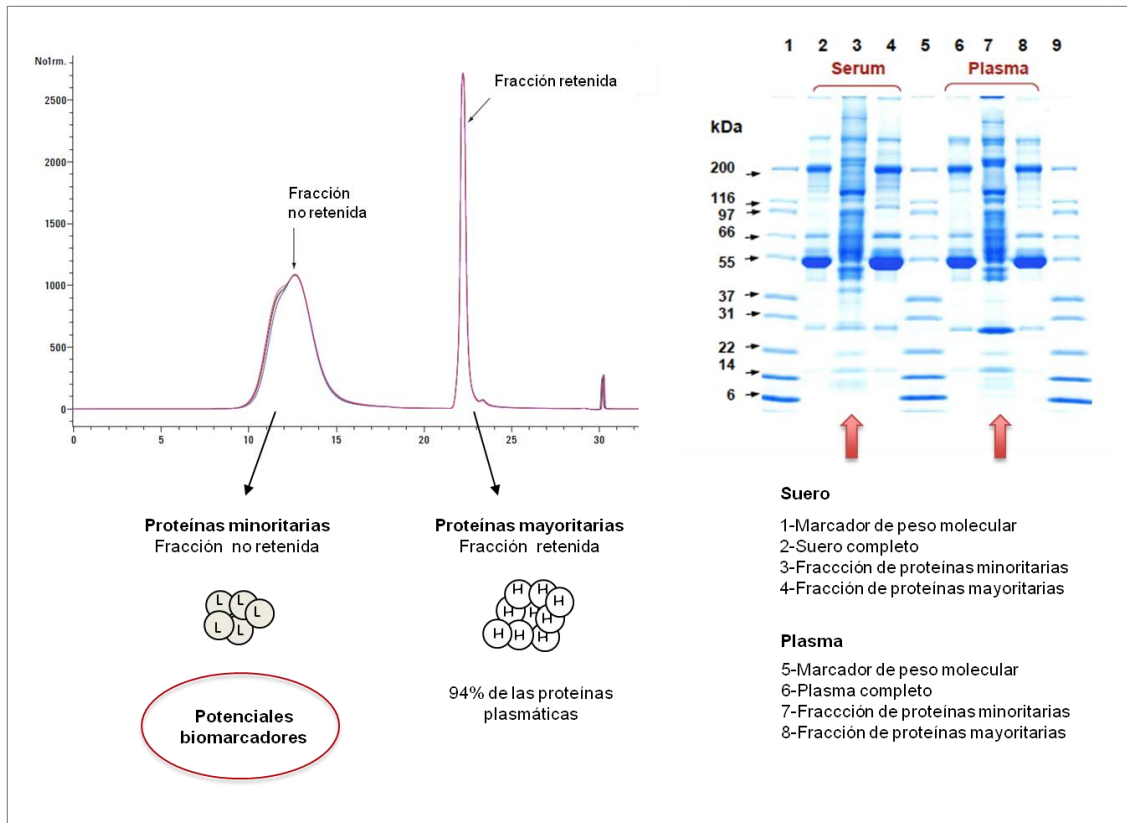
Louis Pasteur

## **1. Análisis proteómico de plasma deplecionado en pacientes con SCASEST vs controles sanos**

### **1.1. Depleción de las proteínas mayoritarias del plasma**

El primer paso para realizar el análisis proteómico del plasma consistió en aumentar la proporción de las proteínas menos abundantes que forman parte del conjunto de proteínas de interés donde se pueden encontrar los posibles potenciales biomarcadores mejorando de esta manera los resultados obtenidos previamente por la Dra. VM Dardé mediante el uso de la columna de afinidad Multiple Affinity Removal Column (MARS Hu-6) [188]. Para ello, utilizamos el sistema Multiple Affinity Removal System (Agilent Technologies) en el que se basa la columna MARS Hu-14 capaz de retener entre un 97.5% y un 99% de las catorce proteínas más abundantes del plasma. Al igual que ocurría con la columna MARS Hu-6, en cada ciclo cromatográfico se obtienen dos fracciones diferentes. La primera fracción de proteínas minoritarias, eluidas en un tampón fosfato de pH neutro (tampón A), contiene el conjunto de proteínas sobre el cual se realizará el estudio. La segunda fracción, eluida en un tampón con urea y pH ácido (tampón B), contiene las proteínas mayoritarias del plasma (el 94% del contenido proteico total) que fueron retenidas en la columna. Esta fracción se guardó a -80°C para su posible estudio en el futuro. Cada muestra de pacientes con SCASEST, pacientes con SCACEST y controles sanos se deplecionó de proteínas mayoritarias realizando cuatro inyecciones sucesivas, cada una de la cuales contenía 20 µl de plasma diluidos en proporción 1:3 con 60 µl de tampón A. En todos los casos las primeras fracciones se combinaron para cada muestra y así obtener la cantidad de proteína requerida en los experimentos posteriores (Figura R\_01). Finalmente, antes de llevar a cabo la

cuantificación por el método Bradford [174] y el isoelectroenfoco se realizó un cambio de tampón a las muestras utilizando tubos concentradores que eliminó el tampón A ya que es incompatible por su alto contenido en sales, pasando las muestras a un tampón con bicarbonato amónico (AMBIC 65 mM).



**Figura R\_01.** La columna MARS Hu-14 (Agilent Technologies) permite aumentar la proporción de proteínas minoritarias del plasma, reteniendo por afinidad las catorce proteínas más abundantes.

## 1.2. Electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE)

Para realizar el estudio de expresión diferencial de proteínas en plasma de pacientes con SCASEST frente a controles sanos se llevó a cabo un análisis de 2D-DIGE que incluía siete pacientes con SCASEST y siete controles sanos. El diseño experimental del estudio está detallado en la Tabla R\_01. Según este diseño, cada gel contiene dos muestras diferentes, un control sano y un paciente SCASEST, y un control interno que es un mancomunado de todas las muestras incluidas en el estudio. Se prepararon un total de siete geles de los que se obtuvieron 21 imágenes digitalizadas, 14 correspondientes a las muestras incluidas en el estudio y 7 a controles internos. Con el módulo de análisis diferencial en gel (DIA, Differential In-gel Analysis) del programa “DeCyder Differential Analysis Software” (GE Healthcare) versión 7.0, se realizó la co-detección de los puntos en cada gel y se llevó a cabo su emparejamiento con el resto de los geles y la normalización.

### 1.2.1. Análisis Multivariante

Una vez importadas las imágenes de todos los geles al módulo DIA se detectaron 1293 manchas proteicas presentes en todos los geles del estudio. Se realizó una selección de datos para quedarnos únicamente con aquellas manchas proteicas cuya expresión diferencial fuese estadísticamente significativa. Para lo cual se llevó a cabo un análisis estadístico mediante una *t-Student* ( $p \leq 0.05$ ) y se establecieron dos criterios de exclusión: las manchas proteicas debían estar presentes en el 90% de los mapas proteicos, y el ratio medio debía ser igual o superior a  $\pm 1.5$ . Con estos criterios se obtuvieron 14 manchas proteicas diferenciales.

Replicados	Controles	Pacientes
1	C1	P2
2	C7	P16
3	C11	P17
4	C16	P21
5	C17	P23
6	C18	P28
7	C20	P29

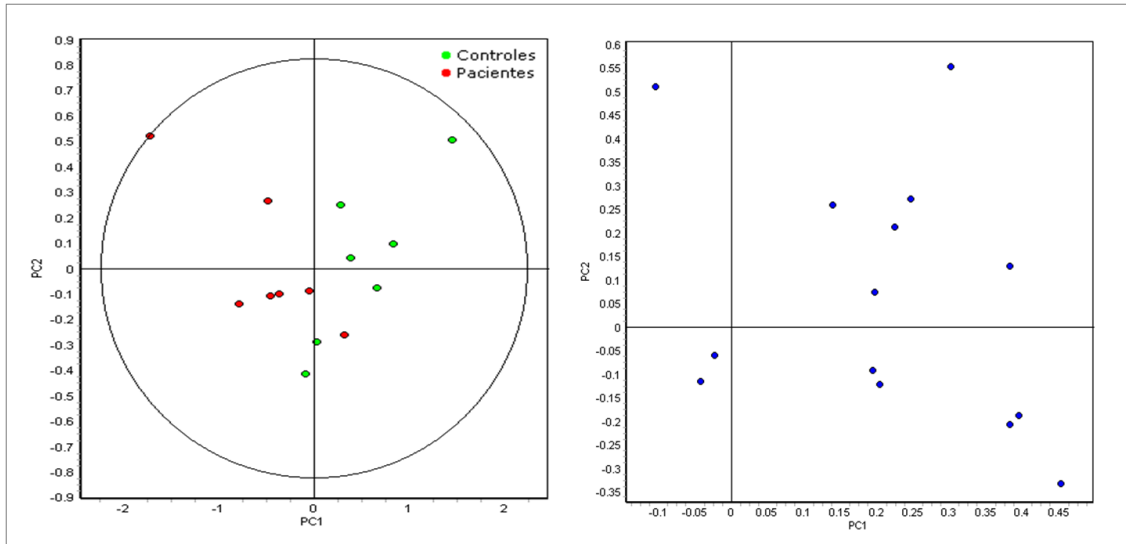
GEL	Cy2 estándar	Cy3	Cy5
1	Pool	C17	P2
2	Pool	C18	P16
3	Pool	C20	P17
4	Pool	P21	C1
5	Pool	P23	C7
6	Pool	P28	C11
7	Pool	P29	C16

**Tabla R\_01.** Diseño experimental del análisis 2D-DIGE (n=7) de pacientes con SCASEST frente a controles sanos.

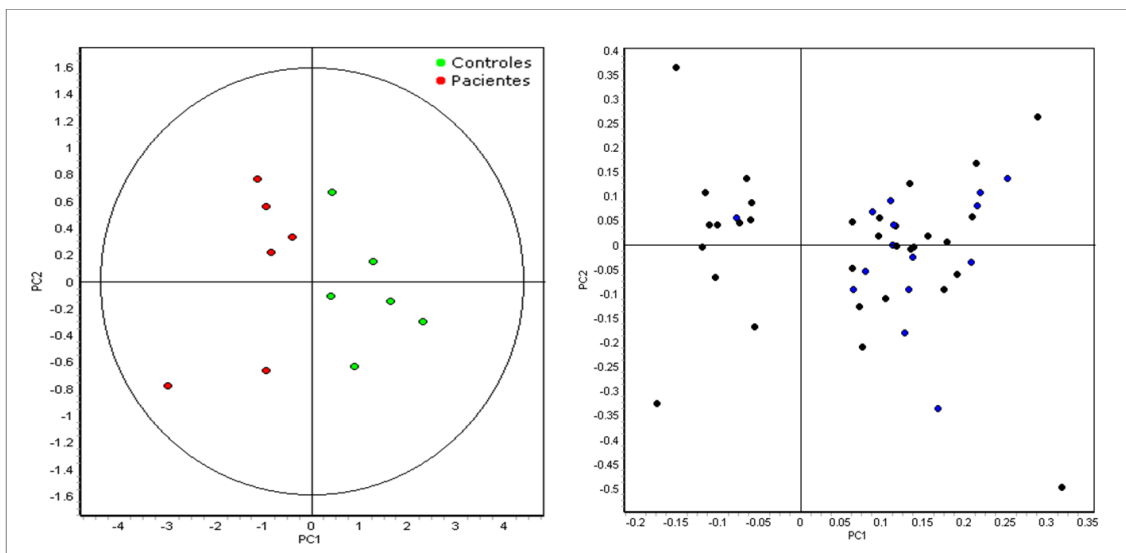
### 1.2.2. Análisis de Componentes Principales (ACP)

En la Figura R\_02 se muestran los resultados obtenidos tras el análisis de componentes principales (ACP) del conjunto de datos filtrado (21 muestras y 14 manchas proteicas con alteraciones estadísticamente significativas en sus niveles de expresión). En el gráfico de puntuación (izquierda) podemos observar que dos muestras, un control y un paciente, no estaban correctamente clasificadas según la primera componente principal (PC1) lo que supone que estábamos incluyendo en el análisis dos muestras con perfiles de expresión atípicos respecto a sus respectivos grupos experimentales. Para evitar que la presencia de estas muestras pudiese alterar los resultados, decidimos seleccionar un nuevo conjunto de datos que excluyese las dos muestras con perfiles anómalos. Con este nuevo conjunto de datos, se realizó un nuevo análisis estadístico mediante una *t-*

*Student* ( $p \leq 0.05$ ) y siguiendo los criterios de exclusión anteriormente explicados. En este caso, se obtuvieron 47 manchas proteicas diferencialmente expresadas. Los resultados obtenidos con este nuevo subconjunto no muestran valores atípicos en el gráfico de puntuación de las muestras y nos permite ver como se agrupa cada grupo experimental (pacientes con SCASEST y controles sanos) quedando separados por la primera componente del análisis ACP (Figura R\_03).



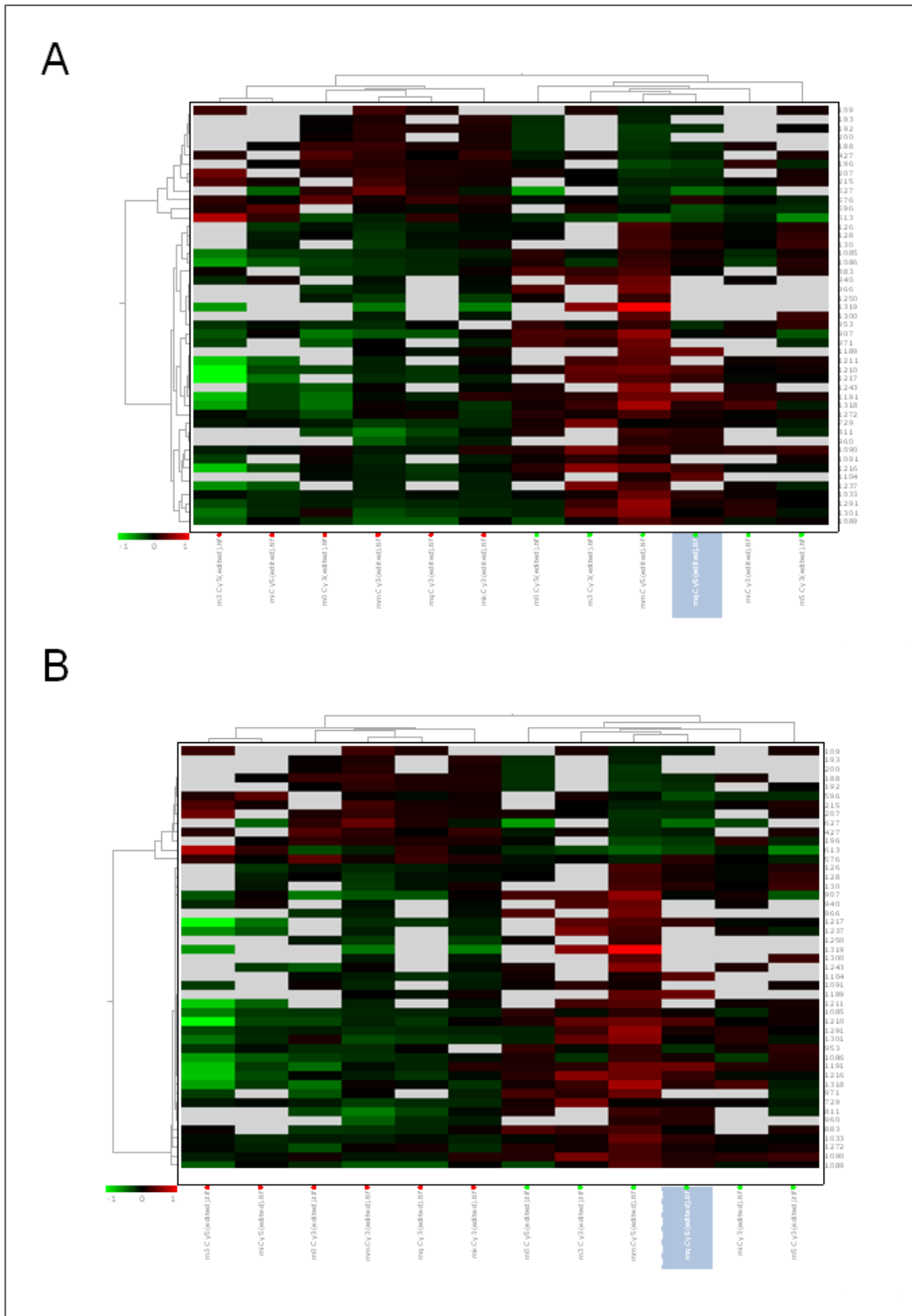
**Figura R\_02.** Resultados del análisis de componentes principales calculados tomando como variables las 14 manchas proteicas. En el gráfico de puntuación (izquierda) aparecen representadas las muestras. El gráfico de contribución (derecha) muestra la distribución de las manchas proteicas.



**Figura R\_03.** Resultados del análisis de componentes principales calculados tomando como variables las 47 manchas proteicas. En el gráfico de puntuación (izquierda) aparecen representadas las muestras. El gráfico de contribución (derecha) muestra la distribución de las manchas proteicas.

### 1.2.3. Análisis jerárquico

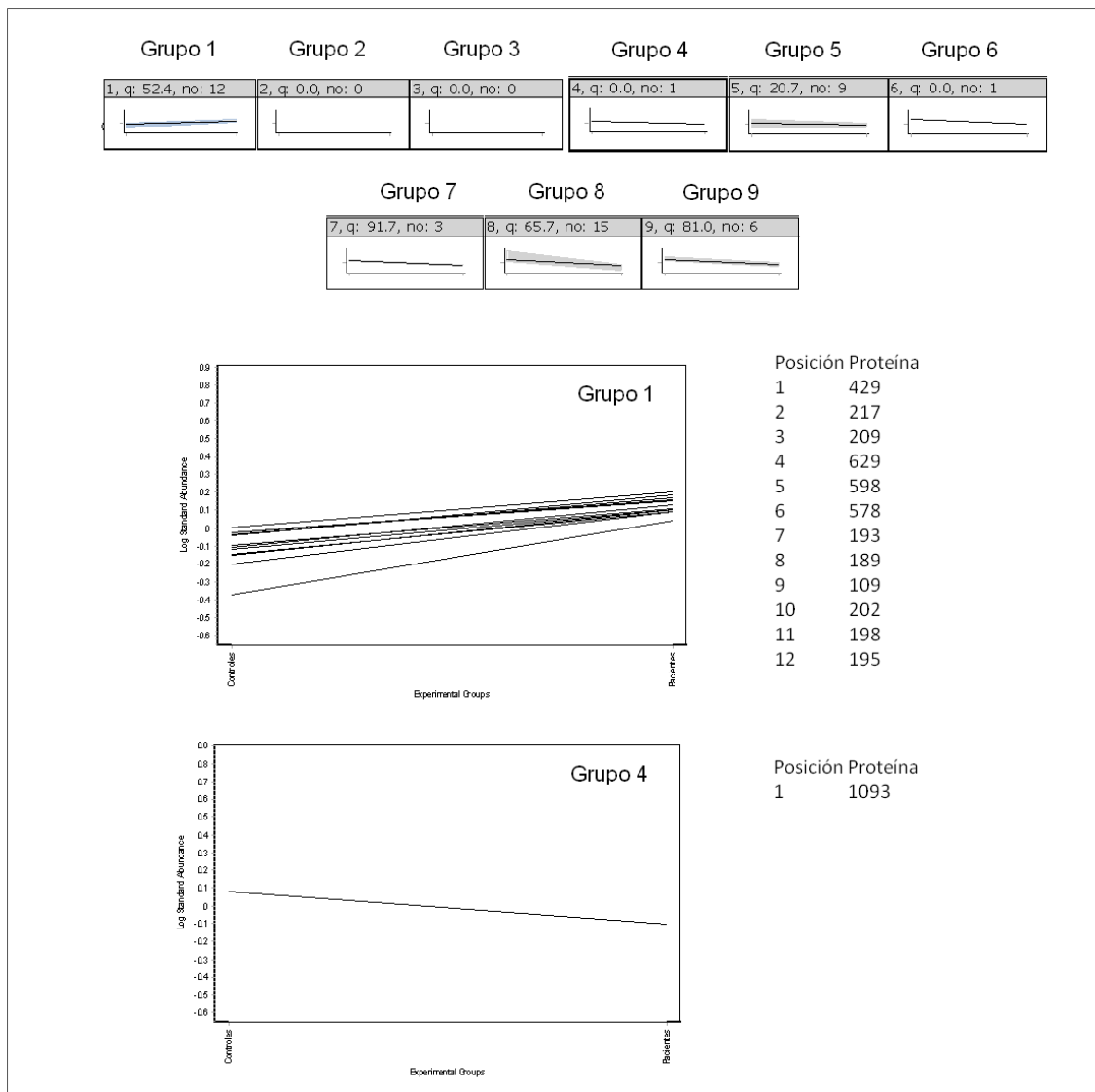
El análisis jerárquico de los resultados obtenidos en el análisis 2D-DIGE de plasma deplecionado de pacientes con SCASEST frente a controles sanos se realizó por duplicado. En el primer caso seleccionamos la distancia Euclídea como medida de la similitud (Figura R\_04A), para ver los grupos que se formaban según los valores absolutos de expresión y en el segundo caso seleccionamos el coeficiente de Pearson (Figura R\_04B), para ver si había diferencias al clasificar según las tendencias de expresión. En ambos casos podemos observar un buen de agrupación en las muestras (como ocurría en el ACP) y también en las manchas proteicas, con una distribución muy similar en ambos casos. En el análisis que utiliza la distancia Euclídea para estimar la similitud (Figura R\_04A), el dendrograma se observa una correcta clasificación de los grupos experimentales: los controles (verde) se sitúan a la derecha del panel, y el segundo grupo (rojo) que se sitúa a la izquierda del panel corresponde a los pacientes con SCASEST. Por su parte, el dendrograma que clasifica las manchas proteicas muestra dos grandes grupos: uno bien diferenciado que agrupa 13 manchas proteicas (en el extremo superior del panel) y otro grupo mayor que agrupa 34 manchas proteicas que presentaron niveles significativamente disminuidos en el grupo de pacientes con SCASEST. Cuando utilizamos el coeficiente de Pearson como medida de la similitud (Figura R\_04B), en el dendrograma que representa las muestras aparecen de nuevo dos grupos que son prácticamente los mismos que en el caso anterior. En cuanto a las manchas proteicas, podemos observar que aparecen dos grupos aparentemente más homogéneos (o más uniformes entre sí) respecto a los grupos obtenidos mediante clasificación euclídea pero agrupando igualmente 13 manchas proteicas estadísticamente aumentadas en el grupo de pacientes con SCASEST y 34 manchas proteicas disminuidas en el mismo grupo.

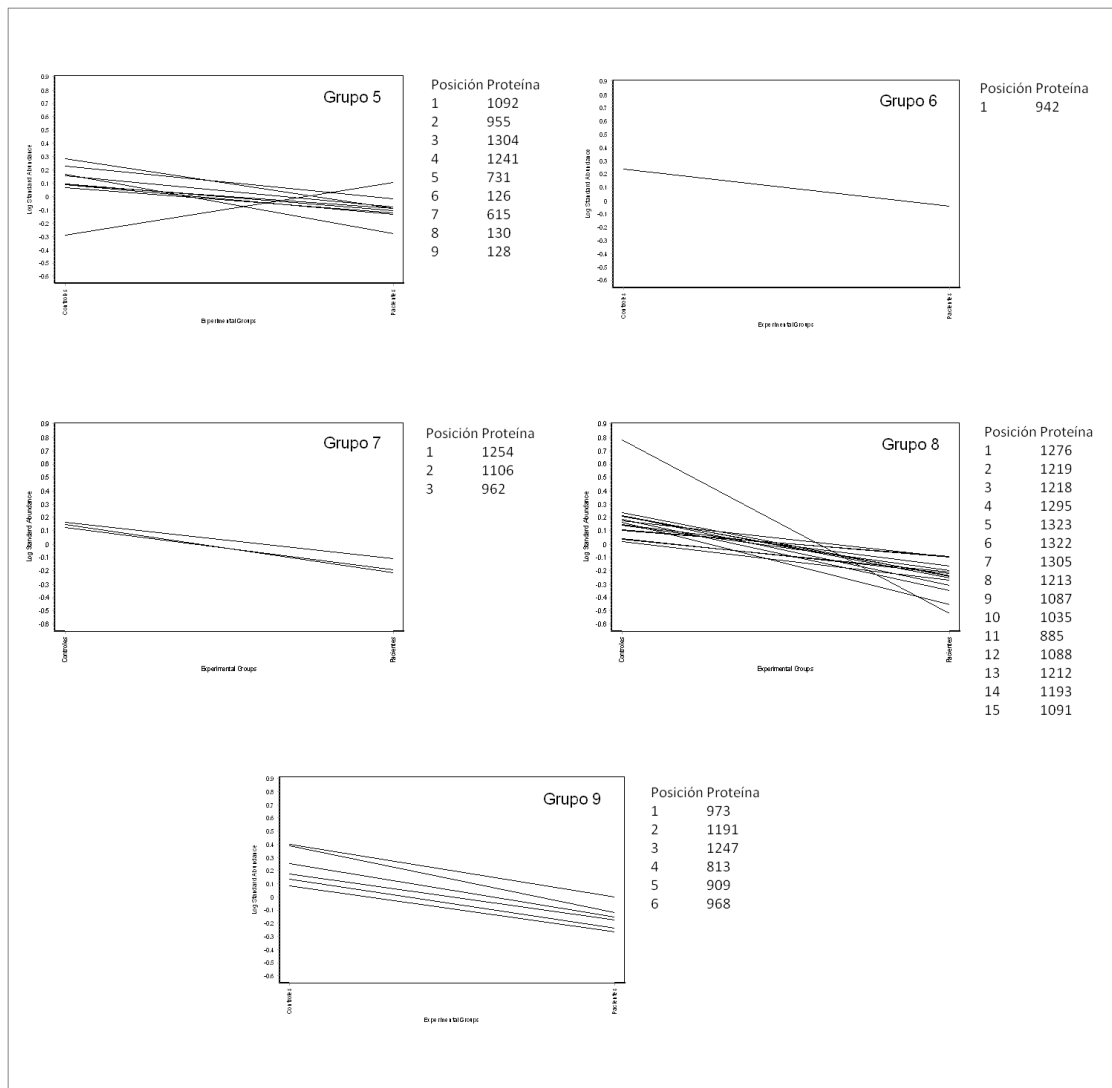


**Figura R\_04.** Diagramas de calor obtenidos tras la clasificación jerárquica de los datos. El dendrograma horizontal muestra la clasificación de las muestras, mientras que el dendrograma vertical corresponde a las manchas proteicas. (A) Similitud estimada mediante la distancia Euclídea. (B) Similitud estimada mediante el coeficiente de Pearson.

### 1.2.4. Análisis de grupos de K-medias

Con el módulo de análisis de variación biológica (BVA, Biological Variation Analysis) del programa “DeCyder Differential Analysis Software” (GE Healthcare) versión 7.0, se llevó a cabo un análisis de grupos de k-medias. El programa encontró en nuestro conjunto de datos nueve grupos en las que repartió las 47 manchas proteicas según sus patrones de expresión como se puede observar en la Figura R\_05. Los grupos 1, 7, 8 y 9 incluyeron manchas proteicas con perfiles de expresión homogéneos y, por tanto, con un valor “q” elevado (q=52.4, 91.7, 65.7, 81.0 respectivamente). Los grupos 4 y 6 incluyeron una sola mancha proteica, mientras que el grupo 5, que incluía 9 manchas proteicas, presentaba el valor “q” más bajo debido a que presentaban niveles de expresión menos homogéneos.





**Figura R\_05.** Resultados de la clasificación de k-medias. El programa encontró nueve grupos (arriba, el cuadro de categorías muestra sus valores “q” y el número de manchas incluidas en cada una) en las que repartió las 47 manchas proteicas según sus patrones de expresión. Los gráficos correspondientes a cada grupo aparecen numerados.

### 1.2.5. Identificación de las proteínas diferencialmente expresadas

De las 47 manchas proteicas diferencialmente expresadas que se obtuvieron del análisis estadístico, 13 estaban aumentadas en el grupo de pacientes con SCASEST y 34 estaban disminuidas. Para su identificación, se prepararon geles bidimensionales de 24 cm al 10% de acrilamida empleando tiras IPG pH 4-7 que se tiñeron con plata y se compararon los patrones de proteínas que fueron recortadas de los geles para su posterior digestión con tripsina y análisis mediante espectrometría de masas mediante MALDI-TOF. En aquellos casos en los que se identificó la proteína queratina, esta fue considerada como contaminación debido a las manipulaciones de la muestra y no fue considerada como proteína que estuviese alterada como consecuencia de la enfermedad en estudio.



Nº mancha	Proteína	Número de acceso	Mascot score	Ratio P/C	MW teórico (Da)	PI teórico	MW exp (Da)	PI exp	Función
189	ITI cadena pesada H4	ITIH4_HUMAN	143	1,68	103357.43	6,51	65501	4,98	Inflamación
193	ITI cadena pesada H4	ITIH4_HUMAN	91	1,76	103357.43	6,51	65295	5,01	Inflamación
198	ITI cadena pesada H4	ITIH4_HUMAN	81	1,51	103357.43	6,51	65226	5,03	Inflamación
209	ITI cadena pesada H4	ITIH4_HUMAN	169	1,71	103357.43	6,51	65158	5,12	Inflamación
217	Ceruloplasmina	CERU_HUMAN	100	1,52	122205.19	5,44	64849	5,18	Transporte
109	Ceruloplasmina	CERU_HUMAN	163	1,56	122205.19	5,44	67216	5,34	Transporte
130	Complemento factor H	CFAH_HUMAN	102	-1,69	137052.59	6,12	66942	5,45	Inmunidad
128	Complemento factor H	CFAH_HUMAN	171	-1,53	137052.59	6,12	67045	5,47	Inmunidad
126	Complemento factor H	CFAH_HUMAN	242	-1,63	137052.59	6,12	67113	5,49	Inmunidad
429	Complemento C1r	C1R_HUMAN	225	1,59	78213.16	5,76	60663	5,38	Inflamación
615a	Alfa-1-antiquimotripsina	AACT_HUMAN	104	3,16	47650.87	5,33	55105	4,94	Inflamación
615b	Kininógeno-1	KNG1_HUMAN	450	3,16	69896.70	6,23	55105	4,94	Inflamación
629	Antitrombina-III	ANT3_PONAB	150	2,86	49039.14	5,95	54556	5,27	Coagulación
731	ITI cadena pesada H4	ITIH4_HUMAN	165	-1,81	103357.43	6,51	51674	5,50	Inflamación
578a	Beta-Ala-His dipeptidasa	CNDP1_HUMAN	431	1,53	56692.06	5,14	56477	4,68	Proteólisis
578b	Vitronectina	VTNC_HUMAN	221	1,53	54305.59	5,55	56477	4,68	Inmunidad
578c	Alfa-1-antiquimotripsina	AACT_HUMAN	131	1,53	47650.87	5,33	56477	4,68	Inflamación
813	Fibrinógeno gamma	FIBG_HUMAN	182	-2,21	48483.03	5,24	49821	5,07	Coagulación
909a	Ceruloplasmina	CERU_HUMAN	173	-2,63	122205.19	5,44	45841	5,09	Transporte
909b	Apolipoproteína A-IV	APOA4_HUMAN	121	-2,63	45399.06	5,28	45841	5,09	Transporte
885	Proteína de unión a vitamina D	VTD_B_HUMAN	163	-1,88	52963.65	5,4	47522	5,17	Transporte
973	Hemopexina	HEMO_HUMAN	140	-2,37	51676.37	6,55	44297	5,42	Transporte
968	Proteína relacionada con el complemento factor H	FHR1_HUMAN	188	-3,19	35738.20	7,1	44400	5,56	Inflamación
955	Carboxipeptidasa N cadena catalítica	CBPN_HUMAN	228	-1,58	50034.39	6,88	44743	6,19	Peptidasa
942	Alfa-2-glicoproteína rica en leucina	A2GL_HUMAN	143	-2,01	34346.41	5,66	45326	4,47	Desconocida
1035	Kininógeno-1	KNG1_HUMAN	79	-1,71	69896.70	6,23	40969	4,53	Inflamación
1093	Heparina cofactor 2	HEP2_HUMAN	103	-1,51	54960.02	6,26	36234	4,64	Coagulación
1106	Complemento C1r	C1R_HUMAN	105	-1,75	78213.16	5,76	35445	5,13	Inflamación
1092	Apolipoproteína E	APOE_HUMAN	87	-1,80	34236.68	5,52	35960	5,38	Transporte
1087	Ficolina-3	FCN3_HUMAN	127	-1,83	32902.98	6,2	36612	5,68	Inmunidad
1088	Complemento factor H	CFAH_HUMAN	199	-1,93	137052.59	6,12	36509	5,83	Inmunidad
1091	Complemento factor H	CFAH_HUMAN	169	-1,78	137052.59	6,12	36268	5,99	Inmunidad
1254	Antitrombina-III	ANT3_HUMAN	138	-2,08	49039.14	5,95	21652	5,18	Coagulación
1247	Apolipoproteína A-I	APOA1_HUMAN	101	-2,68	28078.62	5,27	23333	5,48	Transporte
1276	Proteína de unión a retinol-4	RET4_HUMAN	80	-1,52	21071.60	5,27	17844	5,61	Transporte
1295	Kininógeno-1	KNG1_HUMAN	142	-2,37	69896.70	6,23	13452	4,68	Inflamación
1305	Kininógeno-1	KNG1_HUMAN	143	-2,37	69896.70	6,23	11016	4,82	Inflamación
1322	Apolipoproteína A-IV	APOA4_HUMAN	204	-2,97	45399.06	5,28	7173	4,74	Transporte
598a	Fibronectina	FINC_HUMAN	185	1,66	259562.86	5,4	55654	5,98	Inflamación
598b	Alfa-2-macroglobulina	A2MG_HUMAN	174	1,66	160809.88	5,98	55654	5,98	Coagulación

**Tabla R\_02.** Lista de proteínas identificadas en el experimento 2D-DIGE de pacientes con SCASEST frente a controles sanos. La tabla incluye el número identificativo de cada proteína, su nombre, su número de acceso en Uniprot, punto isoelectrico (PI) teórico y experimental, masa molecular (MW) teórica y experimental y puntuación obtenida en MASCOT (Prot score). También se indican su variación entre el grupo de pacientes y el grupo control (Ratio P/C) y su función.

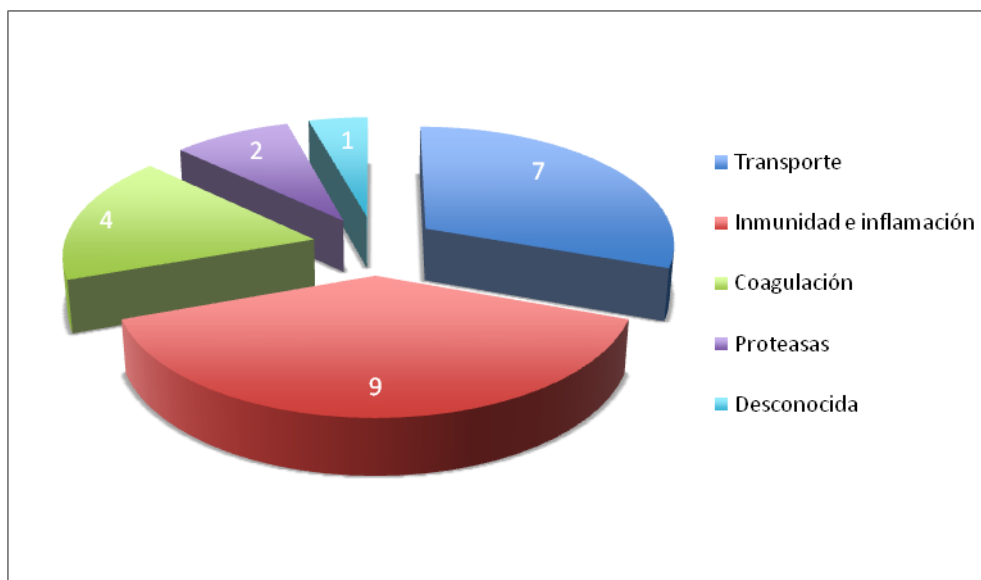
Por su parte las proteínas que se encontraron disminuidas en los pacientes con SCASEST fueron: complemento factor H, inter alfa tripsina inhibidor cadena pesada H4, fibrinógeno gamma, ceruloplasmina, proteína de unión a vitamina D, hemopexina, proteína relacionada con el complemento factor H, carboxipeptidasa N cadena catalítica, alfa-2-glicoproteína rica en leucina, kininógeno-1, complemento C1r, apolipoproteína E, ficolina-3, antitrombina III, apolipoproteína A-I, proteína de unión a retinol-4 y apolipoproteína A-IV. Cabe destacar la existencia de siete proteínas, inter alfa tripsina inhibidor cadena pesada H4, ceruloplasmina, complemento factor H, complemento C1r, alfa-1-antiquimotripsina, kininógeno-1 y apolipoproteína A-IV cuya expresión se encontraba alterada en más de una isoforma. Además encontramos cuatro

proteínas, inter alfa tripsina inhibidor cadena pesada H4, ceruloplasmina, kininógeno-1 y complemento C1r que se caracterizaban por presentar tanto isoformas aumentadas como disminuidas en pacientes con SCASEST.

### 1.2.6. Clasificación funcional de las proteínas

Las 23 proteínas identificadas se clasificaron según su función en seis categorías funcionales como refleja la Figura R\_07:

1. Transporte: ceruloplasmina, apolipoproteína A-IV, proteína enlazante de vitamina D, apolipoproteína E, apolipoproteína A-I, proteína de unión a retinol-4 y hemopexina.
2. Inflamación y respuesta inmune: vitronectina, ficolina 3, inter alfa tripsina inhibidor cadena pesada H4, complemento C1r, alfa-1-antiquimotripsina, kininógeno-1, proteína 1 relacionada con el complemento factor H, complemento factor H y fibronectina.
3. Coagulación: antitrombina III, fibrinógeno gamma, heparina cofactor 2, alfa-2-macroglobulina.
4. Proteasas: beta-Ala-His dipeptidasa, cadena catalítica de la carboxipeptidasa N.
5. Desconocida: Alfa-2-glicoproteína rica en leucina.



**Figura R\_07.** Clasificación de las 23 proteínas identificadas según su funcionalidad.

La clasificación de las 23 proteínas en los diferentes grupos funcionales (transporte, inmunidad e inflamación, coagulación, proteasas y desconocida) se realizó a partir de datos obtenidos de la base de datos Uniprot. Tan sólo en el caso de la alfa-2-glicoproteína rica en leucina, esta base de datos no contenía información acerca de su función biológica. Adicionalmente a su clasificación funcional, la Tabla R\_03 recoge una breve descripción de la función biológica indicada en la base de datos Uniprot para cada una de estas proteínas.

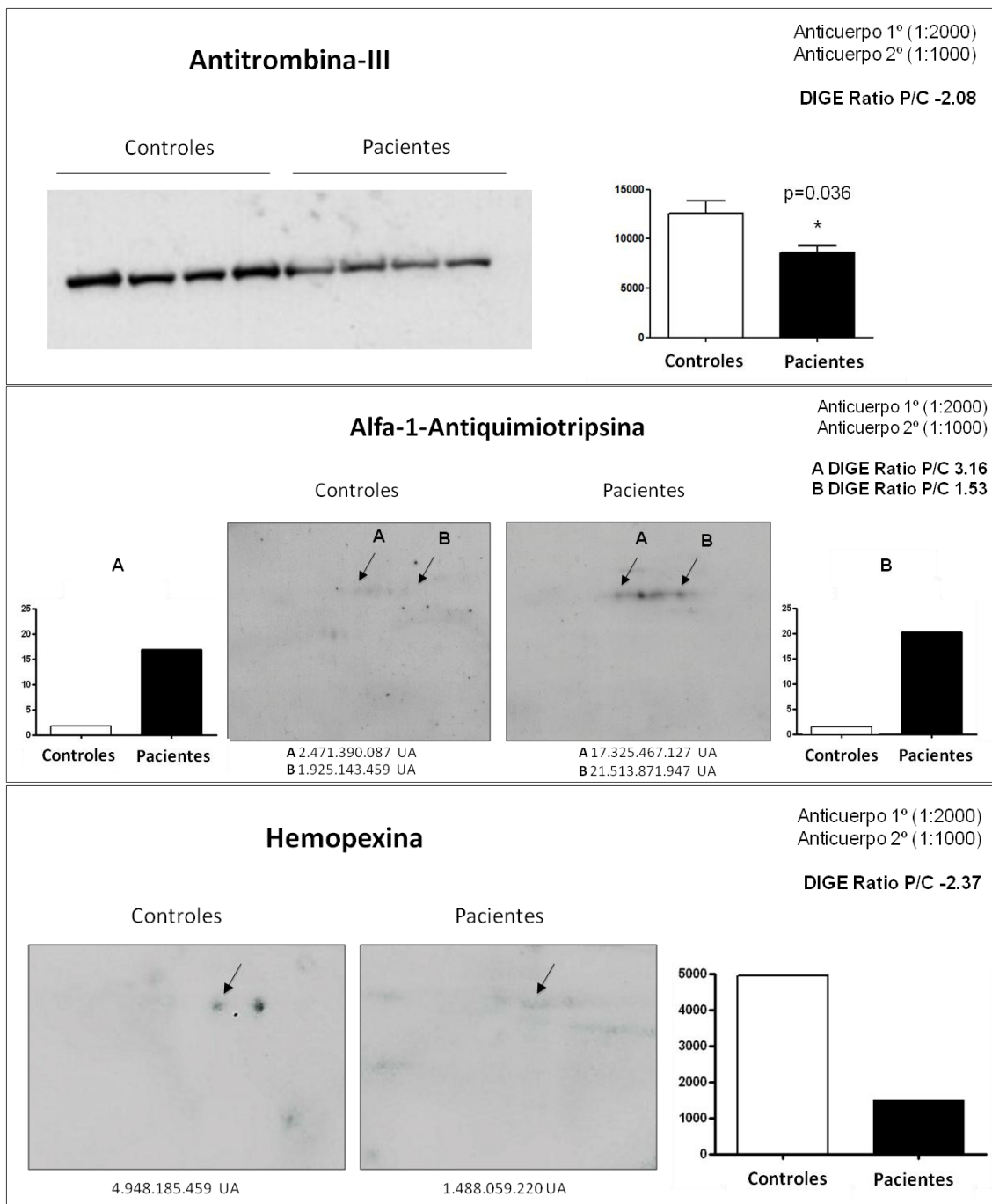
Proteína	Función Biológica
Ceruloplasmina	Glicoproteína transportadora de cobre en la sangre. Está además implicada en el transporte de hierro a través de la membrana celular
Complemento factor H	Cofactor en la inactivación de C3b por el factor I. También aumenta la velocidad de disociación del complejo C3-convertasa y el complejo C5 convertasa en la vía alternativa del complemento
Complemento C1r subcomponente	Serin proteasa que se combina con C1q y C1s para formar C1, el primer componente de la vía clásica del sistema del complemento
Alfa-1-antiquimotripsina	Pertenece al grupo de proteínas de fase aguda presentando niveles plasmáticos elevados en plasma en respuesta a procesos de inflamación. Su función principal se basa en controlar la actividad de las serinproteasas
Kininogeno-1	Inhibidor de tior proteasas, juega un papel importante en la coagulación de la sangre. Inhibe la trombina y la plasmina inducida por agregación de trombocitos
Antitrombina-III	Serina más importante en la regulación de la cascada de la coagulación sanguínea
Inter-alfa-inhibidor de la tripsina de la cadena pesada H4	Función fisiológica poco conocida. Puede estar implicada en las reacciones de fase aguda
Beta-Ala-His dipeptidasa	Participa en la hidrólisis de diversos dipéptidos
Vitronectina	Proteína relacionada con la adhesión y motilidad celular. Es reconocida por miembros de la familia de las integrinas y sirve como una molécula de adhesión célula-sustrato
Fibrinogeno gamma	Productor de monómeros que polimerizan en fibrina y cofactor en la agregación plaquetaria
Proteína de unión a vitamina D	Proteína multifuncional encontrada en plasma, fluido ascítico, fluido cerebroespinal, orina y en la superficie de muchos tipos de células. En el plasma, transporta a la vitamina D e impide la polimerización de la actina mediante la unión de sus monómeros
Hemopexina	Se liga al grupo hemo y lo transporta hacia el hígado, después de lo cual vuelve libre a la circulación
Proteína relacionada con el complemento factor H	Podría estar involucrada en la regulación del complemento. Se puede asociar con las lipoproteínas y puede desempeñar un papel en el metabolismo lipídico
Carboxipeptidasa N cadena catalítica	Protege el cuerpo de potentes péptidos vasoactivos e inflamatorios que contienen C-terminal de Arg o Lys (como cininas o anafilotoxinas) que son liberados a la circulación
Alfa-2-glicoproteína rica en leucina	Desconocida
Heparina cofactor 2	Inhibidor de trombina activada por los glucosaminoglicanos. También inhibe la quimotripsina.
Apolipoproteína E	Media la internalización y el catabolismo de las partículas de lipoproteínas
Ficolina-3	Posible función en la inmunidad innata a través de la activación de la vía del complemento lectina
Apolipoproteína A-I	Participa en el transporte inverso de colesterol de los tejidos al hígado para su excreción
Proteína de unión a retinol	Transporta retinol desde las reservas hepáticas a los tejidos periféricos. En el plasma, el complejo RBP-retinol interactúa con transtiretina impidiendo su pérdida por filtración a través de los glomérulos renales
Apolipoproteína A-IV	Componente importante de HDL y los quilomicrones. Puede tener un papel en la secreción de VLDL y los quilomicrones y su catabolismo
Fibronectina	Enlaza las superficies celulares y varios compuestos, incluyendo colágeno, fibrina, heparina, el ADN, y actina. Las fibronectinas están implicadas en la adhesión celular, la motilidad celular, opsonización, la curación de heridas, y el mantenimiento de la forma celular
Alfa-2-macroglobulina	Inhibidor de proteasas por un mecanismo de captura y escisión

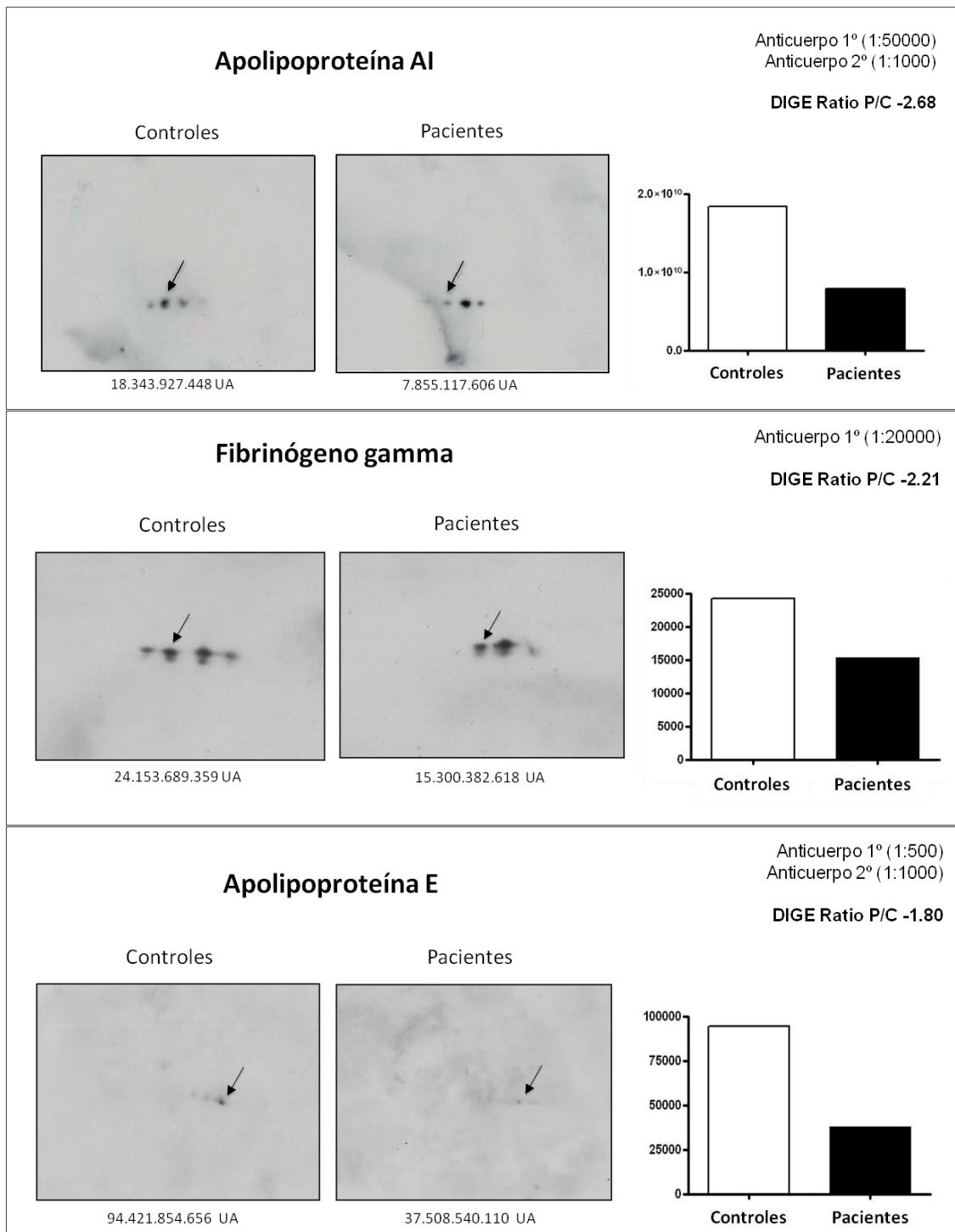
**Tabla R\_03.** Breve descripción de la función biológica de cada una de las proteínas diferencialmente expresadas en el experimento 2D-DIGE.

### 1.2.7. Validación de los resultados mediante inmunodetección

Para confirmar los datos obtenidos mediante electroforesis bidimensional diferencial de pacientes con SCASEST y controles sanos se empleó la técnica de inmunodetección. Para ello, se utilizó un grupo independiente de muestras tanto de pacientes con SCASEST como de controles sanos. Las proteínas validadas fueron:

- Inmunodetección unidimensional: antitrombina III.
- Inmunodetección bidimensional: hemopexina, apolipoproteína E, fibrinógeno gamma, alfa-1-antiquimiotripsina y apolipoproteína A-I.





**Figura R\_08.** Resultados de las inmunodetecciones en gel para confirmar alguno de los resultados obtenidos en el análisis 2D-DIGE. La inmunodetección unidimensional para la antitrombina III mostró bandas más intensas en los pacientes con SCASEST que en los controles sanos. Para la alfa-1-antiquimiotripsina, las dos isoformas diferencialmente alteradas en el experimento 2D-DIGE se encontraron también más intensas en los pacientes con SCASEST que en los controles sanos. En las inmunodetecciones para la hemopexina, apolipoproteína E, fibrinógeno gamma y apolipoproteína AI se detectaron manchas más intensas en los controles sanos que en pacientes con SCASEST. UA: unidades arbitrarias de absorción.

La antitrombina III se validó mediante inmunodetección unidimensional. El análisis de intensidad de las bandas mostró un aumento estadísticamente significativo en su

expresión en los pacientes con SCASEST frente a los controles sanos con un valor de significación  $p=0.036$  (Figura R\_08). En la inmunodetección bidimensional de la alfa-1-antiquimiotripsina se observaron varias isoformas de la proteína. Las dos isoformas que habían sido encontradas diferencialmente expresadas en el experimento 2D-DIGE estaban también aumentadas en pacientes con SCASEST en la inmunodetección. Además la magnitud de la variación de expresión observada en la validación fue acorde con el valor obtenido en el experimento 2D-DIGE (2.47).

Las proteínas apolipoproteína E y hemopexina fueron validadas mediante inmunodetección bidimensional y en ambos casos la inmunodetección confirmó los resultados obtenidos en el 2D-DIGE (-1.80 y -2.37, respectivamente) con disminuciones en la expresión de ambas proteínas en el grupo de pacientes con SCASEST frente al grupo control. En la proteína fibrinógeno gamma se encontraron en la inmunodetección varias isoformas, de las cuales la isoforma encontrada diferencialmente disminuida en el experimento 2D-DIGE (-1.58) presentó también unos niveles de expresión disminuidos en el grupo de pacientes con SCASEST confirmando los resultados experimentales obtenidos previamente. Lo mismo ocurrió con la apolipoproteína AI en la que se encontraron mediante inmunodetección bidimensional cuatro isoformas, de las cuales, la que se encontró diferencialmente disminuida en el experimento 2D-DIGE (-2.68) presentó niveles de expresión disminuidos en pacientes con SCASEST.

### **1.2.8. Validación de los resultados mediante SRM**

Para la comprobación mediante monitorización por reacción seleccionada (SRM) de algunos de los resultados obtenidos en el análisis 2D-DIGE, se utilizó otro grupo independiente de muestras de 15 pacientes con SCASEST y 15 controles sanos. Mediante el programa MRM pilot (AB Sciex), se realizó una digestión trípica de las proteínas y una fragmentación teórica de los péptidos trípticos. Las mejores parejas ión precursor/ión producto fueron seleccionadas en cada caso para generar la lista de las transiciones teóricas que posteriormente fueron utilizadas para realizar un experimento MIDAS (*MRM-initiated detection and sequencing*). Los métodos de adquisición MIDAS permiten obtener espectros de fragmentación de los iones que generan señales intensas en modo SRM. Los espectros MS/MS así obtenidos se utilizaron para confirmar que el ión precursor seleccionado se correspondía con las secuencias de los péptidos que se pretendían monitorizar.

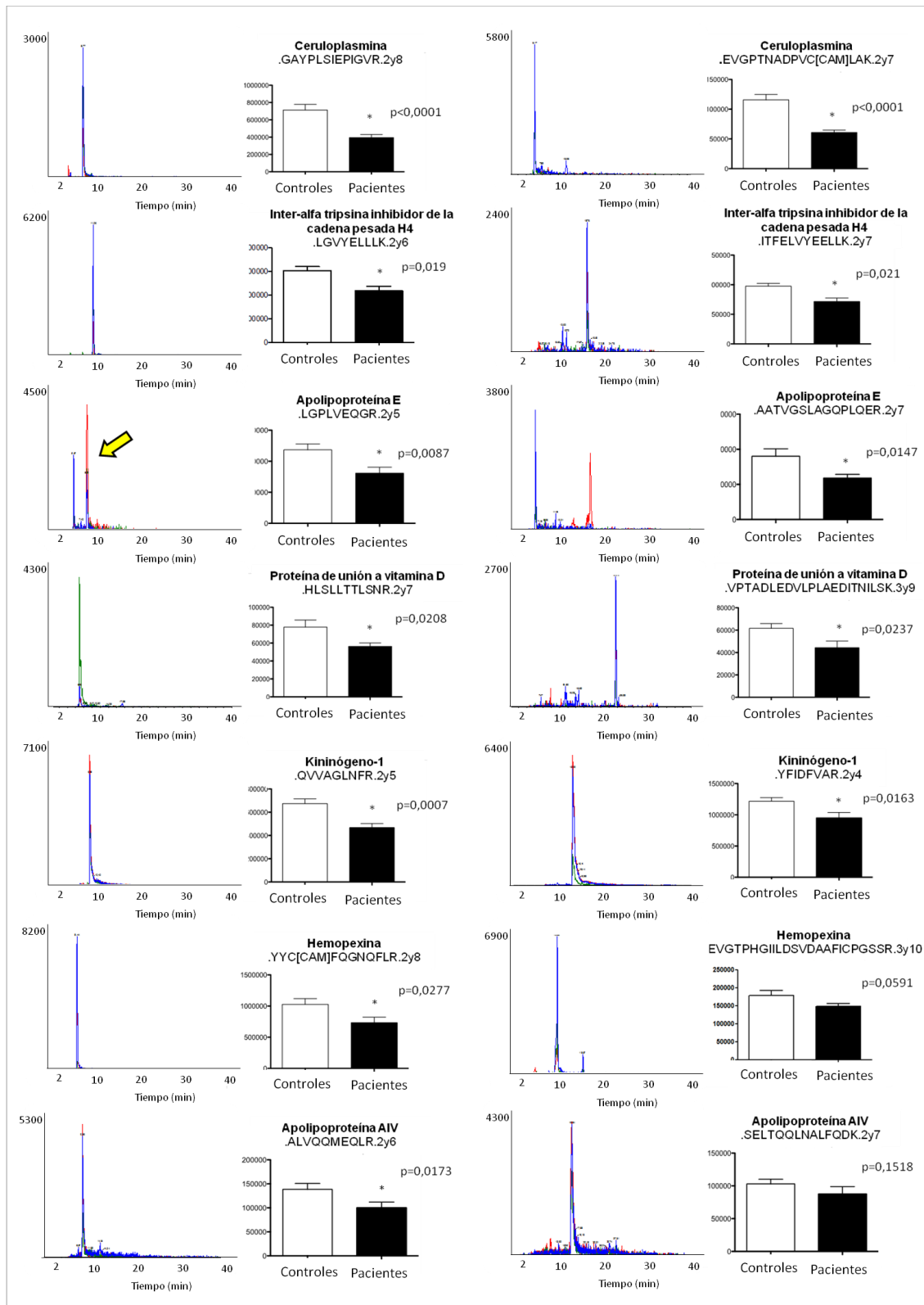
## Resultados

Proteína	Código de acceso	Péptido	Secuencia	Q1 (carga)	Q3 (ión fragmento)		
					T1	T2	T3
Apolipoproteína E	APOE_HUMAN	APOE_1	LGPLVEQGR	484,78	588,31	701,39	855,47
		APOE_2	AATVGSFLAGPLQER	749,40	827,44	898,47	1155,61
Alfa-2-macroglobulina	A2MG_HUMAN	A2MG_1	FEVQVTVPK	523,80	671,41	770,48	899,52
		A2MG_2	NEDSLVFEVQDK	697,84	836,45	1036,57	1151,59
Inter alfa tripsina inhibidor cadena pesada H4	ITIH4_HUMAN	ITIH4_1	LGVYELLK	524,33	778,47	877,54	934,56
		ITIH4_2	ITFELVYEELLK	748,92	893,50	1006,58	1135,62
Apolipoproteína A-I	APOA1_HUMAN	APOA1_1	DYVSQFEGSALGK	700,84	808,42	936,48	1023,51
		APOA1_2	VSFLSALEEYTK	693,86	853,43	940,46	1053,55
Apolipoproteína A-IV	APOA4_HUMAN	APOA4_1	ALVQQMEQLR	608,33	804,40	932,46	1031,53
		APOA4_2	SELTQQLNALFQDK	817,92	835,43	948,51	1076,57
Hemopexina	HEMO_HUMAN	HEMO_1	NFPSPVDAAFR	610,81	775,41	862,44	959,49
		HEMO_2	EWFWDLATGTMK	742,85	1022,50	1169,57	1355,65
Proteína de unión a vitamina D	VTDB_HUMAN	VTDB_1	HLSLLTTLNLR	627,86	804,46	917,54	1004,50
		VTDB_2	VPTADLEDVPLAEDITNLSK	789,43	1032,56	1053,55	1313,73
Ceruloplasmina	CERU_HUMAN	CERU_1	GAYPLSIEPIGVR	686,39	870,50	983,59	1080,64
		CERU_2	EVGPTNADPVCICAMJLAK	735,87	802,41	873,45	987,49
Vitronectina	VTNC_HUMAN	VTNC_1	FEDGVLDPPYPR	711,83	875,43	974,49	1031,52
		VTNC_2	DVWGIIEGPIDAAFTR	823,91	890,47	947,49	1076,54
Fibrinógeno gamma	FIBG_HUMAN	FIBG_1	YEASILTHDSSIR	746,38	815,40	1030,48	1199,64
		FIBG_2	YLQEIYNSNNQK	757,37	867,40	980,48	1109,52
Alfa-1-antiquimiotripsina	AACT_HUMAN	AACT_1	ITLLSALVETR	608,37	688,40	775,43	888,51
		AACT_2	LYGSEAFATDFQDSAAK	946,44	1053,48	1124,52	1271,59
Fibronectina	FINC_HUMAN	FINC_1	IYLYTLNDNAR	678,35	803,40	966,46	1079,55
		FINC_2	SYTITGLQPGTDYK	772,39	921,47	978,49	1079,54
Kininógeno 1	KNG1_HUMAN	KNG1_1	QVVAGLNFR	502,29	606,34	677,37	776,44
		KNG1_2	YFIDFVAR	515,77	492,29	720,40	867,47

**Tabla R\_04.** Lista de proteínas monitorizadas para la comprobación de los resultados obtenidos en el experimento 2D-DIGE de plasma deplecionado de pacientes con SCASEST frente a controles sanos. Se seleccionaron 2 péptidos para cada proteína, y se monitorizaron 3 transiciones por péptido. Q1, m/z seleccionada en el primer cuadrupolo y Q3, m/z seleccionada en el tercer cuadrupolo.

A partir de una muestra que contenía todas las proteínas, se realizó una digestión siguiendo los pasos descritos anteriormente y se analizó en el espectrómetro de masas 4000 QTRAP (AB Sciex) a través del método de adquisición MIDAS, el cual contenía transiciones teóricas de las proteínas de interés. Las transiciones fueron seleccionadas cuando los tres picos coeluyentes (que correspondían a las tres transiciones del mismo péptido) tenían una señal 5 veces más intensa que el ruido del experimento y los espectros de MS/MS se correspondían con el espectro teórico del péptido. Posteriormente, se comprobó que estas secuencias correspondían a péptidos proteotípicos. Se monitorizaron un total de tres transiciones SRM por péptido para cada muestra individual y dos péptidos por proteína.

En la Figura R\_09 se muestran los resultados del análisis estadístico realizado a los valores obtenidos en el análisis SRM de varias proteínas diferencialmente expresadas en el experimento 2D DIGE. Se recogen en esta figura ejemplos de una transición para cada uno de los dos péptidos monitorizados en el proceso de validación.



**Figura R\_09.** Validación mediante SRM de algunas de las proteínas diferencialmente expresadas en el experimento 2D-DIGE. Para cada proteína se muestra el cromatograma de una transición para cada uno de los dos péptidos proteotípicos seleccionados junto con la representación gráfica de los resultados de las cuantificaciones mediante SRM y el “valor  $p$ ” obtenido en el análisis estadístico mediante  $t$ -Student para dicha transición.

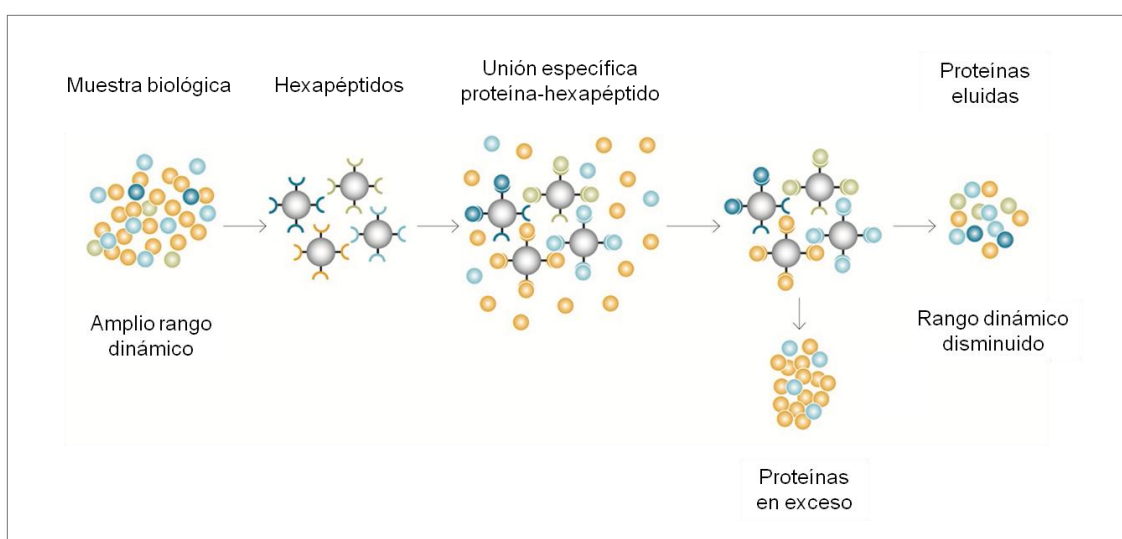
Las proteínas ceruloplasmina ( $p < 0.001$  y  $p < 0.001$ ), inter alfa tripsina inhibidor cadena pesada H4 ( $p = 0.019$  y  $p = 0.021$ ), apolipoproteína E ( $p = 0.0087$  y  $p = 0.0147$ ), proteína de unión a vitamina D ( $p = 0.0208$  y  $p = 0.0237$ ) y kininógeno-1 ( $p = 0.0007$  y  $p = 0.0163$ ), mostraron diferencias estadísticamente significativas en ambos péptidos tras realizar el análisis estadístico mediante *t-Student*.

Las proteínas hemopexina ( $p = 0.0277$  y  $p = 0.0591$ ) y apolipoproteína A-IV ( $p = 0.0173$  y  $p = 0.1518$ ), mostraron diferencias significativas en uno de los dos péptidos monitorizados. En el caso concreto de la hemopexina, el valor  $p$  para el péptido que no mostró diferencias significativas ( $p = 0.0591$ ) estaba muy cerca de la significación estadística, pero al validarse por inmunodetección (Figura R\_08) se aceptó su validación por SRM.

## 2. Análisis proteómico de plasma ecualizado en pacientes con SCASEST vs controles sanos

### 2.1. Ecualización de las proteínas mayoritarias del plasma

En este caso se empleó la tecnología ProteoMiner (BioRad), la cual permite la ecualización de las proteínas presentes en una muestra mediante la unión selectiva de las proteínas a sus hexapéptidos específicos, consiguiéndose la disminución del rango dinámico de concentración y permitiendo enriquecer la muestra de las proteínas menos abundantes. Nuestro objetivo era comprobar si se obtenía una mejora tanto en la metodología como en los resultados obtenidos con respecto a la columnas MARS Hu-14 y MARS Hu-6, o si eran técnicas complementarias.



**Figura R\_10.** La unión selectiva de las proteínas a los hexapéptidos específicos permite disminuir el rango dinámico de concentración permitiendo enriquecer la muestra de las proteínas menos abundantes.

## 2.2. Electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE)

Para llevar a cabo el estudio de expresión diferencial de proteínas en plasma ecualizado con la tecnología ProteoMiner en pacientes con SCASEST frente a controles sanos se llevó a cabo un análisis de 2D-DIGE que incluía cinco pacientes con SCASEST y cinco controles sanos. El diseño experimental de este estudio está detallado en la Tabla R\_05. Según este diseño, cada gel contiene dos muestras diferentes, un control sano, un paciente con SCASEST y un control interno que es un *pool* de todas las muestras incluidas en el estudio. Se prepararon un total de cinco geles de los que se obtuvieron 15 imágenes digitalizadas, 10 correspondientes a las muestras incluidas en el estudio y 5 a controles internos. Con el módulo de análisis diferencial en gel (DIA, Differential In-gel Analysis) del programa “DeCyder Differential Analysis Software” (GE Healthcare) versión 7.0, se realizó la co-detección de los puntos en cada gel y se llevó a cabo su emparejamiento con el resto de los geles y la normalización.

Replicados	Controles	Pacientes	
1	C5	P1	
2	C7	P15	
3	C16	P17	Cy2 estándar
4	C17	P20	Cy3
5	C20	P21	Cy5

GEL	Cy2 estándar	Cy3	Cy5
1	Pool	P21	C5
2	Pool	P20	C7
3	Pool	P17	C16
4	Pool	C17	P1
5	Pool	C20	P15

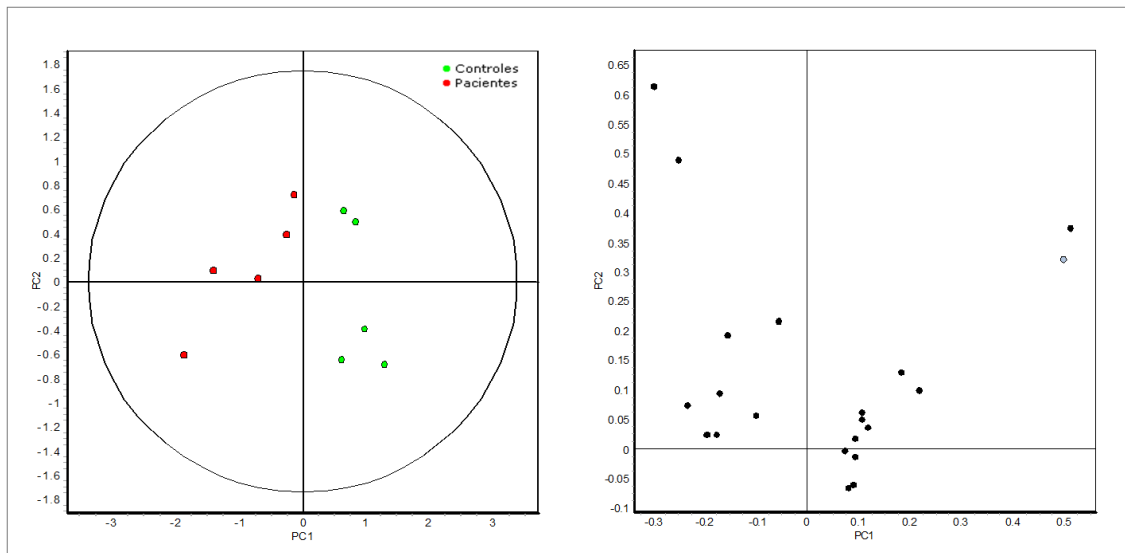
**Tabla R\_05.** Diseño experimental del análisis 2D-DIGE (n=5) de plasma ecualizado en pacientes con SCASEST frente a controles sanos.

### 2.2.1. Análisis Multivariante

Una vez importadas las imágenes de todos los geles al módulo DIA se detectaron 1682 manchas proteicas presentes en todos los geles del estudio. Se realizó una selección de datos para quedarnos únicamente con aquellas manchas proteicas cuya expresión diferencial fuese estadísticamente significativa. Para ello se realizó un análisis estadístico mediante una *t-Student* ( $p \leq 0.05$ ) y se establecieron dos criterios de exclusión: las manchas proteicas debían estar presentes en el 90% de los mapas proteicos, y el ratio medio debía ser igual o superior a  $\pm 1.5$ . Con estos criterios se obtuvieron 21 manchas proteicas diferenciales.

### 2.2.2. Análisis de Componentes Principales (ACP)

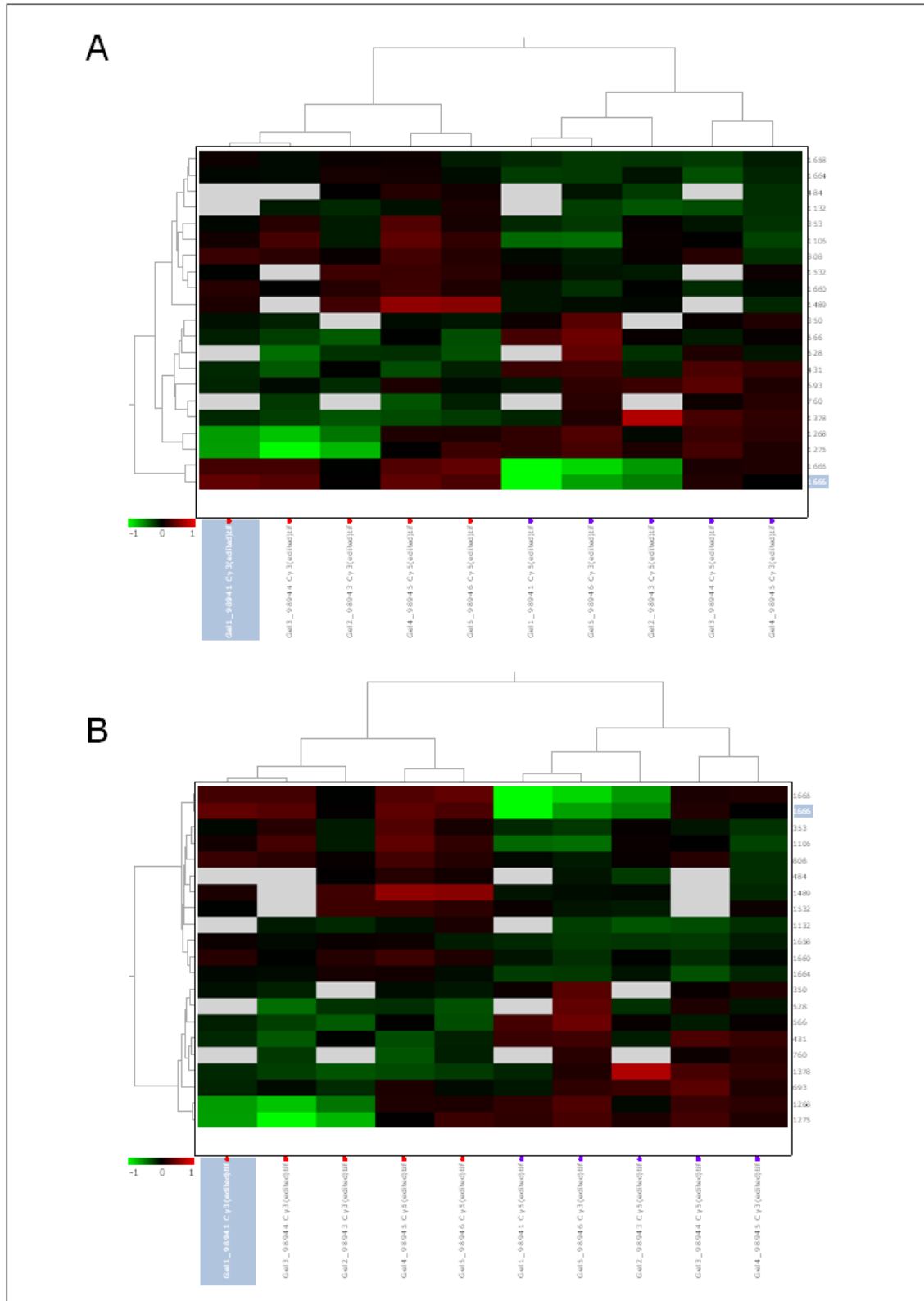
La Figura R\_11 muestra los resultados obtenidos tras el análisis de componentes principales (ACP) del conjunto de datos utilizado (15 muestras y 21 manchas proteicas con alteraciones estadísticamente significativas en sus niveles de expresión). En el gráfico de puntuación (izquierda) podemos observar que existe una correcta separación de los dos grupos objeto del estudio según la primera componente principal (PC1).



**Figura R\_11.** Resultados del análisis de componentes principales calculados tomando como variables las 21 manchas proteicas. En el gráfico de puntuación (izquierda) aparecen representadas las muestras. El gráfico de contribución (derecha) muestra la distribución de las manchas proteicas.

### 2.2.3. Análisis jerárquico

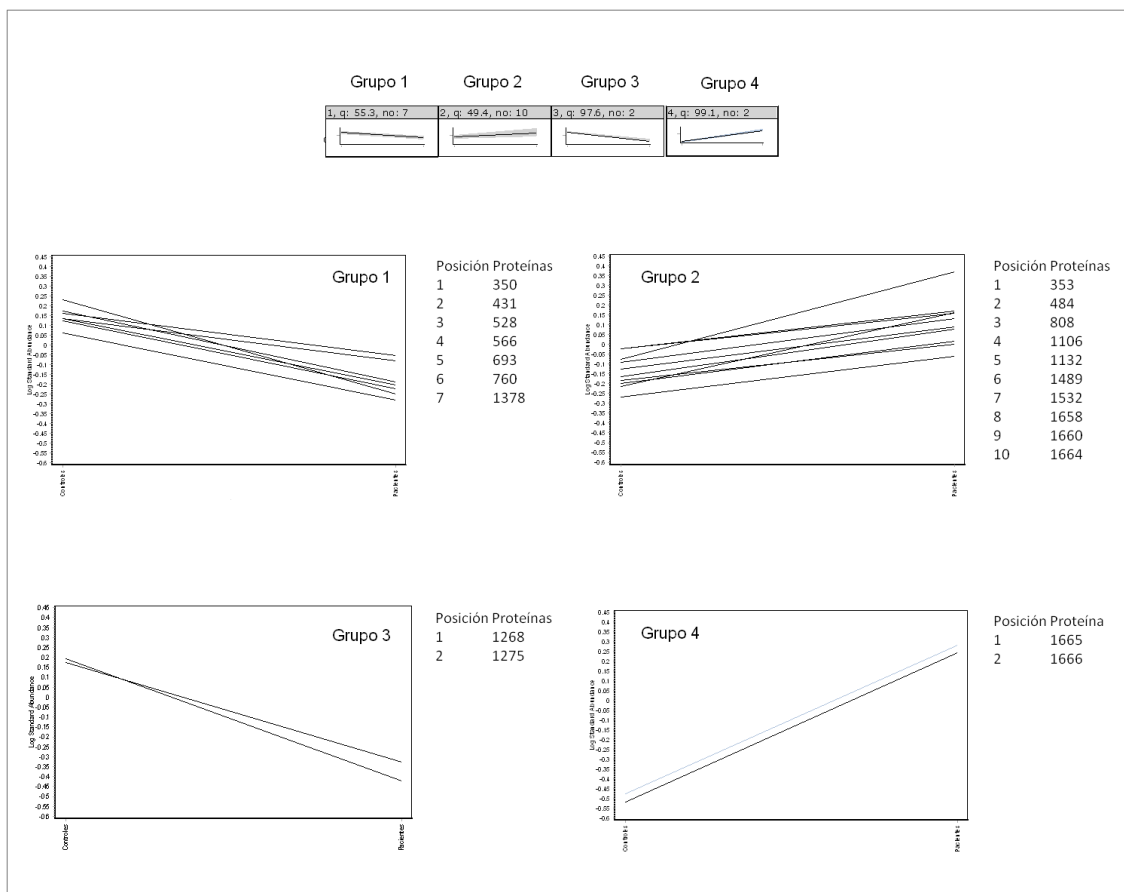
En este caso, en el análisis que utiliza la distancia euclídea para estimar la similitud (Figura R\_12A), se observa una correcta clasificación de los grupos experimentales: los controles (violeta) se sitúan a la derecha del panel, y los pacientes (rojo) se sitúan a la izquierda del panel. El dendrograma que clasifica las manchas proteicas muestra tres grandes grupos: uno bien diferenciado que agrupa 2 manchas proteicas (en el extremo inferior del panel) y otro grupo mayor que agrupa las 19 manchas proteicas restantes. Cuando utilizamos el coeficiente de Pearson como medida de la similitud (Figura R\_12B), en el dendrograma que representa las muestras aparecen de nuevo dos grupos que son prácticamente los mismos que en el caso anterior y en cuanto a las manchas proteicas, podemos observar que aparecen dos grupos más homogéneos entre sí agrupando 9 y 13 manchas proteicas cada uno.



**Figura R\_12.** Diagramas de calor obtenidos tras la clasificación jerárquica de los datos. El dendrograma horizontal muestra la clasificación de las muestras, mientras que el dendrograma vertical corresponde a las manchas proteicas. (A) Similaridad estimada mediante la distancia Euclídea. (B) Similaridad estimada mediante el coeficiente de Pearson.

### 2.2.4. Análisis de grupos de K-medias

En este caso el módulo de análisis de variación biológica (BVA) encontró en nuestro conjunto de datos cuatro categorías en las que repartió las 21 manchas proteicas según sus patrones de expresión (Figura R\_13). En los cuatro grupos se observaron perfiles de expresión muy homogéneos, especialmente en los grupos 3 y 4 que incluyeron dos manchas proteicas cada uno con valores “q” elevados (97.6 y 99.1 respectivamente). Los grupos 1 y 2 incluían 7 y 10 manchas proteicas con perfiles de expresión homogéneos como demuestra sus valores “q”, 55.3 y 49.4 respectivamente.



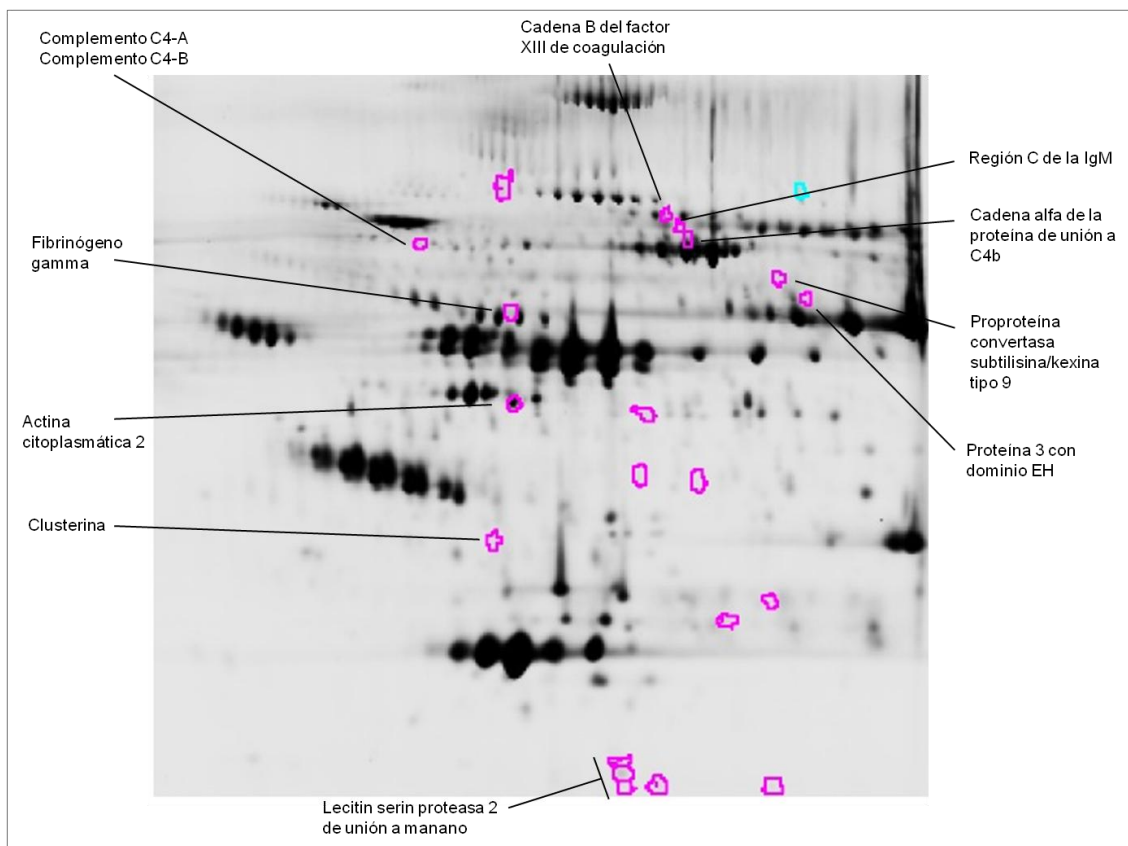
**Figura R\_13.** Resultados de la clasificación de k-medias. El programa encontró cuatro categorías (arriba, el cuadro de categorías muestra sus valores “q” y el número de manchas incluidas en cada una) en las que repartió las 21 manchas proteicas según sus patrones de expresión.

### 2.2.5. Identificación de las proteínas diferencialmente expresadas

De las 21 manchas proteicas diferencialmente expresadas que se obtuvieron del análisis estadístico, 12 estaban aumentadas en el grupo de pacientes con SCASEST y 9 estaban disminuidas. Para la identificación de las manchas proteicas se prepararon geles bidimensionales de 24 cm al 10% acrilamida, empleando tiras IPG pH 4-7, que se tiñeron con plata y se compararon los patrones de proteínas que fueron recortadas de los geles para su posterior digestión con tripsina y análisis por espectrometría de masas

mediante MALDI-TOF. En aquellos casos en los que se identificó la proteína queratina, esta fue considerada como contaminación debido a las manipulaciones de la muestra y no fue considerada como proteína que estuviese alterada como consecuencia de la enfermedad en estudio.

El análisis por espectrometría de masas de los diferentes digeridos enzimáticos de las manchas proteicas permitió la identificación de 12 de ellas que correspondieron a 11 proteínas diferentes de las cuales 4 estaban aumentadas en pacientes con SCASEST. La Figura R\_14 muestra el gel máster del experimento 2D-DIGE con los nombres de las proteínas identificadas cuyas características detalladas se incluyen en la Tabla R\_06.



**Figura R\_14.** Imagen del gel máster del experimento 2D-DIGE de plasma ecualizado mostrando las 21 manchas proteicas diferenciales y el nombre de las 11 proteínas que fueron identificadas.

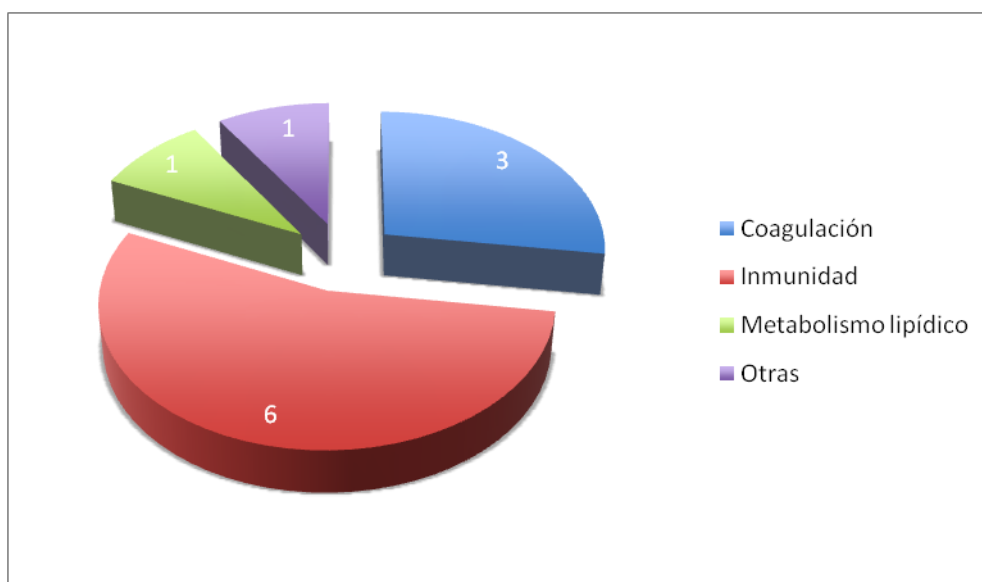
Nº de mancha	Proteína	Nº de acceso	Mascot score	Ratio P/C	MW teórico	PI teórico	MW exp (Da)	PI exp	Función
808	Fibrinógeno gamma	FIBG_HUMAN	339	1,52	48483.03	5,24	49566	5,34	Coagulación
1106	Actina citoplasmica 2	ACTG_HUMAN	170	2,29	41792.84	5.31	39251	5,25	Otras
566a	Complemento C4-A	CO4A_HUMAN	359	-2,31	84183.32	5.33	61239	5,17	Inmunidad
566b	Complemento C4-B	CO4B_HUMAN	367	-2,31	75459.31	5.05	61239	5,17	Inmunidad
1378	Clusterina	CLUS_HUMAN	89	-3,70	50062.56	5.89	26674	5,24	Inmunidad
431	Factor XIII de coagulación cadena B	F13B_HUMAN	240	-2,32	73206.80	5.94	66116	5,38	Coagulación
528	Proteína de unión a C4b cadena alfa	C4BPA_HUMAN	275	-2,42	61670.65	6.24	61370	5,4	Inmunidad
484	Región C de la IgM	IGHM_HUMAN	76	1,73	49306.59	6.35	64449	5,39	Inmunidad
760	Proteína 3 con dominio EH	EHD3_HUMAN	113	-2,18	60887.13	6.11	52595	5,49	Coagulación
693	Proteína convertasa subtilisin/kexin tipo 9	PCSK9_HUMAN	112	-1,68	57290.75	6.39	55292	5,47	Metabolismo lipídico
1658	Lecitina serina proteasa 2 de unión a manano	MASP2_HUMAN	226	1,54	74160.39	5.34	14466	5,34	Inmunidad
1660	Lecitina serina proteasa 2 de unión a manano	MASP2_HUMAN	165	1,67	74160.39	5.34	13982	5,34	Inmunidad
1664	Lecitina serina proteasa 2 de unión a manano	MASP2_HUMAN	208	1,61	74160.39	5.34	13542	5,34	Inmunidad

**Tabla R\_06.** Lista de proteínas identificadas en el experimento 2D-DIGE de plasma ecualizado en pacientes con SCASEST frente a controles sanos. La tabla incluye el número identificativo de cada proteína, su nombre, su número de acceso en Uniprot, punto isoeléctrico (PI) teórico y experimental, masa molecular (MW) teórica y experimental y puntuación obtenida en MASCOT (*Prot score*). También se indican su variación entre el grupo de pacientes y el grupo control (Ratio P/C) y su función.

### 2.2.6. Clasificación funcional de las proteínas

Las 11 proteínas identificadas se clasificaron según su función en cuatro categorías funcionales como refleja la Figura R\_15:

1. Coagulación: fibrinógeno gamma y factor XIII de coagulación cadena B.
2. Inflamación y respuesta inmune: complemento C4-A, complemento C4-B, proteína de unión a C4b cadena alfa, región C de la IgM y lecitina serina proteasa 2 de unión a manano.
3. Metabolismo lipídico: proproteína convertasa subtilisin/kexin tipo 9 y clusterina.
4. Otras: actina citoplasmática 2 y proteína 3 con dominio EH.



**Figura R\_15.** Clasificación de las 11 proteínas identificadas según su funcionalidad.

La clasificación de las 11 proteínas identificadas en los diferentes grupos funcionales (coagulación, inflamación y respuesta inmune, metabolismo lipídico y otras) se realizó a partir de datos obtenidos de la base de datos Uniprot. La Tabla R\_07 recoge una breve descripción de la función biológica indicada en esta base de datos para cada una de estas proteínas.

Proteína	Función Biológica
Fibrinógeno gamma	Productor de monómeros que polimerizan en fibrina y cofactor en la agregación plaquetaria
Actina citoplasmica 2	Proteína implicada en diversos tipos de motilidad celular que se expresa de forma ubicua en todas las células eucariotas
Complemento C4-A	Derivado de la degradación proteolítica del complemento C4, el complemento C4-A es un mediador del proceso inflamatorio local. Induce la contracción del músculo liso, aumenta la permeabilidad vascular y provoca la liberación de histamina de mastocitos y basófilos leucocitos.
Complemento C4-B	Derivado de la degradación proteolítica del complemento C4, el complemento C4-B es un mediador del proceso inflamatorio local. Induce la contracción del músculo liso, aumenta la permeabilidad vascular y provoca la liberación de histamina de mastocitos y basófilos leucocitos.
Clusterina	Evita el estrés inducido por la agregación de las proteínas del plasma de la sangre
Factor XIII de coagulación cadena B	La cadena B del factor XIII no es catalíticamente activo, pero se cree que estabiliza las subunidades A y regula la velocidad de formación de transglutaminasa por la trombina.
Proteína de unión a C4b cadena alfa	Controla la vía clásica de activación del complemento. Se une como un cofactor al inactivador C3b/C4b (C3bINA), que luego se hidroliza dando el fragmento C4b del complemento. También acelera la degradación del complejo C4bC2a (C3-convertasa) para disociar el fragmento C2a del complemento.
Resión C de la IgM	Los anticuerpos IgM juegan un papel importante en los mecanismos de defensa primarios. Están involucrados en el reconocimiento temprano de los invasores externos así como en el reconocimiento y la eliminación de las lesiones precancerosas y cancerosas
Proteína 3 con dominio EH	Juega un papel en el transporte endocítica
Proproteína convertasa subtilisin/kexin tipo 9	Podría estar implicada en la diferenciación de las neuronas corticales y también desempeñar un papel en la homeostasis del colesterol
Lecitina serina proteasa 2 de unión a manano	Proteasa sérica que juega un papel importante en la activación del sistema del complemento a través de la manosa-lectina. Después por auto-catalisis se escinde en C2 y C4, que conduce a su activación y a la formación de C3 convertasa.

**Tabla R\_07.** Breve descripción de la función biológica de cada una de las proteínas diferencialmente expresadas en el experimento 2D-DIGE de plasma ecualizado.

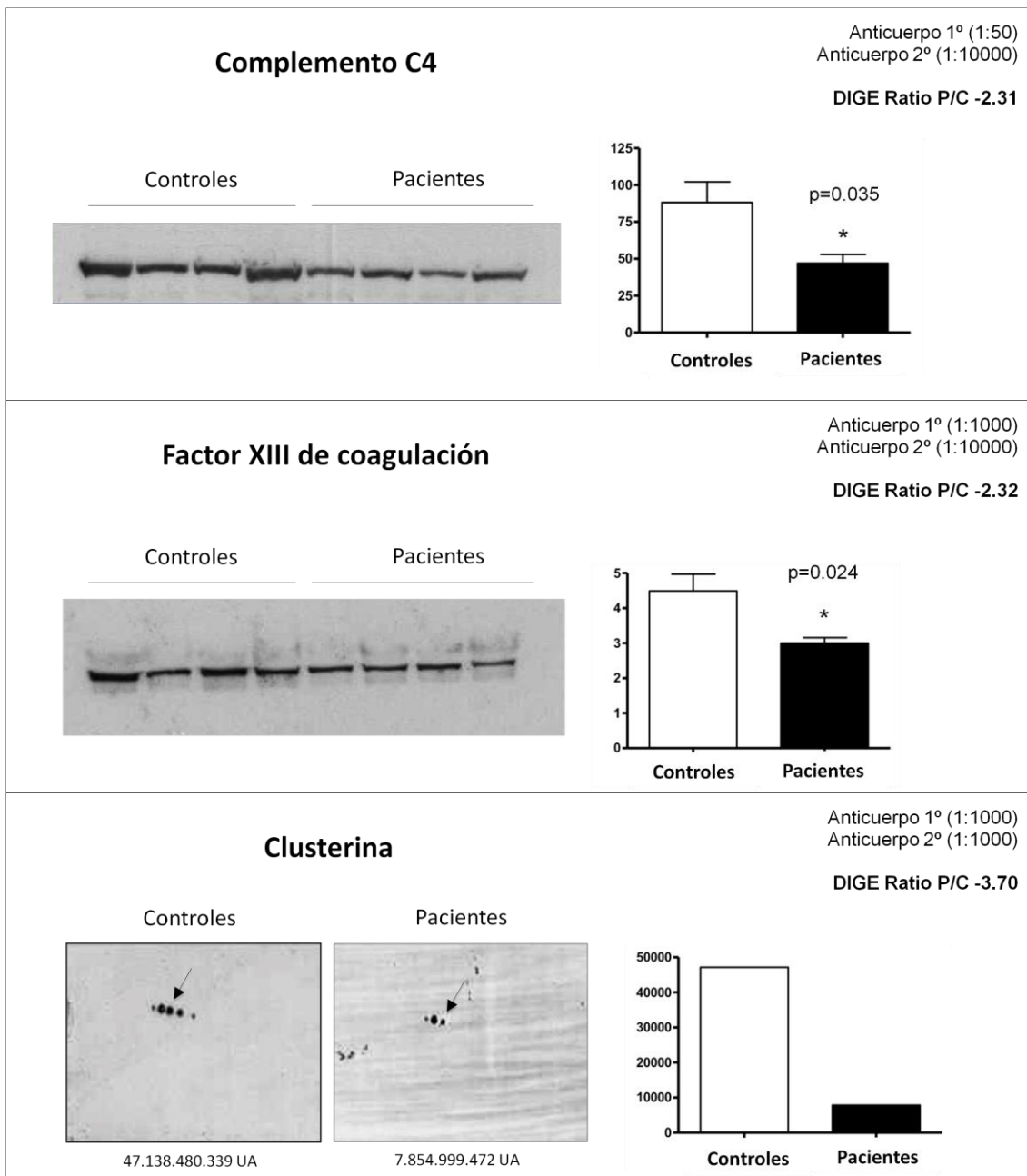
### 2.2.7. Validación de los resultados mediante inmunodetección

Para confirmar los datos obtenidos mediante electroforesis bidimensional diferencial se empleó la técnica de inmunodetección. Para ello, se utilizó un grupo independiente de muestras tanto de pacientes con SCASEST como de controles sanos. Las proteínas validadas fueron:

- Inmunodetección unidimensional: Complemento C4 y factor XIII de coagulación cadena B.
- Inmunodetección bidimensional: clusterina.

El complemento C4 y el factor XIII de coagulación cadena B se validaron mediante inmunodetección unidimensional. El análisis de intensidad de las bandas mostró, en ambos casos, un descenso estadísticamente significativo en su expresión en los pacientes con SCASEST frente a los controles sanos con un valor de significación

p=0.035 y p=0.024 respectivamente (Figura R\_16). En la inmunodetección bidimensional de la clusterina se observaron varias isoformas de la proteína. La isoforma que había sido encontrada diferencialmente expresada en el experimento 2D-DIGE estaba también disminuida en pacientes con SCASEST en la inmunodetección. Además la magnitud de la variación de expresión observada en la validación fue acorde con el valor obtenido en el experimento 2D-DIGE (-3.70).



**Figura R\_16.** Resultados de las inmunodetecciones en gel para confirmar los resultados obtenidos en el análisis 2D-DIGE. Las inmunodetecciones unidimensionales para el complemento C4 y el Factor XIII de coagulación mostraron bandas más intensas en los controles sanos que en los pacientes con SCASEST. Para la clusterina, la isoforma diferencialmente alterada en el experimento 2D-DIGE se encontró también más intensa en los controles sanos que en los pacientes con SCASEST. UA: unidades arbitrarias de absorción.

### 2.2.8. Validación de los resultados mediante SRM

Para la validación mediante monitorización por reacción seleccionada (SRM) de los resultados obtenidos en el análisis 2D-DIGE de plasma ecualizado, se utilizó un grupo independiente de muestras de 15 pacientes con SCASEST y 15 controles sanos. El procedimiento seguido para la validación fue el mismo que se describió con detalle en el apartado 1.2.8 de Resultados.

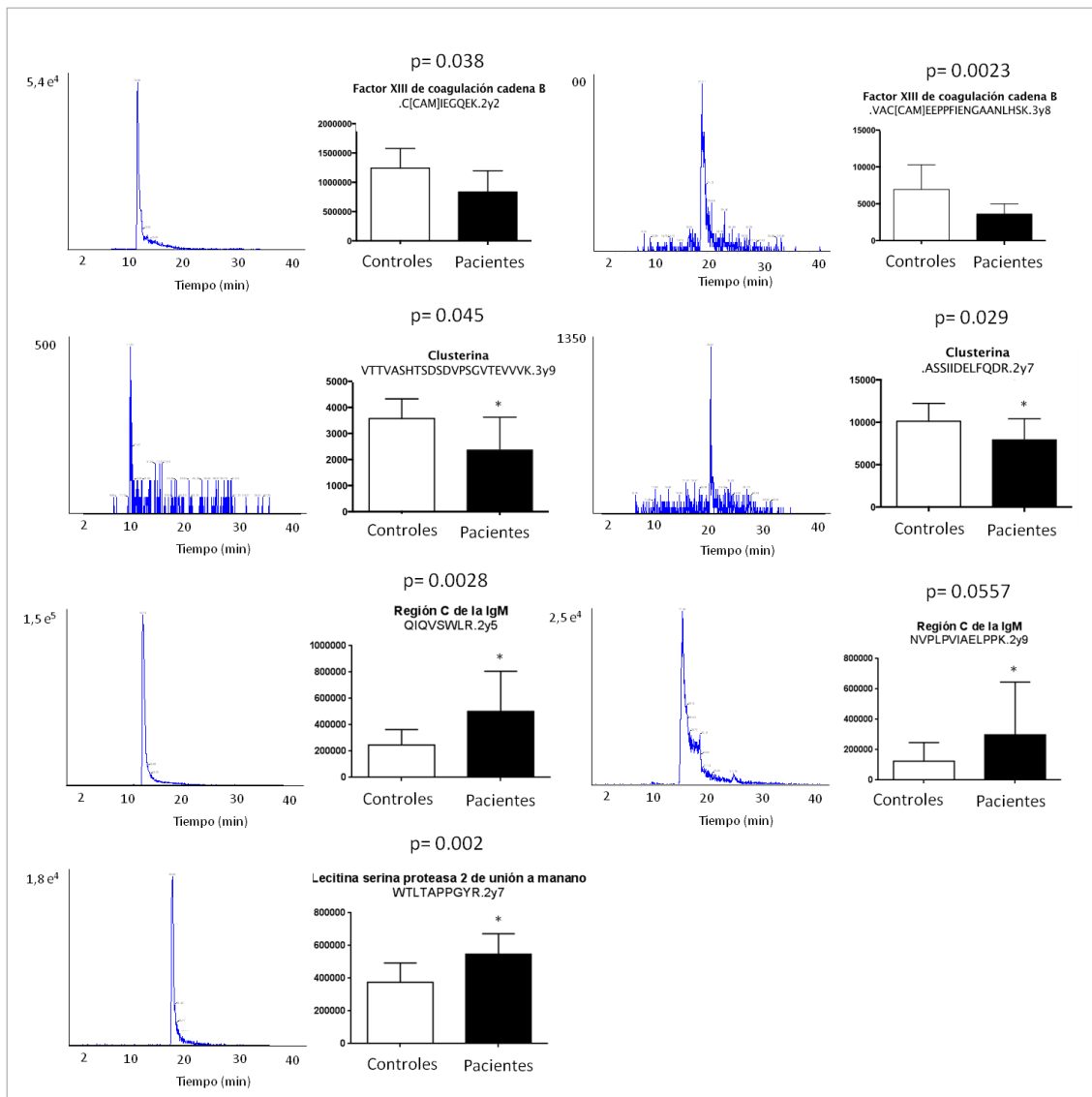
Proteína	Código de acceso	Péptido	Secuencia	Q1 (carga)	Q3 (ión fragmento)		
					T1	T2	T3
Factor XIII de coagulación cadena B	F13B_HUMAN	F13B_1	C[CA]MJI EGQEK	432,19	276,15	461,24	703,36
		F13B_2	VAC[CA]M]E EPPFIENGAANLHSK	695,00	797,43	1040,51	1300,66
Región C de la Ig M	IGHM_HUMAN	IGHM_1	QIQVSWLR	515,29	561,31	660,38	788,44
		IGHM_2	NVPLPVIAELPPK	693,92	341,22	963,59	1173,72
Lecitina serina proteasa 2 de unión a manano	MASP2_HUMAN	MASP2_1	WTLTAPPGYR	581,30	589,31	660,35	761,39
		MASP2_2	*				
Clusterina	CLUS_HUMAN	CLUS_1	ASSIDELFQDR	697,35	807,40	922,43	1035,51
		CLUS_2	VTTVASHTS DSDVPSGVTEVVVK	772,06	830,50	917,53	1014,58
Cadena alfa del complemento C4B	C4BPA_HUMAN	C4BPA_1	LSLEIEQLELQR	735,91	786,45	915,49	1028,57
		C4BPA_2	FSAIC[CA]M]QGGDTWSPR	791,35	875,40	1003,46	1163,49
Fibrinógeno gamma	FIBG_HUMAN	FIBG_1	YEASILTHDSSIR	746,38	815,40	1030,48	1199,64
		FIBG_2	YLQEIYNSNQK	757,37	867,40	980,48	1109,52
Proteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9	PCSK9_HUMAN	PCSK9_1	AGVVLVTAAGNFR	637,86	493,25	564,29	736,37
		PCSK9_2	*				

**Tabla R\_08.** Lista de proteínas monitorizadas para la validación de los resultados obtenidos en el experimento 2D-DIGE de plasma ecualizado de pacientes con SCASEST frente a controles sanos. Se seleccionaron 2 péptidos para cada proteína y se monitorizaron 3 transiciones por péptido. Q1, m/z seleccionada en el primer cuadrupolo y Q3, m/z seleccionada en el tercer cuadrupolo. En las proteínas lecitina serina proteasa 2 de unión a manano y proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 sólo se pudo monitorizar un péptido.

En la Figura R\_17 se muestran los resultados del análisis estadístico realizado a los valores obtenidos en el análisis SRM de varias proteínas diferencialmente expresadas en el experimento 2D DIGE. Se recogen en esta figura ejemplos de una transición para cada uno de los dos péptidos monitorizados en el proceso de validación.

Las proteínas factor XIII de coagulación ( $p=0.038$  y  $p=0.0023$ ) y clusterina ( $p=0.045$  y  $p=0.029$ ), mostraron diferencias estadísticamente significativas en ambos péptidos tras realizar el análisis estadístico mediante *t-Student* confirmando la disminución en la expresión de ambas proteínas obtenida en el experimento 2D-DIGE. Estas dos proteínas fueron también validadas mediante inmunodetección (Figura R\_16).

La proteína región C de la IgM mostró diferencias estadísticamente significativas en uno de los dos péptidos monitorizados, estando el valor  $p$  para el péptido que no mostró diferencias significativas muy cerca de la significación estadística ( $p=0.028$  y  $p=0.0557$ ). Por su parte, en el caso de la proteína lecitina serina proteasa 2 de unión a manano, sólo fue posible monitorizar un péptido, mostrando este diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.002$ ).



**Figura R\_17.** Validación mediante SRM de algunas de las proteínas diferencialmente expresadas en el experimento 2D-DIGE. Para cada proteína se muestra el cromatograma de una transición para cada uno de los dos péptidos proteotípicos seleccionados junto con la representación gráfica de los resultados de las cuantificaciones mediante SRM y el “valor  $p$ ” obtenido en el análisis estadístico mediante *t-Student* para dicha transición. En el caso de la proteína lecitina serina proteasa 2 de unión a manano, sólo fue posible monitorizar un péptido.

### 3. Análisis proteómico de plasma en pacientes con SCACEST vs controles sanos

Para completar el estudio proteómico de plasma, realizamos un experimento 2D-DIGE en individuos con SCACEST con el objetivo de descubrir si existía un perfil de proteínas comunes en ambos tipos de eventos coronarios o si por el contrario la mayor hipoxia a la cual se ve sometida el miocardio y la mayor extensión de necrosis tisular provocaban la existencia de un perfil proteómico característico.

### 3.1. Depleción de las proteínas mayoritarias del plasma

De manera análoga a proceso realizado para la depleción de las proteínas mayoritarias del plasma en el análisis proteómico en pacientes con SCASEST, se utilizó la columna de afinidad *Multiple Affinity Removal Column* (Agilent Technologies). Se juntaron las fracciones minoritarias de cada muestra y se realizó un cambio de tampón a bicarbonato amónico (AMBIC 65 mM) utilizando tubos concentradores para eliminar el tampón A, incompatible con el isoelectroenfoque por su alto contenido en sales. Finalmente, las muestras fueron cuantificadas por el método Bradford [174] y congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### 3.2. Electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE)

Para llevar a cabo el estudio de expresión diferencial de proteínas en pacientes con SCACEST frente a controles sanos se llevó a cabo un análisis de 2D-DIGE que incluía cinco pacientes con SCACEST y cinco controles sanos. El diseño experimental de este estudio está detallado en la Tabla R\_09. Según este diseño, cada gel contiene dos muestras diferentes, un control sano y un paciente SCACEST, y un control interno que es un *pool* de todas las muestras incluidas en el estudio. Se prepararon un total de cinco geles de los que se obtuvieron 15 imágenes digitalizadas, 10 correspondientes a las muestras incluidas en el estudio y 5 a controles internos. Con el módulo de análisis diferencial en gel (DIA, Differential In-gel Analysis) del programa “DeCyder Differential Analysis Software” (GE Healthcare) versión 7.0, se realizó la co-detección de los puntos en cada gel y se llevó a cabo su emparejamiento con el resto de los geles y la normalización.

#### 3.2.1. Análisis Multivariante

Una vez importadas las imágenes de todos los geles al módulo DIA se detectaron 1884 manchas proteicas presentes en todos los geles del estudio. Se realizó una selección de datos para quedarnos únicamente con aquellas manchas proteicas cuya expresión diferencial fuese estadísticamente significativa. Para ello se realizó un análisis estadístico mediante una *t-Student* ( $p \leq 0.05$ ) y se establecieron dos criterios de exclusión: las manchas proteicas debían estar presentes en el 90% de los mapas proteicos, y el ratio medio debía ser igual o superior a  $\pm 1.5$ . Con estos criterios se obtuvieron 24 manchas proteicas diferenciales.

Replicados	Controles	Pacientes
1	C1	P2
2	C7	P3
3	C16	P5
4	C17	P6
5	C18	P8

GEL	Cy2 estándar	Cy3	Cy5
1	Pool	C17	P2
2	Pool	C18	P3
3	Pool	C16	P5
4	Pool	P6	C1
5	Pool	P8	C7

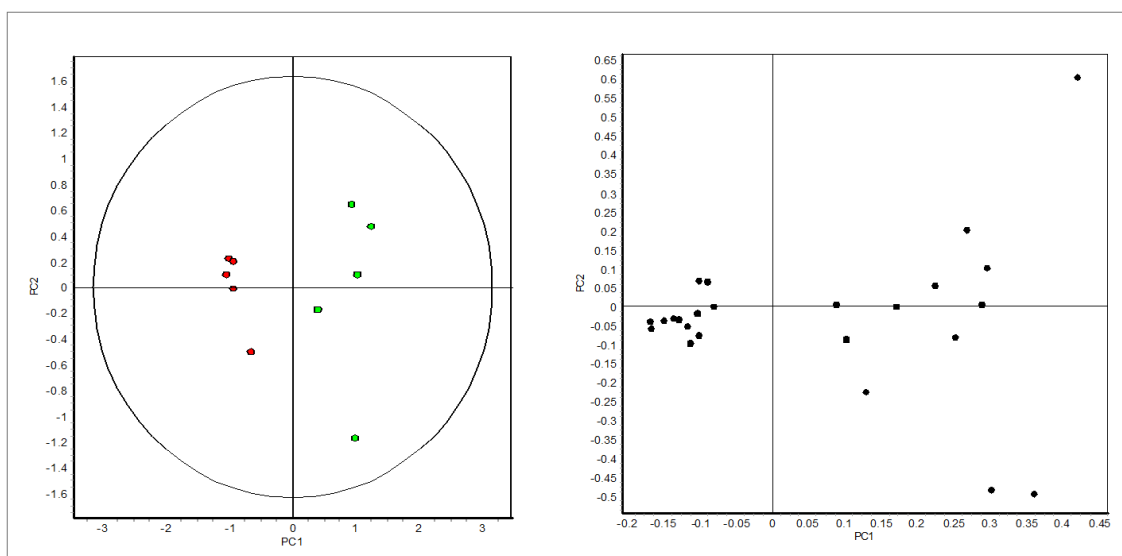
  

Cy2 estándar
Cy3
Cy5

**Tabla R\_09.** Diseño experimental del análisis 2D-DIGE (n=5) de plasma deplecionado de pacientes con SCACEST frente a controles sanos.

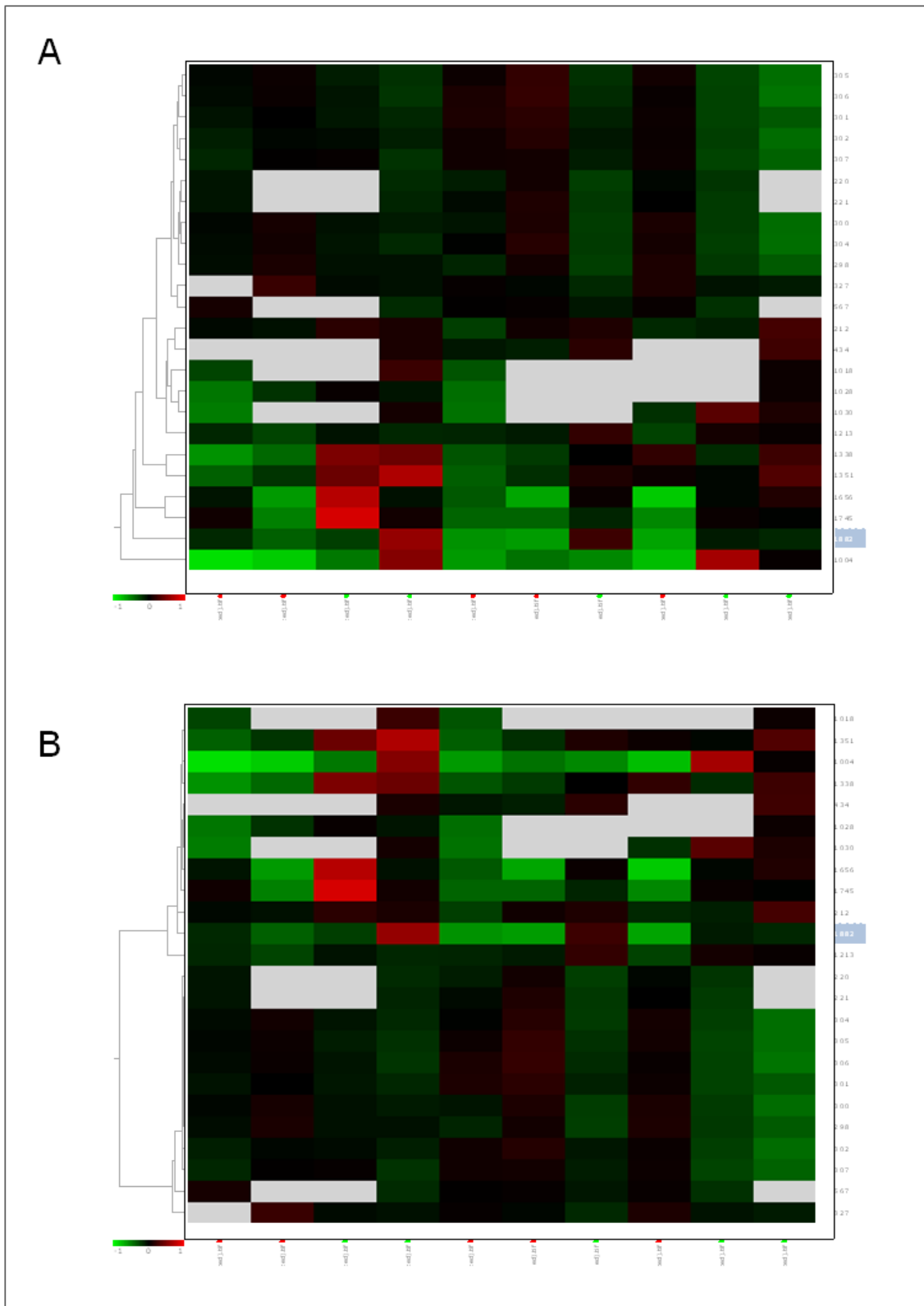
### 3.2.2 Análisis de Componentes Principales (ACP)

En la Figura R\_18 se muestran los resultados obtenidos tras el análisis de componentes principales (ACP) del conjunto de datos utilizado (15 muestras y 24 manchas proteicas con alteraciones estadísticamente significativas en sus niveles de expresión). En el gráfico de puntuación (izquierda) se puede observar como el análisis ACP mostró una correcta clasificación de los dos grupos experimentales objeto del estudio según la primera componente principal (PC1).



**Figura R\_18.** Resultados del análisis de componentes principales calculados tomando como variables las 24 manchas proteicas. En el gráfico de puntuación (izquierda) aparecen representadas las muestras. El gráfico de contribución (derecha) muestra la distribución de las manchas proteicas.

### 3.2.3. Análisis jerárquico



**Figura R\_19.** Diagramas de calor obtenidos tras la clasificación jerárquica de los datos. El dendrograma horizontal muestra la clasificación de las muestras, mientras que el dendrograma vertical corresponde a las manchas proteicas. (A) Similitud estimada mediante la distancia Euclídea. (B) Similitud estimada mediante el coeficiente de Pearson.

En el caso del experimento 2D-DIGE de pacientes con SCACEST frente a controles sanos, en el análisis que utiliza la distancia euclídea para estimar la similitud (Figura R\_19A), el dendrograma se observa una peor clasificación de los grupos experimentales que en los dos experimentos 2D-DIGE anteriores. El dendrograma que clasifica las manchas proteicas muestra dos grandes grupos: uno bien diferenciado que agrupa 1 mancha proteica (en el extremo inferior del panel) y otro grupo mayor que agrupa las 23 manchas proteicas restantes. Cuando utilizamos el coeficiente de Pearson como medida de la similitud (Figura R\_19B), en el dendrograma que representa las muestras se repite la clasificación obtenida mediante distancia euclídea y en cuanto a las manchas proteicas, podemos observar que aparecen dos grupos mucho más homogéneos (o más uniformes entre sí) que los obtenidos mediante clasificación euclídea agrupando 12 manchas proteicas cada uno.

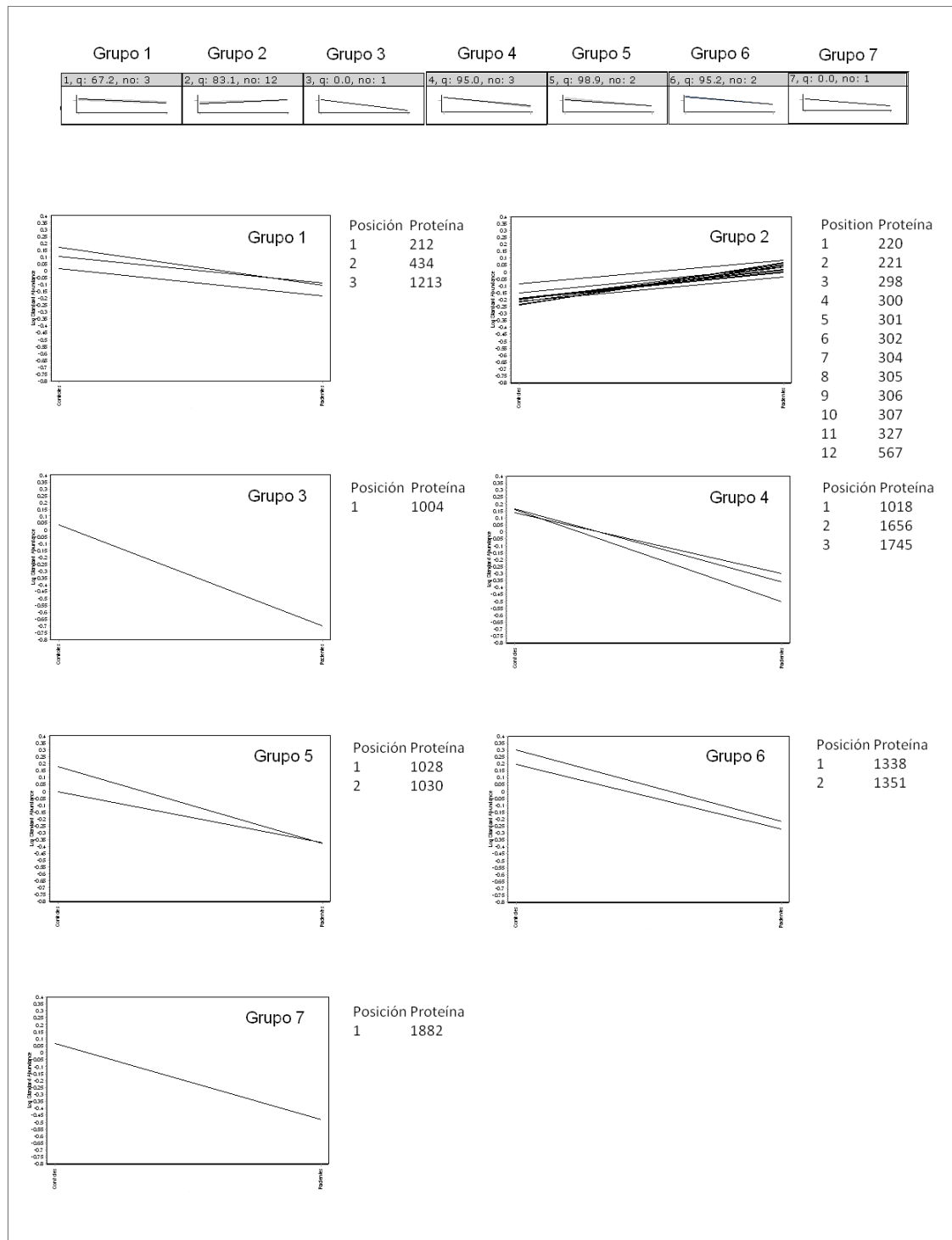
#### **3.2.4. Análisis de grupos de K-medias**

En el estudio de plasma de pacientes con SCACEST el módulo BVA encontró en nuestro conjunto de datos siete categorías diferentes en las que repartió las 24 manchas proteicas según sus patrones de expresión, como puede verse en la Figura R\_20. Los grupos 3 y 7 incluían una única mancha proteica mientras que el grupo 2 presentaba 12 manchas proteicas con perfiles de expresión muy homogéneos ( $q=83.1$ ) y cuyos niveles de expresión se encontraban elevados en los pacientes con SCACEST.

En los otros cuatro grupos restantes, el módulo BVA clasificó manchas proteicas cuyos niveles de expresión se encontraban disminuidos en pacientes con SCACEST y salvo en el caso del grupo 1 ( $q=67.2$ ), las manchas proteicas incluidas en los grupos 4, 5 y 6 presentaban perfiles de expresión muy homogéneos con valores  $q$  muy altos (95.0, 98.9 y 95.2, respectivamente).

#### **3.2.5. Identificación de las proteínas diferencialmente expresadas**

De las 24 manchas proteicas diferencialmente expresadas que se obtuvieron del análisis estadístico, 13 estaban aumentadas en el grupo de pacientes con SCACEST y 11 estaban disminuidas. Para la identificación de las manchas proteicas se prepararon geles bidimensionales de 24 cm al 10% de acrilamida, empleando tiras IPG pH 4-7, que se tiñeron con plata y se compararon los patrones de proteínas que fueron recortadas de los geles para su posterior digestión con tripsina y análisis por espectrometría de masas mediante MALDI-TOF.



**Figura R\_20.** Resultados de la clasificación de k-medias. Los gráficos correspondientes a cada grupo aparecen numerados. En cada uno de ellos aparecen representados los perfiles de expresión de las manchas proteicas pertenecientes al grupo, detalladas en la lista que aparece a la derecha de cada gráfico.

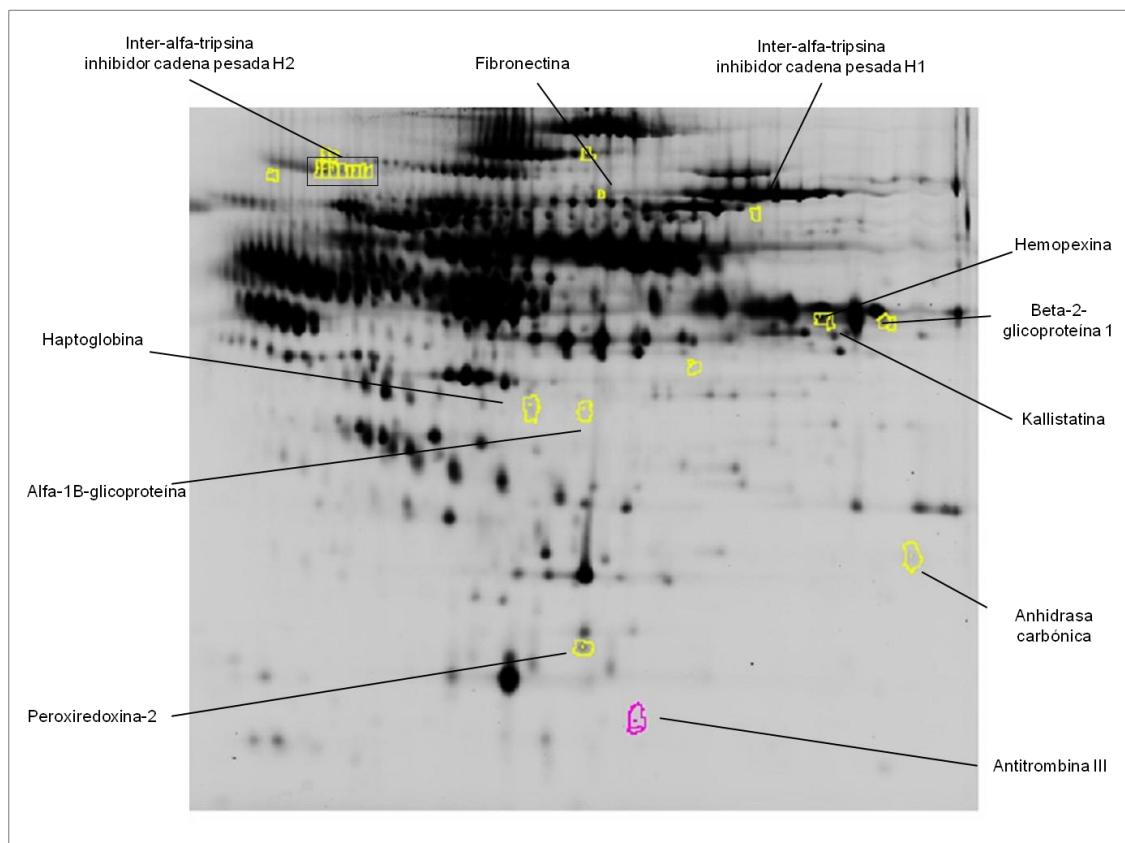
En aquellos casos en los que se identificó la proteína queratina, esta fue considerada como contaminación debido a las manipulaciones de la muestra y no fue considerada como proteína que estuviese alterada como consecuencia de la enfermedad en estudio.

El análisis por espectrometría de masas de los diferentes digeridos enzimáticos de las

manchas proteicas permitió la identificación de 18 de ellas que correspondieron a 11 proteínas diferentes de las cuales 2 estaban aumentadas en pacientes con SCACEST. La Figura R\_21 muestra el gel máster del experimento 2D-DIGE con los nombres de las proteínas identificadas cuyas características detalladas se incluyen en la Tabla R\_10.

Nº mancha	Proteína	Número de acceso	Mascot score	Ratio P/C	MW teórico (Da)	PI teórico	MW exp (Da)	PI exp	Función
298	ITI de la cadena pesada H2	ITIH2_HUMAN	143	1,58	72452.28	5,75	105156	4,61	Metabolismo
300	ITI de la cadena pesada H2	ITIH2_HUMAN	91	1,74	72452.28	5,75	104880	4,62	Metabolismo
301	ITI de la cadena pesada H2	ITIH2_HUMAN	81	1,76	72452.28	5,75	104605	4,7	Metabolismo
302	ITI de la cadena pesada H2	ITIH2_HUMAN	127	1,56	72452.28	5,75	104605	4,72	Metabolismo
304	ITI de la cadena pesada H2	ITIH2_HUMAN	169	1,87	72452.28	5,75	104605	4,64	Metabolismo
305	ITI de la cadena pesada H2	ITIH2_HUMAN	162	2,01	72452.28	5,75	104743	4,67	Metabolismo
306	ITI de la cadena pesada H2	ITIH2_HUMAN	114	1,97	72452.28	5,75	104468	4,69	Metabolismo
307	ITI de la cadena pesada H2	ITIH2_HUMAN	126	1,51	72452.28	5,75	104468	4,74	Metabolismo
434	Fibronectina	FINC_HUMAN	181	-1,9	259562.86	5,39	95790	5,35	Inflamación
567	ITI de la cadena pesada H1	ITIH1_HUMAN	123	1,53	71415.01	6,36	89463	5,75	Metabolismo
1338	Haptoglobina	HPT_HUMAN	107	-2,79	43349.01	6,13	44644	5,16	Homeostasis
1351	Alfa-1B-glicoproteína	A1BG_HUMAN	218	-3,64	51921.66	5,63	44003	5,3	Desconocida
1004	Hemopexina	HEMO_HUMAN	467	-8,9	49295.43	6,43	61518	5,92	Transporte
1028	Kallistatina	KAIN_HUMAN	107	-2,27	46355.24	7,88	61115	5,95	Inhibidor de proteasas
1018	Beta-2-glicoproteína 1 (ApoH)	APOH_HUMAN	80	-2,8	36254.60	8,37	61035	6,09	Coagulación
1745	Peroxiredoxina-2	PRDX2_HUMAN	131	-4,36	21760.73	5,67	18607	5,3	Anti-apoptosis
1882	Antitrombina-III	ANT3_HUMAN	100	-4,23	49039.14	5,95	14232	5,44	Coagulación
1656	Anhidrasa carbónica	CAH1_HUMAN	124	-5,02	28739.02	6,63	25844	6,17	Metabolismo

**Tabla R\_10.** Lista de proteínas identificadas en el experimento 2D-DIGE de plasma deplecionado en pacientes con SCACEST frente a controles sanos. PI: punto isoeléctrico; MW: masa molecular; ITI: inter-alfa-tripsina inhibidor.

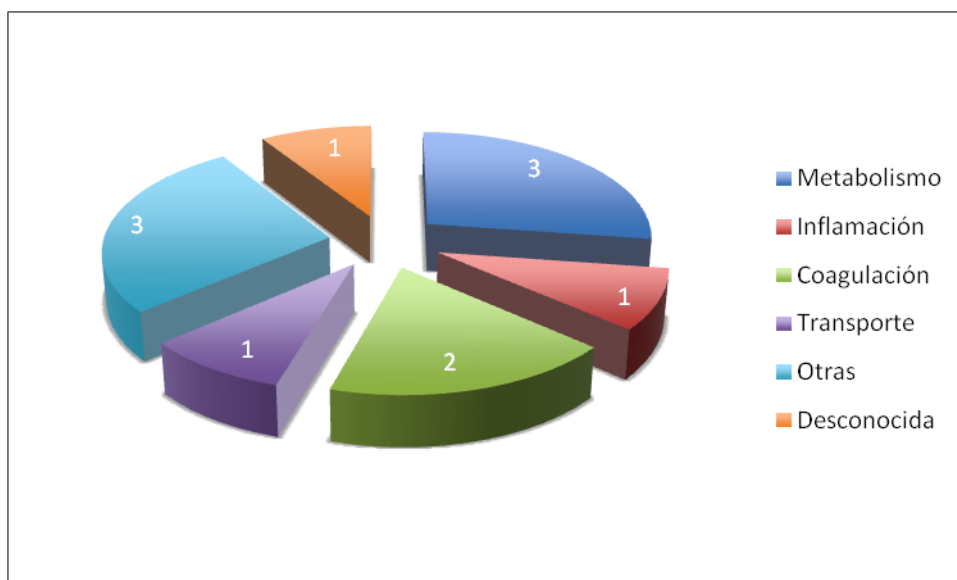


**Figura R\_21.** Imagen del gel máster del experimento 2D-DIGE de plasma deplecionado en pacientes con SCACEST mostrando las 24 manchas proteicas diferenciales y el nombre de las 11 proteínas que fueron identificadas correspondiente a 17 manchas proteicas.

### 3.2.6. Clasificación funcional de las proteínas

Las 11 proteínas identificadas se clasificaron según su función en seis categorías funcionales como refleja la Figura R\_22:

1. Metabolismo: Inter alfa tripsina inhibidor cadena pesada H2, Inter alfa tripsina inhibidor cadena pesada H1 y anhidrasa carbónica.
2. Inflamación y respuesta inmune: Fibronectina
3. Coagulación: Beta-2-glicoproteína 1 y antitrombina III.
4. Transporte: Hemopexina
5. Otras: Haptoglobina, kallistatina y peroxirredoxina 2.
6. Desconocida: Alfa-1B-glicoproteína.



**Figura R\_22.** Clasificación de las 11 proteínas identificadas según su funcionalidad.

La clasificación de las 11 proteínas identificadas en los diferentes grupos funcionales (metabolismo, inflamación y respuesta inmune, coagulación, transporte, otras y desconocida) se realizó a partir de datos obtenidos de la base de datos Uniprot. La Tabla R\_11 recoge una breve descripción de la función biológica indicada en esta base de datos para cada una de estas proteínas.

Proteína	Función biológica
Inter-alfa-inhibidor de la tripsina cadena pesada H2	Puede actuar como un portador de ácido hialurónico en el suero o como una proteína de unión entre hialuronano y proteína de la matriz, incluyendo aquellas que se unen a las superficies celulares de los tejidos para regular la localización, la síntesis y degradación de ácido hialurónico que son esenciales para las células sometidas a procesos biológicos.
Fibronectina	Enlaza las superficies celulares y varios compuestos, incluyendo colágeno, fibrina, heparina, el ADN, y actina. Las fibronectinas están implicadas en la adhesión celular, la motilidad celular, opsonización, la curación de heridas, y el mantenimiento de la forma
Inter-alfa-inhibidor de la tripsina cadena pesada H1	Puede actuar como un portador de ácido hialurónico en el suero o como una proteína de unión entre hialuronano y proteína de la matriz, incluyendo aquellas que se unen a las superficies celulares de los tejidos para regular la localización, la síntesis y degradación de ácido hialurónico que son esenciales para las células sometidas a procesos biológicos. Contiene además un péptido potencial que podría estimular un amplio espectro de células fagocíticas.
Haptoglobina	La haptoglobina se combina con la hemoglobina plasmática libre, participa en la prevención de pérdida de hierro a través de los riñones y la protección de los riñones de daños causados por la hemoglobina, al tiempo que la hemoglobina accesibles a las enzimas de degradación.
Alfa-1B-glicoproteína	No especificada
Hemopexina	Se liga al grupo hemo y lo transporta hacia el hígado para después volver libre a la circulación
Kallistatina	Inhíbe la actividad quinínogénica de Kalicreína tisular. La inhibición se consigue mediante la formación de un complejo equimolecular, calor y SDS-estable entre el inhibidor y la enzima, y la generación de un pequeño fragmento C-terminal del inhibidor debido a la escisión en el sitio reactivo por calicreína tejido.
Beta-2-glicoproteína 1 (ApoH)	Se liga a diversos tipos de sustancias cargadas negativamente tales como heparina, fosfolípidos, y sulfato de dextrano. Puede prevenir la activación de la cascada de coagulación de la sangre intrínseca mediante la unión a los fosfolípidos en la superficie de las células dañadas.
Peroxiredoxina-2	Implicada en la regulación redox de la célula. Reduce peróxidos con equivalentes reductores proporcionados a través del sistema de tiorredoxina. No es capaz de recibir electrones de glutaredoxina. Puede desempeñar un papel importante en la eliminación de peróxidos generados durante el metabolismo. Puede participar en las cascadas de señalización de factores de crecimiento y factor de necrosis tumoral-alfa mediante el control de las concentraciones intracelulares de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .
Antitrombina-III	Serina más importante en la regulación de la cascada de la coagulación sanguínea
Anhidrasa carbónica	Hidratación reversible del dióxido de carbono.

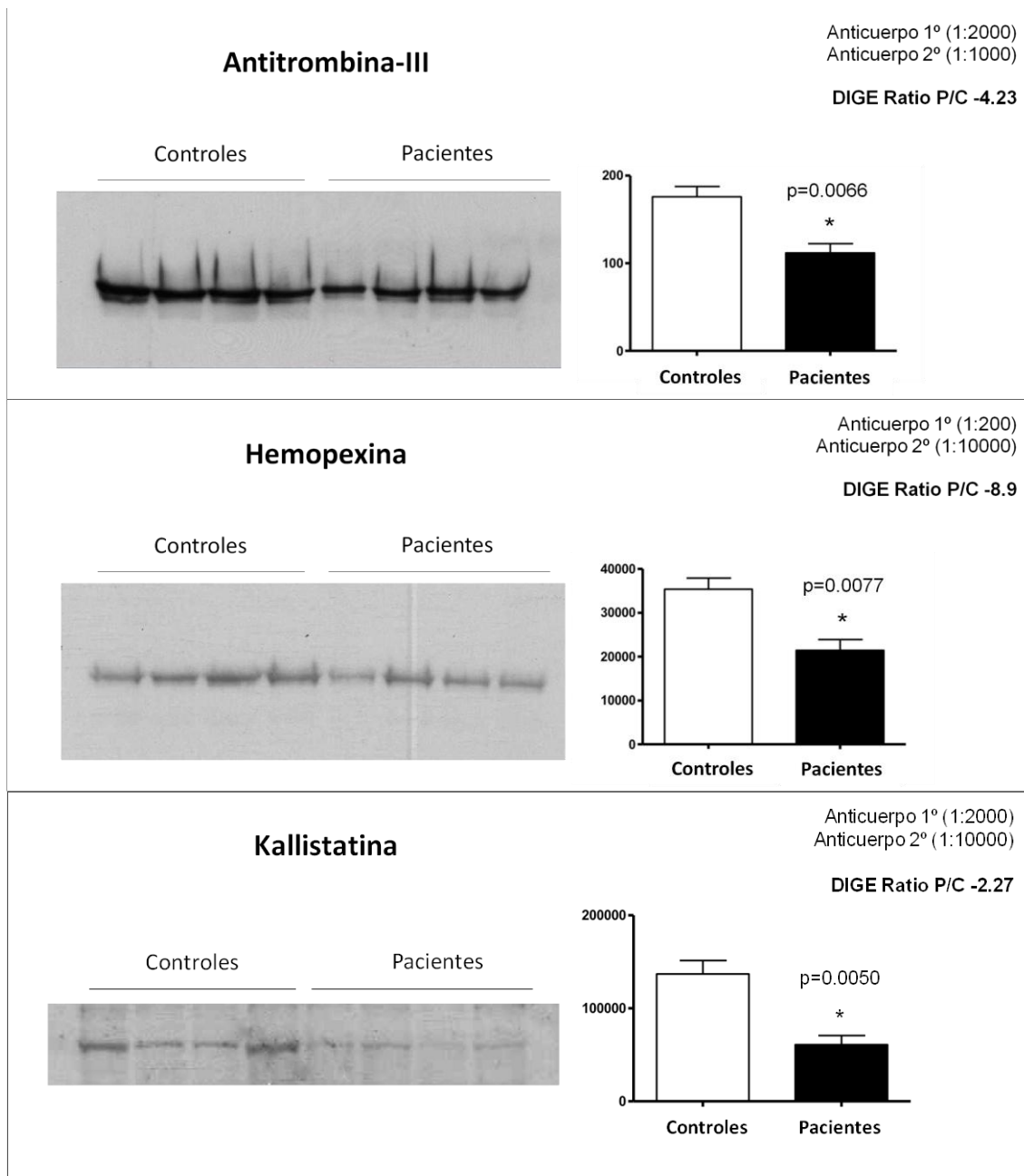
**Tabla R\_11.** Breve descripción de la función biológica de cada una de las proteínas diferencialmente expresadas en el experimento 2D-DIGE de plasma deplecionado en pacientes con SCACEST.

### 3.2.7. Validación de los resultados mediante inmunodetección

Para confirmar los datos obtenidos mediante electroforesis bidimensional diferencial se empleó la técnica de inmunodetección. Para ello, se utilizó un grupo independiente de muestras tanto de pacientes con SCACEST como de controles sanos. Las proteínas validadas fueron:

- Inmunodetección unidimensional: Antitrombina III, hemopexina y kallistatina.

El análisis de intensidad de las bandas para la antitrombina III, hemopexina y kallistatina mostró, en los tres casos, un descenso estadísticamente significativo en sus niveles de expresión en los pacientes con SCACEST frente a los controles sanos con valores de significación  $p=0.0066$ ,  $p=0.0077$  y  $p=0.0050$  respectivamente, confirmando de esta manera los resultados obtenidos en el experimento 2D-DIGE (Figura R\_23).



**Figura R\_23.** Resultados de las inmunodetecciones en gel para confirmar los resultados obtenidos en el análisis 2D-DIGE. Las inmunodetecciones unidimensionales para la antitrombina III, la hemopexina y la kallistatina, mostraron en los tres casos bandas más intensas en los controles sanos que en los pacientes con SCACEST.

### 3.2.8. Validación de los resultados mediante SRM

Para la validación mediante monitorización por reacción seleccionada (SRM) de algunos de los resultados obtenidos en el análisis 2D-DIGE de plasma ecualizado, se utilizó un grupo independiente de muestras de 15 pacientes con SCACEST y 15 controles sanos. El procedimiento seguido para la validación fue el mismo que se describió con detalle en el apartado 1.2.8 de Resultados.

## Resultados

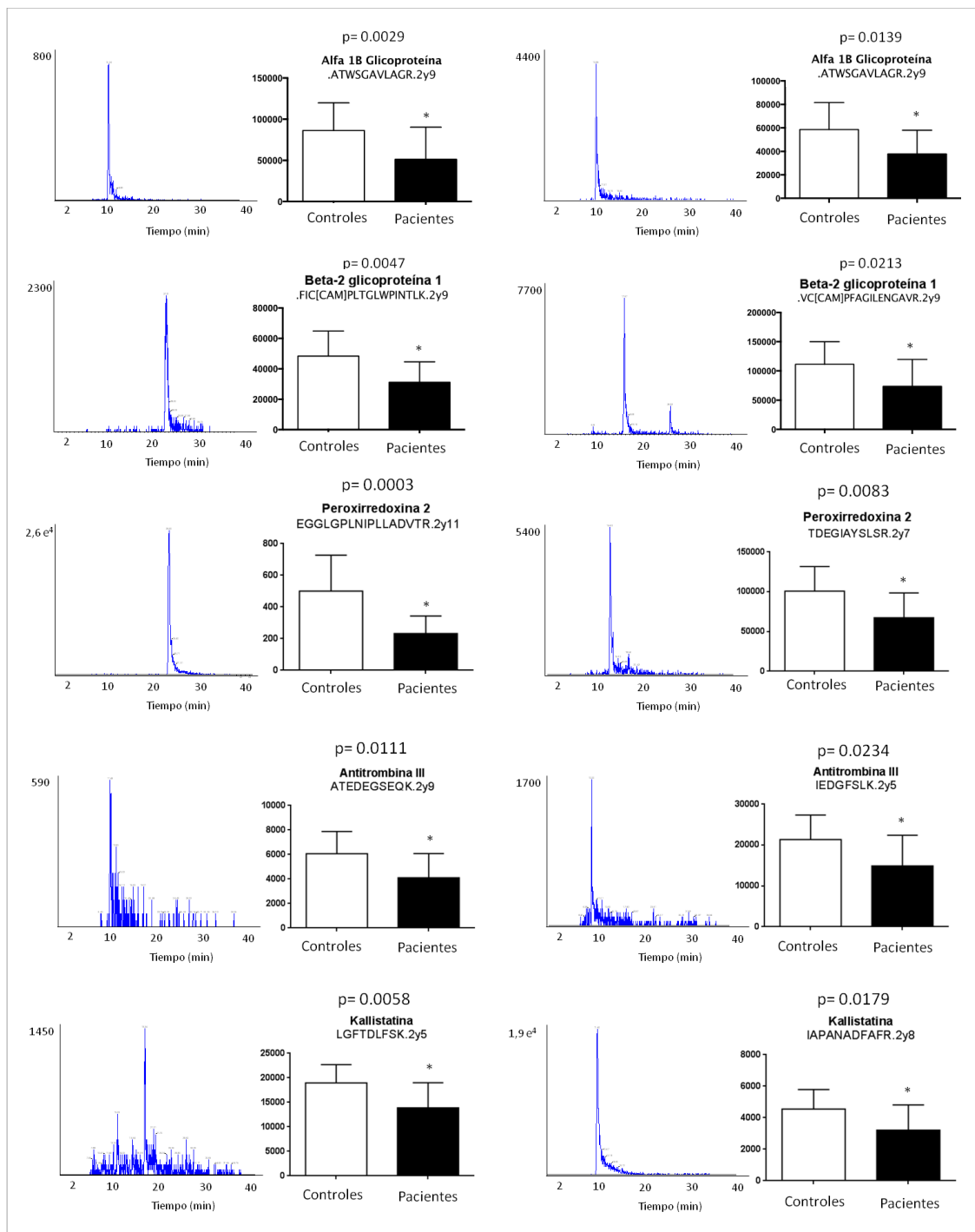
Proteína	Código de acceso	Péptido	Secuencia	Q1 (carga)	Q3 (ión fragmento)		
					T1	T2	T3
Alfa-1B-glicoproteína	A1BG_HUMAN	A1BG_1	GVTFLLR	403,25	401,29	548,36	649,40
		A1BG_2	ATWSGAVLAGR	544,79	643,39	730,42	916,50
Antitrombina III	ANT3_HUMAN	ANT3_1	IEDGFSLK	454,73	551,32	666,35	795,38
		ANT3_2	ATEDEGSEQK	547,23	404,21	921,38	1022,42
Haptoglobina	HPT_HUMAN	HPT_1	VGYSVSGWGR	490,75	562,27	661,34	881,43
		HPT_2	VTSIQDWVQK	602,32	803,40	916,49	1003,52
Kallistatina	KAIN_HUMAN	KAIN_1	LGFTDLFSK	514,27	609,32	710,37	914,46
		KAIN_2	IAPANADFAFR	596,80	840,40	911,44	1008,49
Inter alfa tripsina inhibidor cadena pesada H1	ITIH1_HUMAN	ITIH1_1	LDAQASFLPK	545,30	591,35	662,39	861,48
		ITIH1_2	EVAFDLEIPK	580,81	599,38	714,40	932,50
Peroxirredoxina 2	PRDX2_HUMAN	PRDX2_1	TDEGIAYSLSR	606,30	696,37	809,45	866,47
		PRDX2_2	EGGLGPLNIPLADVTR	867,99	997,60	1111,65	1224,73
Hemopexina	HEMO_HUMAN	HEMO_1	NFPSPVDAAFR	610,81	775,41	862,44	959,49
		HEMO_2	YYC[CAM]FQGNQFLR	748,34	1009,52	1169,55	1332,62
Inter alfa tripsina inhibidor cadena pesada H2	ITIH2_HUMAN	ITIH2_1	FYNQVSTPLL	669,36	785,49	913,55	1027,59
		ITIH2_2	IQPSGGTNINEALLR	791,93	1157,63	1244,66	1341,71
Beta-2-glicoproteína 1	APOH_HUMAN	APOH_1	VC[CAM]PFAGILENGAVR	751,89	928,52	999,56	1243,68
		APOH_2	FIC[CAM]PLTGLWPINTLK	886,99	685,42	1041,61	1352,79

**Tabla R\_12.** Lista de proteínas monitorizadas para la validación de los resultados obtenidos en el experimento 2D-DIGE de pacientes con SCACEST frente a controles sanos. Se seleccionaron 2 péptidos para cada proteína y se monitorizaron 3 transiciones por péptido. Q1, m/z seleccionada en el primer cuadrupolo y Q3, m/z seleccionada en el tercer cuadrupolo.

En la Figura R\_24 se muestran los resultados del análisis estadístico realizado a los valores obtenidos en el análisis SRM de varias proteínas diferencialmente expresadas en el experimento 2D DIGE. Se recogen en esta figura ejemplos de una transición para cada uno de los dos péptidos monitorizados en el proceso de validación.

Las proteínas alfa 1B glicoproteína ( $p=0.0029$  y  $p=0.0139$ ), beta-2 glicoproteína 1 (apo H) ( $p=0.0047$  y  $p=0.0213$ ), peroxirredoxina 2 ( $p=0.0003$  y  $p=0.0083$ ), antitrombina III ( $p=0.0111$  y  $p=0.0234$ ) y kallistatina ( $p=0.0058$  y  $p=0.0179$ ), mostraron diferencias estadísticamente significativas en ambos péptidos tras realizar el análisis estadístico mediante *t-Student* confirmando en todos los casos la disminución en la expresión de estas proteínas en el grupo de pacientes con SCACEST obtenida en el experimento 2D-DIGE.

En el caso de las proteínas antitrombina III y kallistatina, los resultados obtenidos en el experimento 2D-DIGE fueron validos mediante inmunoafinidad y SRM.



**Figura R\_24.** Validación mediante SRM de algunas de las proteínas diferencialmente expresadas en el experimento 2D-DIGE. Para cada proteína se muestra el cromatograma de una transición para cada uno de los dos péptidos proteotípicos seleccionados junto con la representación gráfica de los resultados de las cuantificaciones mediante SRM y el “valor p” obtenido en el análisis estadístico mediante *t-Student* para dicha transición.

#### **4. Análisis metabolómico de plasma en pacientes con SCACEST vs controles sanos**

Como se indicó anteriormente en el apartado 2.2.3 de Material y Métodos, el análisis metabolómico de plasma, tanto completo como de ácidos grasos, se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de gases 6890N (Agilent Technologies) unido a un detector de masas de cuadrupolo simple 5975c (Agilent Technologies). Para el análisis de plasma completo las condiciones de reacción empleadas fueron las indicadas en el método desarrollado por Moritz et al. [186] con pequeñas modificaciones. Sin embargo, en la bibliografía es posible encontrar distintos reactivos para la protección de grupos carbonilos, así como para llevar a cabo la reacción de derivatización [164, 183-185]. Por ello, antes de iniciar el estudio metabolómico del plasma quisimos conocer bajo nuestras condiciones experimentales cuales eran los reactivos de protección y de derivatización más adecuados para nuestros objetivos.

##### **4.1. Comparativa de reactivos de protección y derivatización**

Siguiendo las condiciones de reacción establecidas en el método desarrollado por Moritz et al. [186] y explicadas detalladamente en el apartado 2.2.2 de Material y Métodos, procedimos a comparar los resultados obtenidos cuando se utilizaron como reactivo para la protección de grupos carbonilo, el hidrocloreuro de hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OHHCl}$ ) e hidrocloreuro de metoxiamina ( $\text{CH}_3\text{ONH}_2\text{HCl}$ ) y como reactivos de derivatización N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida con 1% trimetilclorosilano (BSTFA+1% TMCS) y N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida con 1% trimetilclorosilano (MSTFA+1% TMCS). Los resultados obtenidos para cada una de las cuatro combinaciones posibles de reactivos se recogen en la Tabla R\_13.

Considerando las identificaciones llevadas a cabo en cada uno de los experimentos por separado sobre la misma muestra, se identificaron un total de 90 picos cromatográficos correspondientes a 72 metabolitos diferentes (Figura R\_25). El número de metabolitos identificados según la combinación del reactivo de protección y de derivatización utilizada fueron:

- $\text{NH}_2\text{OHHCl}$ /BSTFA+1% TMCS: 52 metabolitos.
- $\text{NH}_2\text{OHHCl}$ /MSTFA+1% TMCS: 59 metabolitos.
- $\text{CH}_3\text{ONH}_2\text{HCl}$ /MSTFA+1% TMCS: 60 metabolitos.
- $\text{CH}_3\text{ONH}_2\text{HCl}$ /BSTFA+1% TMCS: 69 metabolitos.

Metabolito	TR (min)	NH <sub>2</sub> OHHC/BSTFA	NH <sub>2</sub> OHHC/MSTFA	CH <sub>3</sub> OHHC/MSTFA	CH <sub>3</sub> OHHC/BSTFA
Piruvato	5.295			x	x
Lactato	5.494	x	x	x	x
Glicolato I	5.733	x	x	x	x
Glicolato II	5.775		x		
Valina I	5.914	x	x	x	x
Alanina	6.249	x	x	x	x
Glicina I	6.563			x	x
Ácido 2-OH-butírico	6.753		x	x	x
Oxalato I	6.834	x	x	x	x
Oxalato II	7.026			x	x
Ácido 3-OH-propanoico	7.072	x	x		
Piruvato II	7.258		x		
Ácido 3-OH-ibutirico	7.433	x		x	x
Ácido alfa-OH-valérico	7.558	x			x
Leucina I	7.283	x		x	
Leucina II	7.727		x	x	x
Ácido 2-ceto-3-metilvalérico	8.390			x	x
Ácido 2-ceto-isocáprico	8.692			x	x
Valina II	8.755		x	x	x
Urea I	9.244	x	x	x	x
Ácido metilmalónico	9.387	x			x
Urea II	9.533	x	x	x	x
Serina I	9.763		x	x	x
Ácido octanoico	9.934	x			
Leucina III	10.194	x		x	x
Acetoacetato	10.631		x	x	x
Treonina I	10.750			x	
Isoleucina	10.772	x			x
Glicina II	11.051		x	x	x
Succinato	11.211	x	x		x
Glicerato	11.906	x	x	x	x
Ácido nonanoico	12.517	x			
Serina II	12.716	x	x	x	x
Treonina II	13.482	x	x	x	x
Ácido 3-OH-propanodioico	13.607			x	
Ácido glutárico	13.859	x			x
Ácido metilglutárico	14.005	x			
Ác. 2,4-hidroxi-butanoico	14.189		x	x	x
Ácido decanoico	14.339	x	x		
Ác. 3,4-dihidroxi-butanoico	14.777		x	x	x
Ác. 2-isopropil-3-ceto-butírico	15.027			x	x
Ácido aspártico	15.496	x		x	x
Eritrosa	15.540			x	x
Ácido aminomalónico	15.779	x	x	x	x
Norvalina	16.460		x		x
5-Oxo-Prolina I	16.797	x	x		
5-Oxo-Prolina II	17.032		x	x	x
4-OH-Prolina	17.348	x		x	x
Ácido aspártico II	17.460		x		x
Fenilalanina	17.567	x	x	x	x
Ácido Treónico	18.184		x	x	x
Ác. eritrónico + Prolina	18.642		x		x
Ácido eritrónico	18.674	x	x		
Ác. 2-amino-heptanodioico	19.743		x	x	x
Fenilalanina II	19.906		x		x

**Tabla R\_13.** Tabla comparativa de los metabolitos identificados utilizando las diferentes combinaciones de reactivo de protección de grupos carbonilo y reactivo de derivatización. Entre las cuatro combinaciones posibles, el uso de CH<sub>3</sub>ONH<sub>2</sub>HCl y BSTFA+1%TMCS permitió identificar el mayor número de metabolitos.

## Resultados

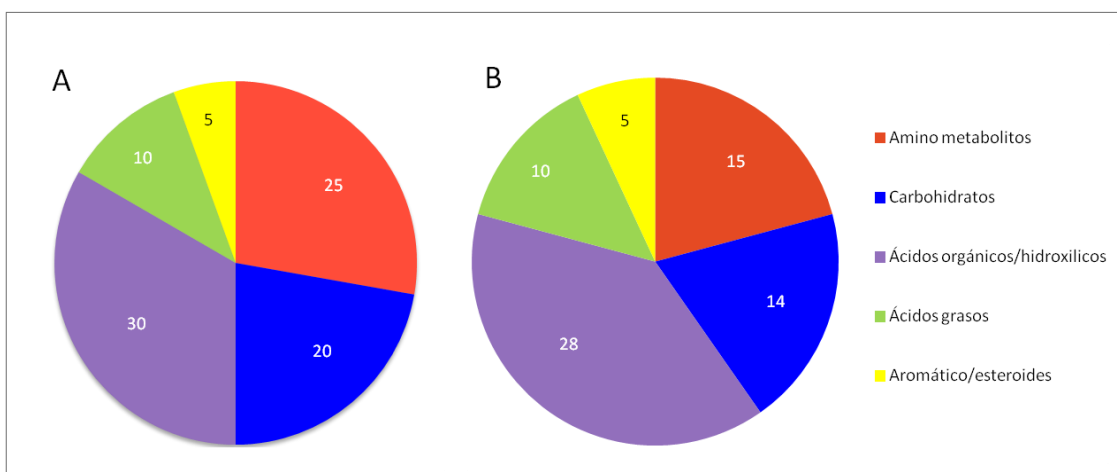
Metabolito	TR (min)	NH <sub>2</sub> OHHCl/BSTFA	NH <sub>2</sub> OHHCl/MSTFA	CH <sub>3</sub> OHHCl/MSTFA	CH <sub>3</sub> OHHCl/BSTFA
Ácido dodecanoico	20.463	x			x
Lisina	20.879	x			
Ácido maleico	21.063			x	
Ácido orótico	21.104	x			
Ác. trihidroxipentanoico	21.320		x	x	x
Ácido isovalínico	23.752	x	x	x	x
Ácido tereftálico	24.194	x	x	x	x
Ácido ribónico I	24.285	x	x	x	x
Ácido ribónico II	24.735	x	x	x	x
Fructosa I	25.332	x	x	x	x
Talosa	25.389		x	x	x
Fructosa II	25.544	x	x	x	x
Fructosa III	27.115		x	x	x
Glucosa	27.747	x	x	x	x
Ácido cis-9-hexadecanoico	27.892	x			
Fructosa oxima I	28.551		x		
Fructosa oxima II	28.695		x		
Ácido glucónico I	28.939				x
Glucopiranos	29.784			x	x
Glucosa oxima I	29.983	x	x		
Ácido glucónico II	30.146			x	x
Glucosa oxima II	30.196	x	x		
Ácido palmítico	30.264	x	x	x	x
Galactosa oxima	30.534	x	x		
Inositol	31.418		x		x
Inositol+Mio-inositol	32.031			x	x
Ácido úrico	32.285	x	x	x	x
Ác. 6-OH- $\alpha$ -metilnaftalenico	32.754		x	x	x
Ácido heptanodioico	33.256	x			
Ácido linoleico	33.862	x	x	x	x
Ácido oleico	34.012	x	x	x	x
Ácido esteárico	34.596	x	x	x	x
EDTA	39.068	x	x	x	x
Ácido ftálico	39.368	x			x
Colesterol	48.020	x	x	x	x

**Tabla R\_13 (cont).** Tabla comparativa de los metabolitos identificados utilizando las diferentes combinaciones de reactivo de protección de grupos carbonilo y reactivo de derivatización. Entre las cuatro combinaciones posibles, el uso de CH<sub>3</sub>ONH<sub>2</sub>HCl y BSTFA+1%TMCS permitió identificar el mayor número de metabolitos.

En nuestros experimentos encontramos que el número de metabolitos identificados variaba en función de cuál era la combinación de reactivo de protección y reactivo de derivatización utilizada. De hecho, ninguno de las cuatro combinaciones empleadas demostró ser suficientemente mejor que las demás, aún cuando la combinación de CH<sub>3</sub>ONH<sub>2</sub>HCl/BSTFA permitió llevar a cabo el mayor número de identificaciones. Igualmente, pudimos comprobar que en un análisis metabolómico completo de plasma los azúcares presentes en él (glucosa, fructosa y galactosa preferentemente) debido a su alta concentración, producían un importante enmascaramiento de otros metabolitos con puntos de ebullición similares. Esto se pudo comprobar gracias a la utilización de distintas combinaciones de reactivo de protección y de derivatización puesto que en el caso de emplear NH<sub>2</sub>OHHCl como reactivo de protección de grupos carbonilos, se encontraron metabolitos secundarios de azúcares con grupos oxima que no se observaban en el caso de emplear CH<sub>3</sub>ONH<sub>2</sub>HCl, los cuales enmascaraban metabolitos que sí eran identificados cuando se empleaba CH<sub>3</sub>ONH<sub>2</sub>HCl para la protección de

grupos carbonilo. En el caso de otros metabolitos de diversa naturaleza como el oxalato, la urea y especialmente los aminoácidos, se observó que la reacción de derivatización daba lugar en muchos casos a dos o tres metabolitos diferentes (ej. Leucina I RT 7.283 min, Leucina II RT 7.727 min).

Por tanto, atendiendo a los resultados de nuestro experimento, la utilización de  $\text{NH}_2\text{OHHCl}$  como reactivo de protección de grupos carbonilos fue descartada por dar lugar a un mayor número de productos secundarios respecto al  $\text{CH}_3\text{ONH}_2\text{HCl}$ . Una vez elegida el reactivo de protección era necesario elegir cuál sería el reactivo de derivatización utilizado. Como puede observarse en la Tabla R\_13 cuando se empleó  $\text{CH}_3\text{ONH}_2\text{HCl}$  como reactivo de protección, los dos compuestos de derivatización utilizados permitieron obtener perfiles de identificación de metabolitos muy similares. Utilizando BSTFA se obtuvieron resultados algo mejores ya que permitió la identificación de 9 metabolitos que no se observaron empleando MSTFA y además en algunos compuestos (ej. Leucina y Treonina) no dio lugar a reactivos secundarios. Todo ello nos llevó a elegir los reactivos  $\text{CH}_3\text{ONH}_2\text{HCl}$  y BSTFA+1%TMCS como la combinación más adecuada para llevar a cabo el análisis metabolómico del plasma que nos permitiese identificar y cuantificar los metabolitos de interés de un modo fiable e inequívoco y que evitase, por tanto, la formación de reactivos secundarios.



**Figura R\_25.** Representación gráfica del número total de picos identificados (A) y del número de metabolitos diferentes identificados (B) clasificados en cinco grupos de compuestos atendiendo a su estructura química y a los grupos funcionales presentes en ellos.

#### **4.2. Elección de metabolitos objeto de estudio**

Los 72 metabolitos identificados en el estudio metabolómico completo de plasma fueron clasificados en cinco grupos de compuestos diferentes tomando como criterio de clasificación su estructura química y los grupos funcionales que poseían (Figura R\_25). Posteriormente, se evaluó individualmente la necesidad de su estudio teniendo en cuenta dos factores; 1) En primer lugar, se valoró la relevancia de cada grupo de compuestos en las enfermedades cardiovasculares y más concretamente en el SCA. 2) En segundo lugar, se evaluó la capacidad de la cromatografía de gases para su determinación así como la posibilidad de que los pasos previos de preparación de la muestra (protección de grupos carbonilo y derivatización) permitiese obtener metabolitos derivatizados listos para su análisis sin productos secundarios que impidiesen un análisis cualitativo y cuantitativo correcto. Teniendo en cuenta ambos factores, se eligieron los ácidos grasos como el grupo de compuestos a estudiar de manera individualizada y que complementaría el estudio completo de plasma en pacientes con SCASEST frente a controles sanos.

#### **4.3. Análisis metabolómico completo de plasma**

Una vez que se identificó la combinación de  $\text{CH}_3\text{ONH}_2\text{HCl}$  y BSTFA como los reactivos de elección para el análisis metabolómico completo del plasma, se llevó a cabo el análisis mediante GC/MS de 10 muestras de pacientes con SCASEST y 10 controles sanos siguiendo el protocolo descrito detalladamente en el apartado 2.2.2 de Material y Métodos. En cada caso la inyección de la muestra se realizó por triplicado y el área de cada pico cromatográfico se dividió por el área del estándar interno empleado (pentadecanoato de metilo). La media de las tres áreas normalizadas para cada pico cromatográfico fue utilizada para el análisis estadístico posterior.

Se identificaron un total de 69 metabolitos. El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) cuyo pico cromatográfico eluyó a 35.408 min no se consideró como un metabolito de interés ya que provenía del conservante contenido en los tubos empleados (BD Microtainer®). Análogamente a lo que se había observado durante la puesta a punto de la metodología, con la combinación de reactivos de derivatización utilizada,  $\text{CH}_3\text{ONH}_2\text{HCl}$  y BSTFA, no se obtuvieron subproductos de los monosacáridos. Lo que sí se encontró fue que cinco aminoácidos (leucina, isoleucina, serina, treonina y ácido aspártico) no se habían derivatizado completamente y se identificaron tanto el

metabolito libre (ej. Leucina (COOH)) como el metabolito derivatizado (ej. Leucina (COO-SiMe<sub>3</sub>)).

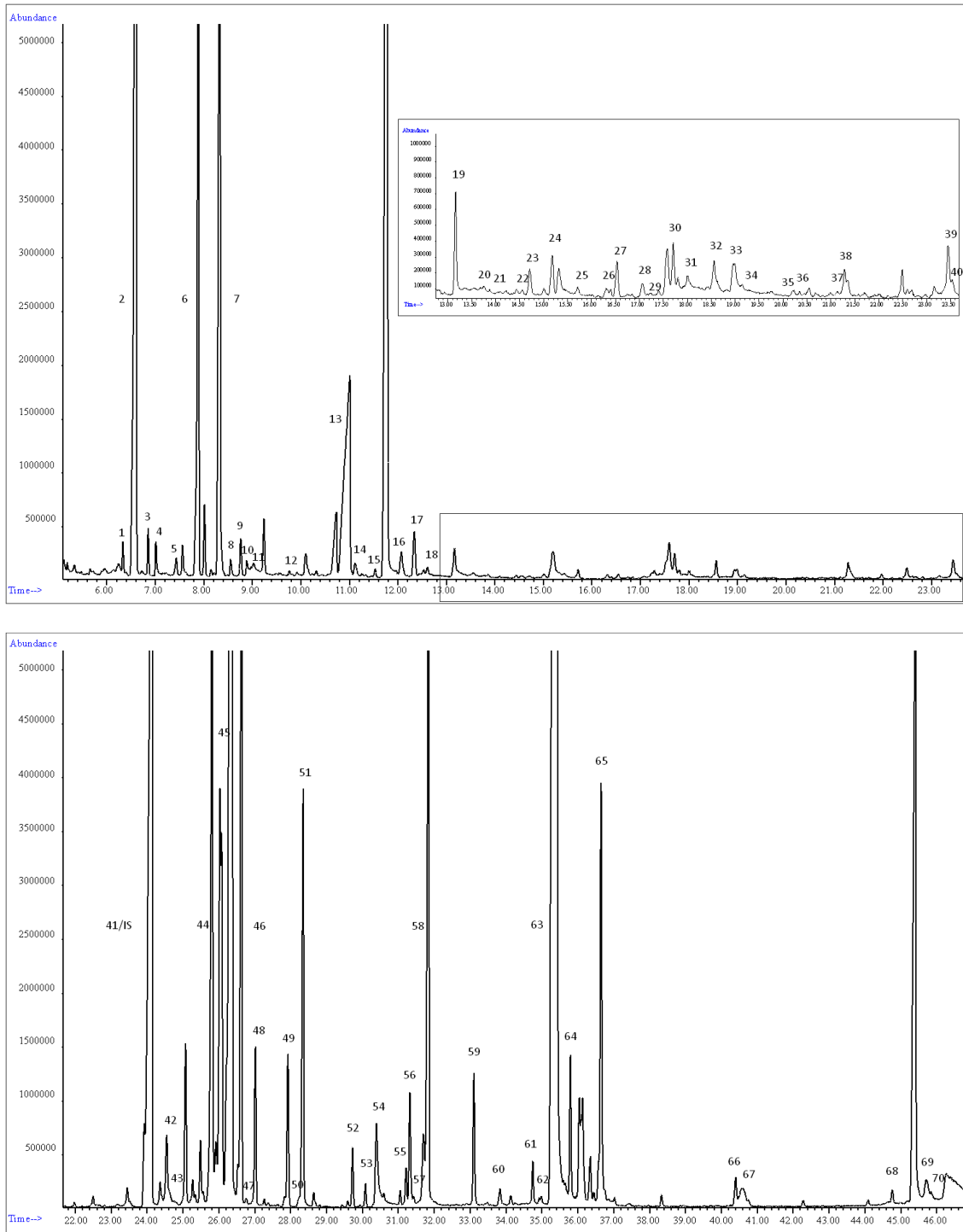
Para el análisis estadístico posterior en el caso de estos cinco aminoácidos se sumaron las áreas normalizadas de los picos correspondientes al metabolito libre y al derivatizado con objeto de hacer un análisis cuantitativo real.

Metabolito	RT (min)	Pico	Metabolito	RT (min)	Pico
Piruvato	6,241	(1)	Ácido trihidroxipentanoico	21,132	(37)
Lactato	6,516	(2)	5-OH-triptofano	21,292	(38)
Glicolato	6,778	(3)	Glicerol 3P	23,459	(39)
Valina	6,947	(4)	Ácido ribónico	23,530	(40)
Alanina	7,371	(5)	Pentadecanoato de metilo (IS)	24,129	(41)
Ácido 2-OH-butírico	7,969	(6)	Citrato	24,533	(42)
Ácido oxálico	8,287	(7)	Tetradecanoico	24,589	(43)
Leucina (COOH)	8,531	(8)	D-Fructosa	25,832	(44)
Ácido 3-OH-butírico	8,734	(9)	D-Glucosa	26,349	(45)
Ácido alfa-OH-valerico	8,859	(10)	D-Galactosa	26,617	(46)
Isoleucina (COOH)	9,009	(11)	N-acetil glucosamina	26,761	(47)
Ácido 2-ceto-3-metilvalerico	9,753	(12)	Glucitol	27,014	(48)
Urea	10,990	(13)	Beta-D-glucopiranososa	27,913	(49)
Serina (COOH)	11,136	(14)	Ácido glucónico	28,214	(50)
Leucina (COO-SiMe <sub>3</sub> )	11,537	(15)	Ácido palmítico	28,353	(51)
Treonina (COOH)	12,101	(16)	Inositol	29,532	(52)
Glicina	12,340	(17)	Ácido heptadecanoico	30,089	(53)
Ácido succínico	12,525	(18)	Ácido 6-OH-3-metilnaftalenoacético	30,386	(54)
Glicerato	13,166	(19)	Ácido linoleico	31,228	(55)
Ácido 2,3-dihidroxitanoico	13,766	(20)	Ácido oleico	31,342	(56)
Serina (COO-SiMe <sub>3</sub> )	13,869	(21)	Ácido cis-vaccénico	31,441	(57)
Treonina (COO-SiMe <sub>3</sub> )	14,577	(22)	Ácido esteárico	31,834	(58)
Ácido aspártico (COOH)	14,739	(23)	Acenafileno	33,110	(59)
Homocisteína	15,240	(24)	2-Octadecatrienoilglicerol	33,815	(60)
Ácido 3,4-dihidroxitanoico	15,714	(25)	Terbutilina	34,756	(61)
Ácido aspártico (COO-SiMe <sub>3</sub> )	16,321	(26)	Ácido araquídico	35,000	(62)
Ácido aminomalónico	16,547	(27)	EDTA	35,408	(63)
Ácido málico	17,083	(28)	6-Octadecanoato- $\alpha$ -D-glucopiranosido	35,775	(64)
Ácido 2-OH-benzoico	17,292	(29)	Ribofuranosa	36,651	(65)
5-oxo-prolina	17,602	(30)	Disacárido derivado de glucosa	40,411	(66)
Fenilalanina	18,019	(31)	D-turanosa	40,773	(67)
Ácido treónico	18,564	(32)	Colesterol	44,777	(68)
Ácido eritrónico	18,995	(33)	2-Octadecatrienoilglicerol II	45,705	(69)
Cistationina	19,169	(34)	1-Monolinoleoilglicerol	45,846	(70)
Ácido 4-OH-fenilacético	20,225	(35)			
Ác. tetrahidroxipentanoico-1,4-lactona	20,343	(36)			

**Tabla R\_14.** Lista de todos los metabolitos identificados. Se incluye el tiempo de retención (RT) y el número de pico correspondiente en la Figura R\_26. EDTA: ácido etilendiaminotetraacético; IS: estándar interno.

En la Figura R\_26 se muestra un cromatograma representativo obtenido al inyectar 1  $\mu$ l de plasma derivatizado en el equipo GC/MS. Para una mejor observación de los diferentes picos identificados, el cromatograma se muestra en dos partes. La primera parte incluye todos los picos cromatográficos eluidos entre los minutos 5 y 23.5. La segunda parte incluye los picos cromatográficos eluidos entre los minutos 23.5 y 47. Se muestra además una ampliación de la región comprendida entre los minutos 13 y 23.5. La numeración presente en cada uno de los picos cromatográficos identificados corresponde a los metabolitos recogidos en la Tabla R\_14.

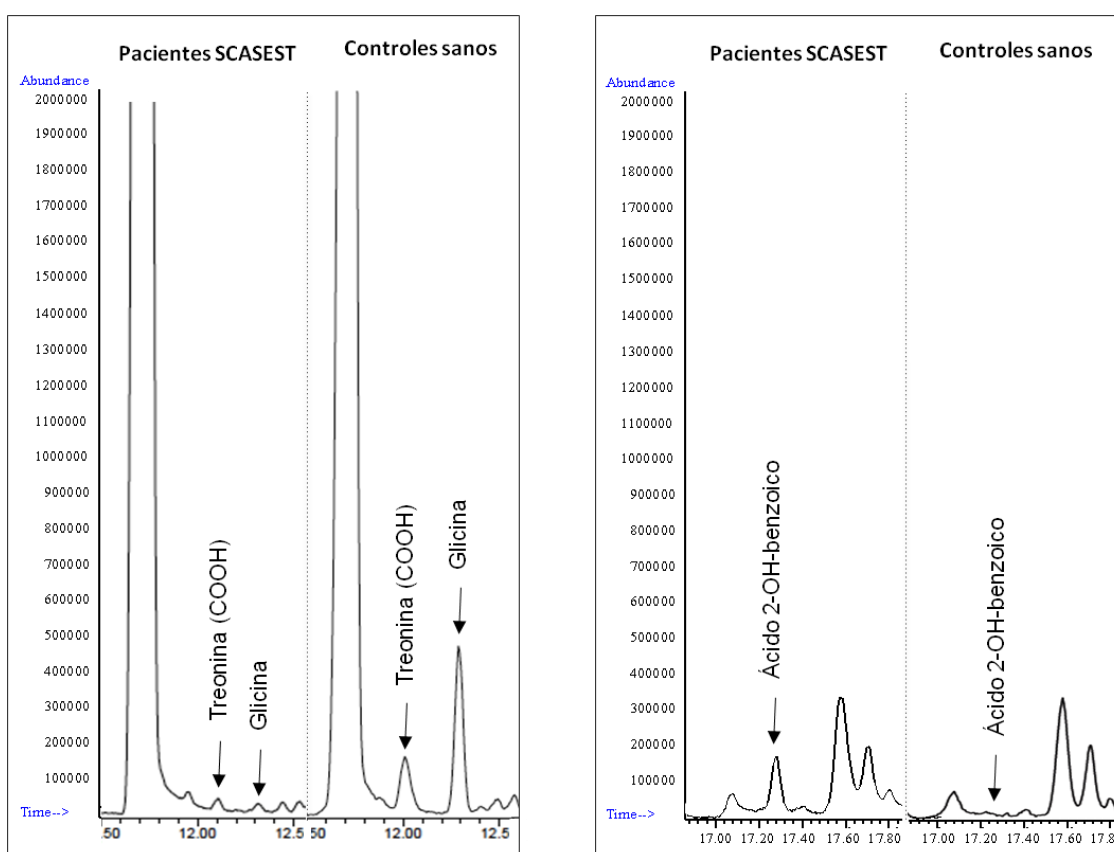
## Resultados



**Figura R\_26.** Cromatograma representativo del análisis metabolómico de plasma completo mediante GC/MS. En el cromatograma superior se pueden observar los metabolitos identificados entre los minutos 5 y 23.5, mostrándose además una ampliación de la región comprendida entre los minutos 13 y 23.5. En el cromatograma inferior se pueden observar los metabolitos identificados entre los minutos 23.5 y 47. La numeración presente en cada uno de los picos cromatográficos identificados corresponde a los metabolitos recogidos en la Tabla R\_14.

### 4.3.1. Huella dactilar del plasma (plasma fingerprinting).

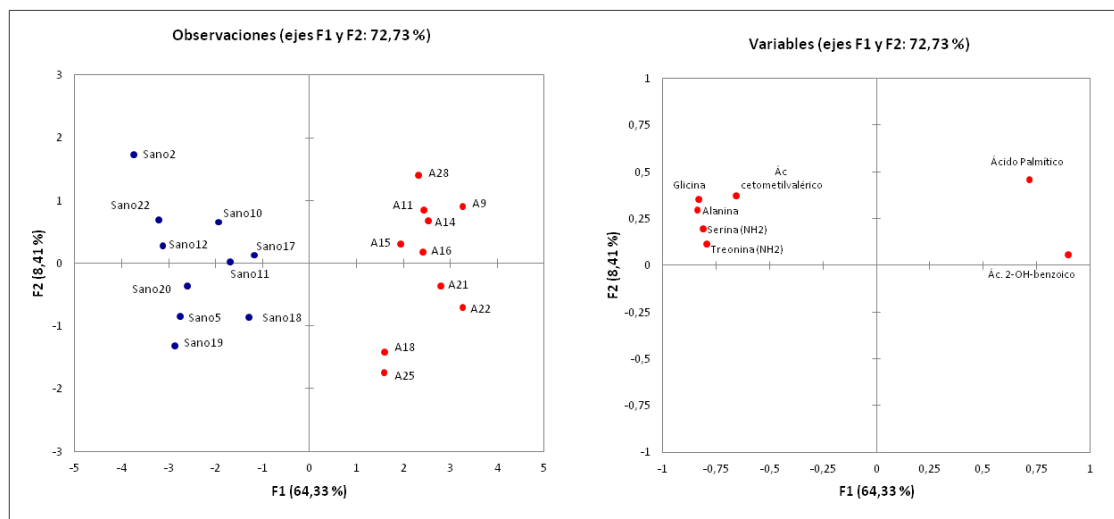
Como se explicó detalladamente en el apartado 4.1 de la Introducción, el estudio de la huella dactilar metabólica (metabolomic fingerprinting) constituye el primer paso que puede realizarse cuando se lleva a cabo el estudio metabólico de una muestra. Para ello, se llevó a cabo una comparativa directa de los cromatogramas individuales de ambos grupos, pacientes con SCASEST y controles sanos, que permitió identificar 7 metabolitos (alanina, serina, treonina, glicina, ácido 2-ceto-3-metilvalérico, ácido 2-OH-benzoico y ácido palmítico) cuyos picos cromatográficos eran de diferente altura entre ambos grupos. Como ejemplo, en la Figura R\_27 se muestra una ampliación de dos cromatogramas de pacientes con SCASEST y controles sanos para la fracción de treonina sin derivatizar (treonina (COOH)), glicina y ácido 2-OH-benzoico.



**Figura R\_27.** Ampliación de dos cromatogramas de plasma de pacientes con SCASEST y controles sanos. A la izquierda puede observarse la diferencia de área en los picos cromatográficos de treonina (COOH) (12.101 min) y glicina (12.340 min) que se encuentran disminuidos en los pacientes con SCASEST con respecto a los controles sanos. A la derecha puede observarse la diferencia de área en el pico cromatográfico del ácido 2-OH-benzoico (17.292 min), ausente en el grupo de controles sanos.

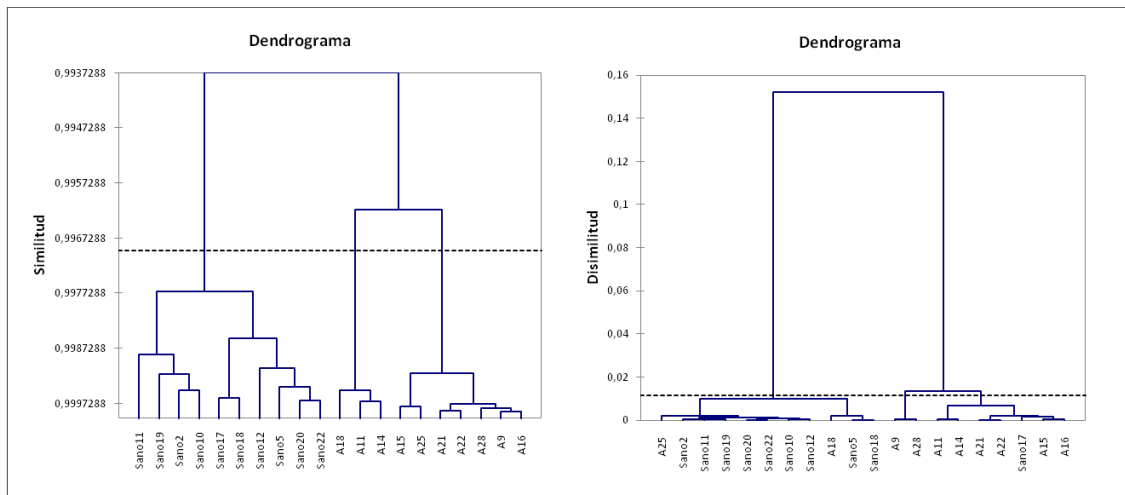
### 4.3.2. Análisis estadístico multivariante

Utilizando los programas estadísticos SPSS v15.0 y XLSTAT 2011, se realizaron un análisis de componentes principales (ACP) y un análisis de agrupamiento jerárquico de los datos del área normalizada frente al estándar interno (pentadecanoato de metilo) para los 7 picos cromatográficos seleccionados mediante huella dactilar en el grupo de pacientes con SCASEST y controles sanos.



**Figura R\_28.** Resultados del análisis de componentes principales. En el gráfico de observaciones (izquierda) aparecen representadas las muestras de controles sanos (azul) y pacientes con SCASEST (rojo). El gráfico de variables (derecha) muestra la distribución de los 7 metabolitos seleccionados.

En el gráfico de observaciones (izquierda) de la Figura R\_28, se puede observar la buena separación entre los dos grupos experimentales que proporcionó el análisis estadístico de los datos utilizando exclusivamente los datos de áreas normalizadas de los 7 metabolitos seleccionados mediante huella dactilar. En el gráfico de variables (derecha) se muestra la aportación de los diferentes metabolitos a la clasificación de las muestras en controles o pacientes SCASEST. Los metabolitos alanina, serina, treonina, glicina y ácido 2-ceto-3-metilvalérico se encontraban significativamente disminuidos en pacientes SCASEST mientras que los metabolitos ácido 2-OH-benzoico y ácido palmítico se encontraban significativamente elevados.



**Figura R\_29.** Resultados del análisis de agrupamiento jerárquico. El análisis de disimilitud utilizando el método de Ward muestra una distancia entre componentes del mismo grupo muy pequeña ( $<0.002$ ), así como una buena clasificación de las diferentes muestras en cada grupo experimental

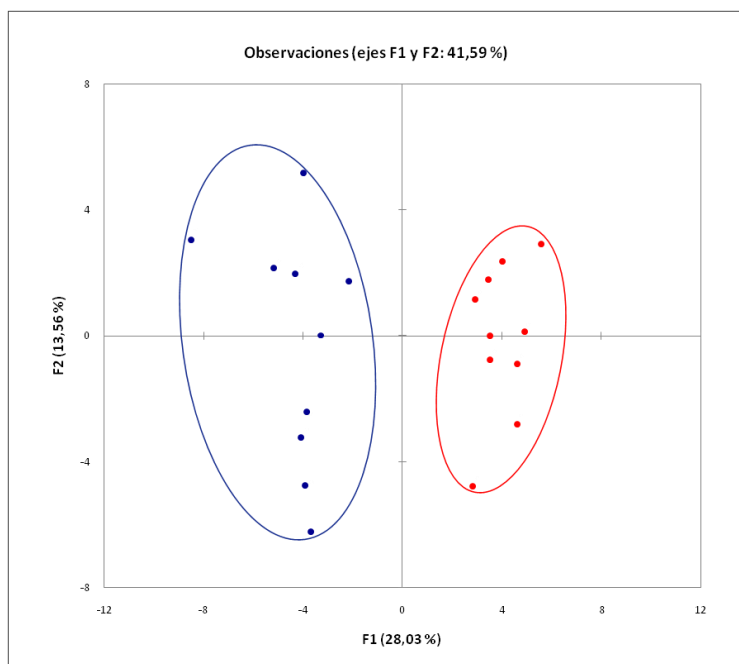
El análisis de agrupamiento jerárquico (Figura R\_29) mostró una muy buena clasificación de ambos grupos experimentales en el estudio de similitud en el que se empleó un coeficiente de correlación de Pearson y el enlace medio como método de aglomeración y una buena clasificación en el estudio de disimilitud utilizando el método de Ward y la distancia euclídea, con una distancia entre componentes de un mismo grupo muy pequeña ( $<0.02$ ). Estos datos muestran que la elección de esos 7 metabolitos constituye un buen perfil para una correcta clasificación de individuos aleatorios como pacientes con SCASEST o controles sanos.

#### 4.4. Análisis estadístico multivariante de plasma completo

Una vez completado el estudio de los 7 metabolitos identificados mediante huella dactilar, se llevó a cabo el análisis estadístico multivariante del conjunto de 69 metabolitos que fueron identificados en las muestras de plasma de pacientes con SCASEST y controles sanos (Tabla R\_14).

En el análisis de componentes principales, se obtuvo una buena separación entre los grupos de pacientes con SCASEST y controles sanos tal y como se puede ver en el gráfico de observaciones de la Figura R\_30 con una mayor dispersión en el grupo control (azul) que en los pacientes con SCASEST (rojo). Estableciendo una comparación con el gráfico de observaciones obtenido cuando se analizaron exclusivamente los 7 metabolitos obtenidos en la huella dactilar (Figura R\_28), se puede apreciar que se produce una diversificación de los puntos al incluir todos los

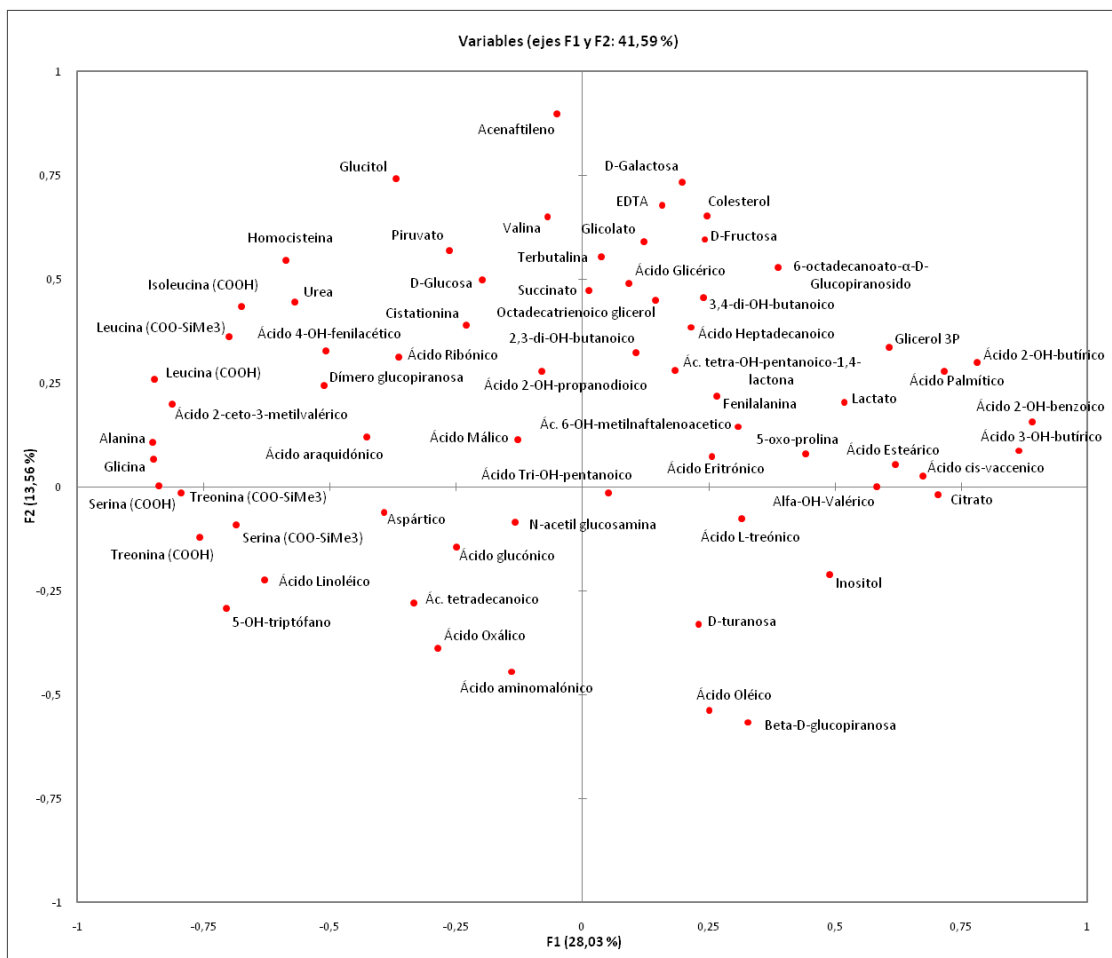
metabolitos a estudiar aunque se mantiene una buena distinción entre grupos experimentales.



**Figura R\_30.** Resultados del análisis de componentes principales. El gráfico de observaciones muestra una buena separación de los grupos de estudio; controles sanos (azul) y pacientes con SCASEST (rojo).

En la Figura R\_31 se muestra el gráfico de variables donde se puede observar la diferente distribución de los metabolitos identificados. En los dos cuadrantes de la derecha se concentran los metabolitos que más influyen en la clasificación de los pacientes con SCASEST, es decir que se encuentran elevados en dicho grupo, y en los dos cuadrantes de la izquierda se concentran los metabolitos que más influyen en la clasificación de los controles sanos, es decir metabolitos que se encuentran disminuidos en los pacientes con SCASEST. El análisis estadístico empleando una *t-Student* al conjunto de áreas normalizadas de cada pico cromatográfico con respecto al estándar interno en el grupo de controles sanos y de pacientes SCASEST dio como resultado la existencia de 15 metabolitos (alanina, ácido 2-ceto-3-metilvalérico, serina, leucina, treonina, glicina, ácido 2-OH-benzoico, ácido palmítico, ácido linoleico, ácido cis-vaccenico, lactato, ácido alfa-OH-valérico, citrato, 5-oxo-prolina y ácido esteárico) cuyas área de pico normalizadas presentaban variaciones estadísticamente significativa entre ambos grupos. De ellos, 8 metabolitos (ácido 2-OH-benzoico, ácido palmítico, citrato, ácido cis-vaccenico, lactato, ácido alfa-OH-valérico, 5-oxo-prolina y ácido esteárico) se encontraron elevados en el grupo de pacientes SCASEST y 7 metabolitos (alanina, ácido 2-ceto-3-metilvalérico, serina, leucina, treonina, glicina y ácido

linoleico) presentaban una disminución estadísticamente significativa en el mismo grupo (Tabla R\_15).



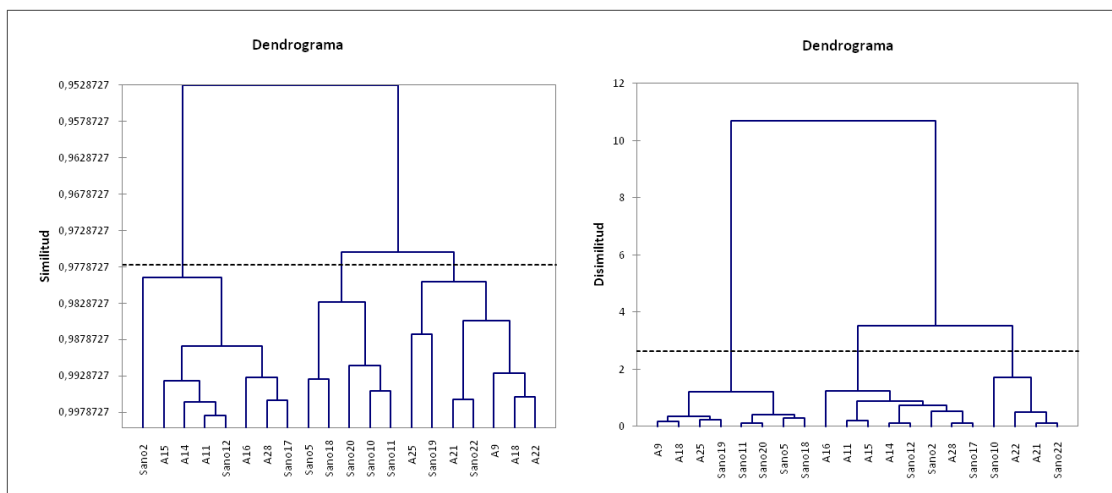
**Figura R\_31.** Resultados del análisis de componentes principales para el análisis completo de plasma. El gráfico de contribución muestra la distribución de los 69 metabolitos identificados.

Metabolito	t	Sig. (bilateral)	Metabolito	t	Sig. (bilateral)
Alanina	5,890	<0,001	Ácido 2-OH-benzoico	-11,570	<0,001
Treonina	5,727	<0,001	Citrato	-5,667	<0,001
Serina	5,163	<0,001	Ácido palmítico	-3,660	0,002
Glicina	5,040	<0,001	Ácido cis-vaccenico	-3,140	0,009
Ácido 2-ceto-3-metilvalérico	3,805	0,002	Ácido alfa-OH-Valérico	-2,868	0,010
Leucina	2,719	0,014	Ácido esteárico	-2,809	0,012
Ácido linoléico	2,708	0,014	Lactato	-2,623	0,017
			5-oxo-prolina	-2,111	0,049

**Tabla R\_15.** El análisis *t-Student* reveló la existencia de 7 metabolitos significativamente disminuidos en pacientes con SCASEST (izquierda) y 8 metabolitos significativamente aumentados (derecha). En el caso de los aminoácidos se sumaron las áreas normalizadas de las fracciones libres (ej. Serina (COOH)) y derivatizada (ej. Serina (COO-SiMe3)) para su análisis estadístico.

Como era esperado, los 7 metabolitos que se encontraron estadísticamente alterados en el análisis previo mediante huella dactilar (alanina, serina, treonina, glicina, ácido 2-

ceto-3-metilvalérico, ácido 2-OH-benzoico y ácido palmítico) también lo estaban en el análisis metabólico completo del plasma.



**Figura R\_32.** Resultados del análisis de agrupamiento jerárquico. El análisis de disimilitud utilizando el método de Ward muestra una distancia entre componentes del mismo grupo mayor ( $<3$ ) que la observada en el estudio de huella dactilar ( $<0.02$ ).

El análisis de agrupamiento jerárquico en el caso del estudio metabólico de los 69 metabolitos (Figura R\_32) mostró una peor clasificación de ambos grupos experimentales tanto en el estudio de disimilitud (derecha) como en el estudio de similitud (izquierda) que en el caso del análisis de los 7 metabolitos identificados mediante huella dactilar (Figura R\_29). En este caso, la distancia entre componentes de un mismo grupo es mayor ( $<3$ ) que la observada en el estudio por huella dactilar ( $<0.02$ ). Se observa también que a diferencia de lo ocurrido en el estudio por huella dactilar, la clasificación de las muestras en los dos grupos experimentales es peor lo que de nuevo pone de manifiesto la diferencia altamente significativa en los perfiles plasmáticos de los 7 metabolitos diferenciales observados mediante huella dactilar entre controles sanos y pacientes con SCASEST.

En la Tabla R\_16 se recoge una breve descripción de la función biológica referida en la base de datos metabólica humana (*Human metabolomic database, HMDB*) para cada uno de los 15 metabolitos que se encontraron alterados en el análisis metabólicos completo de plasma en pacientes con SCASEST frente a controles sanos.

Metabolito	Función biológica
Alanina	Aminoácido no esencial que presenta altas concentraciones en el músculo y cuya función principal es el aporte de energía. Actúa como regulador en el metabolismo de la glucosa. Los niveles sanguíneos de alanina se regulan paralelamente a los niveles de azúcar en la sangre en la diabetes y la hipoglucemia de modo que la alanina reduce tanto la hipoglucemia severa como la cetosis de la diabetes. Es un aminoácido importante para la reproducción de linfocitos y la inmunidad.
Treonina	Aminoácido esencial en los seres humanos. Es abundante en el plasma humano, sobre todo en los recién nacidos. Es un inmunestimulante que promueve el crecimiento de la glándula del timo. Probablemente también puede promover la función de las células de defensa inmunitaria.
Serina	La serina y los productos de su metabolismo han sido reconocidos no sólo por ser esenciales para la proliferación celular, sino también para las funciones específicas en el sistema nervioso central. Los resultados de los niveles alterados de la serina y la glicina en pacientes con trastornos psiquiátricos y las anomalías severas neurológicas en pacientes con defectos de la síntesis de L-serina da relieve la importancia de la L-serina en el desarrollo y función del cerebro.
Glicina	La función principal de la glicina es como un precursor de las proteínas. También es un bloque de construcción para numerosos productos naturales. La glicina es un neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central, especialmente en la médula espinal, tronco cerebral, y la retina. Cuando los receptores de glicina se activan, el cloruro entra en la neurona a través de receptores ionotrópicos, causando un potencial postsináptico inhibitorio.
Ácido 2-ceto-3-metilvalérico	Metabolito de la isoleucina utilizado como marcador urinario de la enfermedad de jarabe de arce, una enfermedad genética causada por una deficiencia en la actividad del complejo de la deshidrogenasa de alfa-cetoácidos de cadena ramificada lo que impide metabolizar los aminoácidos leucina, isoleucina y valina, lo cual lleva a una acumulación de estos químicos en la sangre
Leucina	Junto con la valina e isoleucina constituyen los tres aminoácidos esenciales de cadena ramificada. A pesar de sus semejanzas estructurales, los aminoácidos ramificados tienen diferentes rutas metabólicas, la valina es glucogénica, la leucina es exclusivamente cetogénica y la isoleucina ambos.
Ácido linoléico	El ácido linoleico es un ácido graso insaturado también conocido como un ácido graso omega-6. Es un ácido graso esencial en la nutrición humana, ya que no pueden ser sintetizados por los seres humanos. Se utiliza en la biosíntesis de las prostaglandinas a través de ácido araquidónico y las membranas celulares.
Ácido 2-OH-benzoico	El ácido salicílico o salicilato, es el principal producto metabólico de la del ácido acetilsalicílico, fármaco usado frecuentemente como antiinflamatorio, analgésico, antipirético y antiagregante plaquetario indicado para personas con riesgo de formación de trombos sanguíneos.
Citrato	Ácido débil que se forma en el ciclo de Krebs o que puede ser introducido con la dieta. La evaluación de niveles plasmáticos de ácido cítrico apenas se utilizan en el diagnóstico de enfermedades humanas. Por el contrario, la excreción urinaria de citrato es una herramienta común en el diagnóstico diferencial de los cálculos renales, acidosis tubular renal y que desempeña también un papel en las enfermedades óseas.
Ácido palmítico	El ácido palmítico o ácido hexadecanoico es uno de los más comunes los ácidos grasos saturados que se encuentran en animales y plantas, un ácido graso saturado que se encuentra en las grasas y ceras incluyendo aceite de oliva, aceite de palma, y los lípidos del cuerpo.
Ácido cis-vaccénico	Presente en todos los tejidos y en casi todas las clases de lípidos a una concentración baja.
Ácido palmitoleico	Ácido graso insaturado constituyente común de los glicéridos de tejido adiposo humano. Presente en todos los tejidos, generalmente se encuentra en mayores concentraciones en el hígado.

**Tabla R\_16.** Breve descripción de la función biológica de los metabolitos que se encontraron alterados en pacientes con SCASEST frente a los controles sanos.

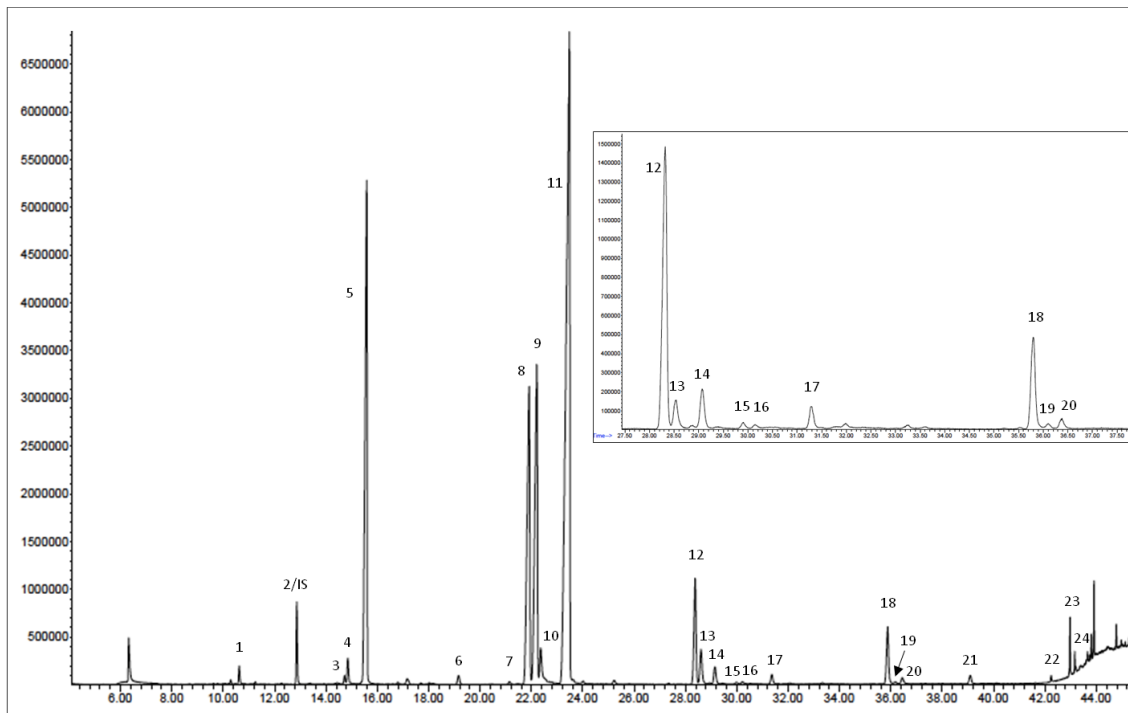
## 5. Análisis metabolómico de ácidos grasos en plasma de pacientes con SCASEST

Tal y como se describió detalladamente en el apartado 2.4 de Material y Métodos, el análisis de ácidos grasos en plasma se realizó siguiendo el método descrito por Lepage y Roy [187]. Al igual que en el caso del análisis metabolómico completo del plasma, las áreas de los picos de los diferentes ácidos grasos se normalizaron con respecto al área de pico del estándar interno utilizado (pentadecanoato de metilo). Con estos datos se realizó un análisis de componentes principales, un análisis de agrupamiento jerárquico y un análisis estadístico empleando una *t-Student*. En la Tabla R\_17 se recogen los 24 ácidos grasos analizados junto con los valores de la desviación estándar relativa del área de pico cromatográfico de los diferentes ácidos grasos para pacientes con SCASEST y controles sanos.

Metabolito	RT (min)	Pico	Metabolito	RT (min)	Pico
14:0 Mirístico	10.654	(1)	20:5n-3 Eicosapentanoico (EPA)	28.509	(13)
15:0 Pentadecanoato de metilo (IS)	12.913	(2)	20:3n-6 Eicosatrienoico	29.102	(14)
16:1n-9 trans Palmitoleico	14.775	(3)	20:2n-6 Eicosadienoico	29.911	(15)
16:1n-7 Palmitoleico	14.912	(4)	20:1n-6 Eicosanoico	30.097	(16)
16:0 Palmítico	15.386	(5)	20:0 Araquídico	31.362	(17)
17:0 Heptadecanoico	19.077	(6)	22:6n-3 Docosahexaenoico (DHA)	35.802	(18)
18:3n-6 Gamma-linoleico	21.289	(7)	22:5n-6 Docosapentaenoico	36.091	(19)
18:2n-6 Linoleico	21.743	(8)	22:4n-3 Docosatetraenoico	36.398	(20)
18:1n-9 Oleico	22.118	(9)	22:0 Docosanoico	39.007	(21)
18:1n-7 Cis vaccenico	22.467	(10)	23:0 Tricosanoico	42.341	(22)
18:0 Esteárico	23.278	(11)	24:1n-9 Tetracosenoico	43.011	(23)
20:4n-6 Araquidónico	28.340	(12)	24:0 Tetracosanoico	43.186	(24)

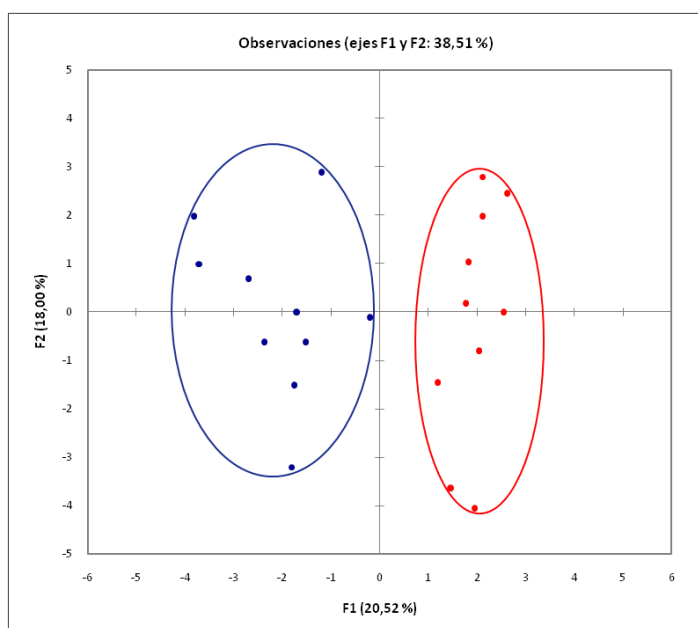
**Tabla R\_17.** Resumen de todos los ácidos grasos identificados junto con el número de pico correspondiente en la Figura R\_33. RT: tiempo de retención; IS: estándar interno.

En la Figura R\_33 se muestra un cromatograma representativo del análisis metabolómico de ácidos grasos obtenido al inyectar 1 µl de plasma derivatizado en el equipo GC/MS. Para una mejor observación de los diferentes picos identificados, se incluye una ampliación de los picos cromatográficos eluidos entre los minutos 28 y 38. La numeración presente en cada uno de los picos cromatográficos identificados corresponde a los metabolitos recogidos en la Tabla R\_17.

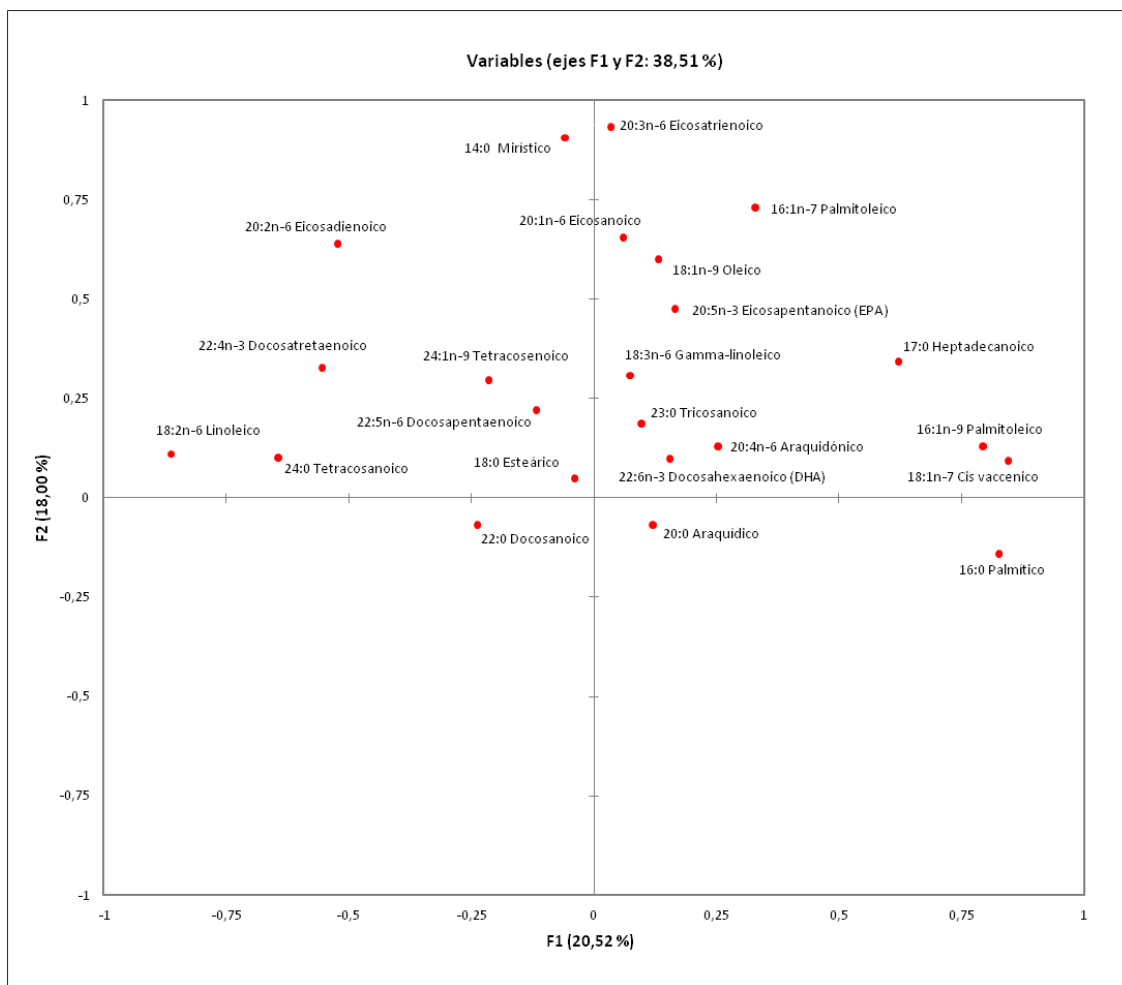


**Figura R\_33.** Cromatograma representativo del análisis metabolómico de ácidos grasos en plasma mediante GC/MS. Se muestra una ampliación de la región comprendida entre los minutos 28 y 38. La numeración presente en cada uno de los picos cromatográficos identificados corresponde a los metabolitos recogidos en la Tabla R\_17.

En la Figura R\_34 se puede ver como el gráfico de observaciones muestra un grado de dispersión ligeramente mayor en las muestras de controles sanos que el observado en las muestras de pacientes con SCASEST. A pesar de ello, existe una buena separación entre grupos experimentales lo que sugiere que los perfiles de ácidos grasos de los pacientes con SCASEST fueron significativamente diferentes que los de los controles sanos.

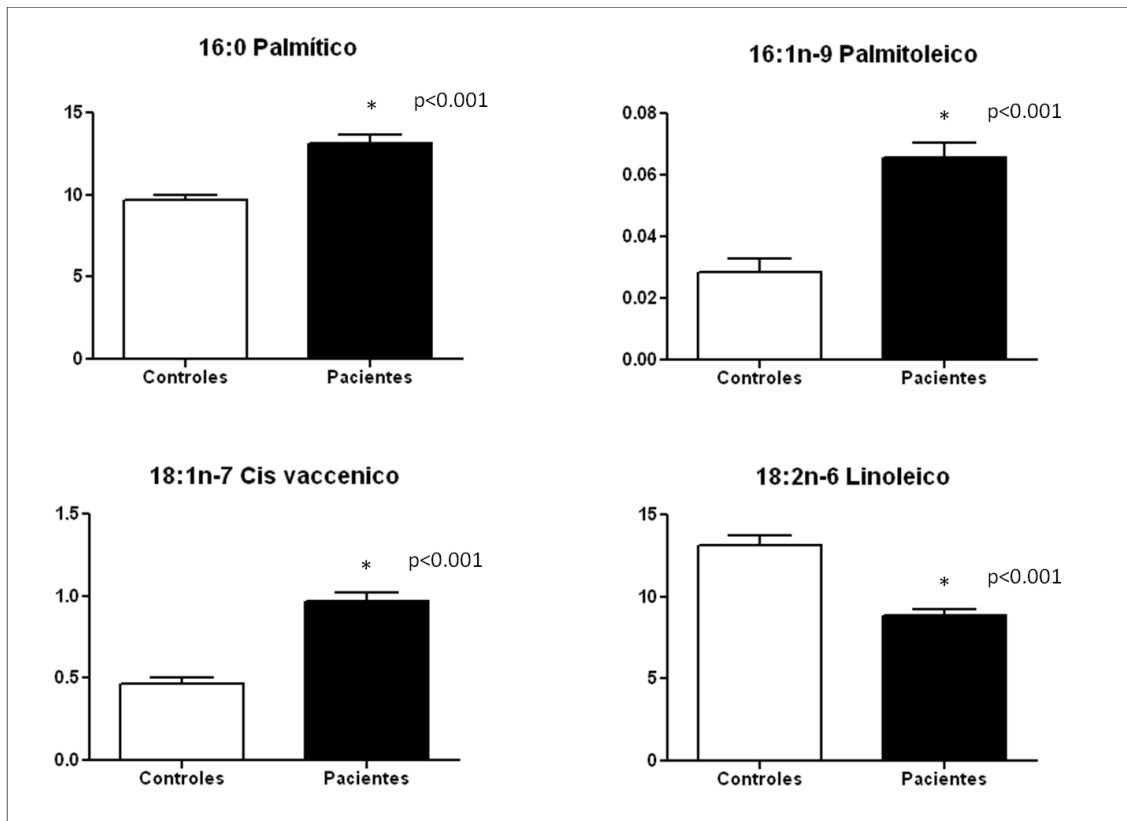


**Figura R\_34.** Resultados del análisis de componentes principales. En el gráfico de observaciones aparecen representadas las muestras de controles sanos (azul) y pacientes con SCASEST (rojo).



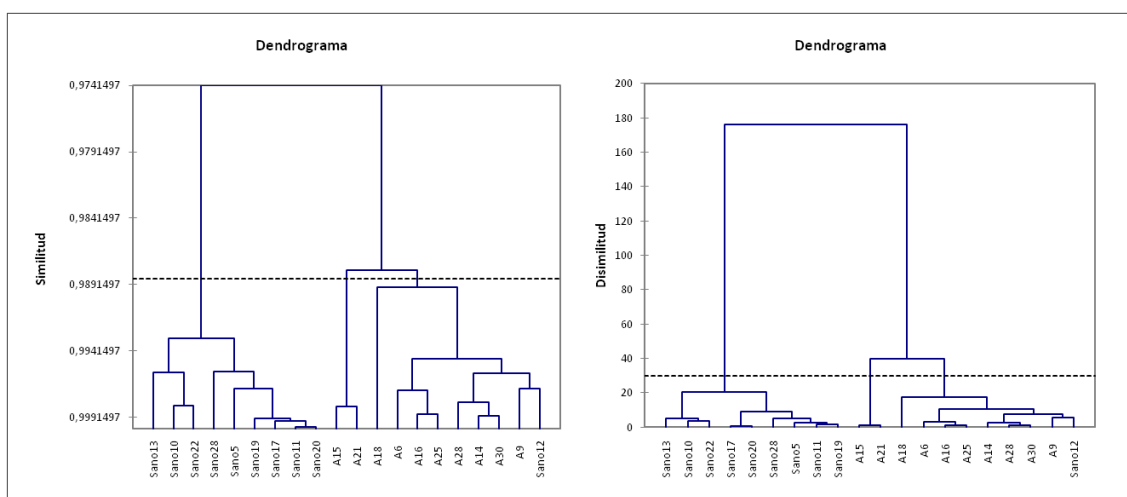
**Figura R\_35.** Resultados del análisis de componentes principales para el análisis metabolómico de ácidos grasos en plasma. El gráfico de contribución muestra la distribución de los 23 ácidos grasos identificados (no se incluye el estándar interno).

En el análisis estadístico con *t-Student* se obtuvieron 4 ácidos grasos (ácido palmítico (16:0), ácido trans palmitoleico (16:1n-9), ácido cis-vaccenico (18:1n-7) y ácido linoleico (18:2n-6)) cuyas concentraciones estaban estadísticamente variadas entre el grupo de pacientes con SCASEST y los controles sanos (Figura R\_36). De ellos, 3 ácidos grasos (ácido palmítico (16:0), ácido trans palmitoleico (16:1n-9), y ácido cis-vaccenico (18:1n-7)) se encontraron elevados en pacientes con SCASEST mientras que el ácido linoleico (18:2n-6) se encontraba disminuido en este grupo. Además, 3 de los 4 ácidos grasos significativamente alterados en este estudio (ácido palmítico, ácido cis-vaccenico y ácido linoleico) también se encontraban significativamente alterados en el estudio metabolómico completo de plasma mientras que el ácido estearico no presentó en este análisis variación estadísticamente significativa.



**Figura R\_36.** Ácidos grasos que se encontraron significativamente alterados en pacientes con SCASEST tras el análisis estadístico de los datos aplicando una *t-Student*.

En la Figura R\_37 se muestran los resultados del análisis de agrupamiento jerárquico. Se obtuvo una muy buena clasificación de casi todas las muestras entre los dos grupos experimentales de manera análoga a lo observado en el estudio metabólico mediante huella dactilar (Figura R\_29).



**Figura R\_37.** Resultados del análisis de agrupamiento jerárquico. El análisis de disimilitud utilizando el método de Ward muestra una muy buena clasificación de las diferentes muestras entre los dos grupo experimentales.

## 6. Validación de resultados

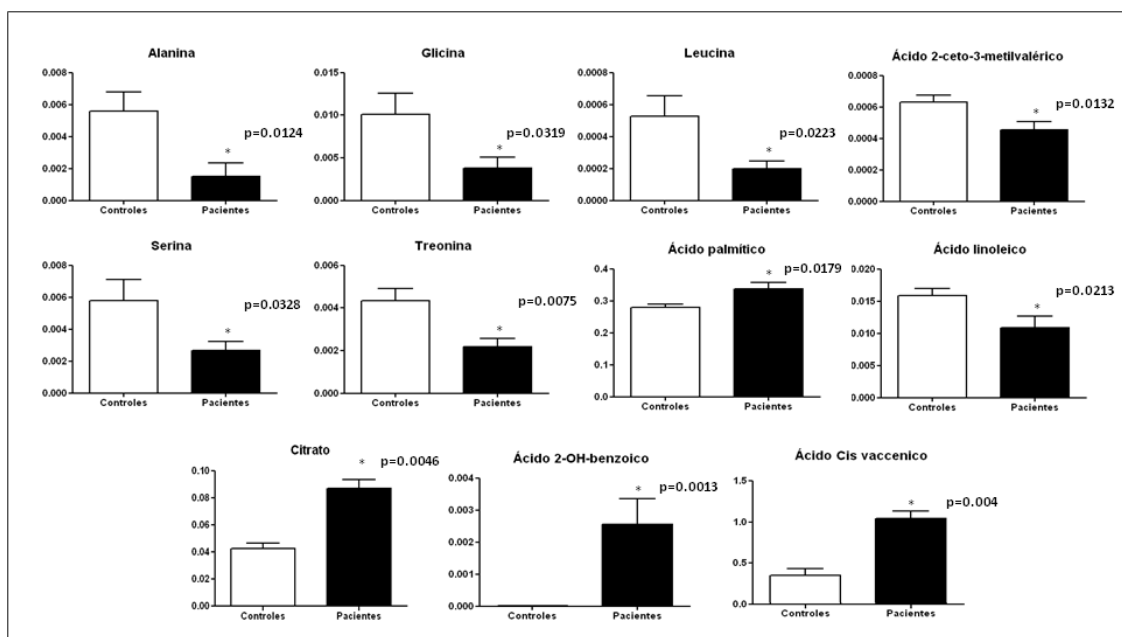
Para la validación de los resultados obtenidos en el análisis metabolómico completo de plasma se utilizó de nuevo la cromatografía de gases unida a espectrometría de masas (GC/MS).

Para ello, se llevó a cabo el análisis metabolómico de plasma total en un nuevo grupo de muestras de 15 pacientes con SCASEST y 15 controles sanos. El protocolo de derivatización de las muestras y las condiciones experimentales fueron las descritas previamente con detalle en el apartado 2.2.2 de Material y Métodos. En cada caso la inyección de la muestra se realizó por triplicado y el área de cada pico cromatográfico se dividió por el área del estándar interno. La media de las tres áreas normalizadas para cada pico cromatográfico fue utilizada para el análisis estadístico posterior.

En este caso, sólo se emplearon para el análisis estadístico las áreas de los 15 metabolitos que se habían encontrado variados previamente. Mediante un análisis estadístico empleando una *t-Student* se encontraron de nuevo diferencias estadísticamente significativas en 11 metabolitos (alanina, ácido 2-ceto-3-metilvalérico, serina, leucina, treonina, glicina, ácido 2-OH-benzoico, citrato, ácido palmítico, ácido linoleico y ácido 11-cis vaccenico) no mostrando diferencias estadísticamente significativas 4 metabolitos (lactato, ácido alfa-OH-valérico, 5-oxo-prolina y ácido esteárico).

Todos los metabolitos que fueron identificados en la primera fase del estudio mediante huella dactilar (alanina, serina, treonina, glicina, ácido 2-ceto-3-metilvalérico, ácido 2-OH-benzoico y ácido palmítico) se encontraron de nuevo variados durante el proceso de validación lo que confirma la existencia de una diferencia altamente significativa en los perfiles plasmáticos de estos 7 metabolitos en pacientes SCASEST. Igualmente se validaron los 3 ácidos grasos que también se encontraron alterados en el análisis metabolómicos de ácidos grasos (ácido palmítico, ácido cis-vaccenico y ácido linoleico).

En la Figura R\_38 se presentan las gráficas de los valores medios de los 11 metabolitos validados junto con el valor de significación estadística, *p*, obtenido mediante *t-Student*.



**Figura R\_38.** En el proceso de validación de los resultados obtenidos en el análisis metabólico completo de plasma se validaron 11 de los 15 metabolitos inicialmente alterados en los dos grupos experimentales. 4 metabolitos (lactato, ácido alfa-OH-valérico, 5-oxo-prolina y ácido esteárico) no se encontraron significativamente variados en el análisis estadístico de los datos aplicando una *t-Student*.

Cabe destacar además que el ácido esteárico no mostró diferencias significativas en el grupo de muestras de validación confirmando los resultados obtenidos previamente en el análisis metabólico de ácidos grasos en el que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes con SCASEST y el grupo de controles sanos.

De los 11 metabolitos que mostraron de nuevo diferencias estadísticamente significativas en el proceso de validación (alanina, serina, leucina, treonina, glicina, ácido 2-ceto-3-metilvalérico, ácido 2-OH-benzoico, citrato, ácido palmítico, ácido linoleico y ácido cis-vaccenico), el ácido 2-OH-benzoico o ácido salicílico no se consideró como un potencial biomarcador de enfermedad cardiovascular ya que se trata del metabolito principal del catabolismo del ácido 2-(acetiloxi)-benzoico o ácido acetil salicílico (aspirina) que se utiliza como tratamiento de primera línea en paciente que sufren SCA.

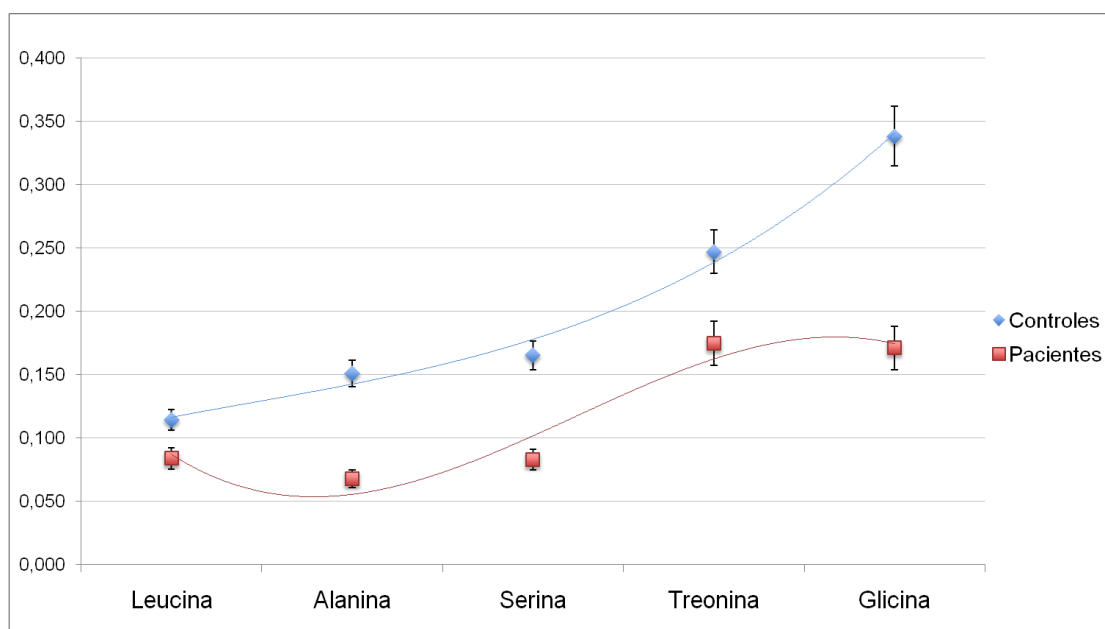
## 7. Estudio de perfiles metabólicos

Tras la validación de los resultados obtenidos en el análisis metabólico completo de plasma en pacientes con SCASEST y controles sanos, se obtuvieron 11 metabolitos que mostraron de nuevo diferencias estadísticamente significativas de los cuales 7 estaban disminuidos en el grupo de pacientes con SCASEST (alanina, serina, leucina, treonina,

glicina, ácido 2-ceto-3-metilvalérico y ácido linoleico) y 4 se encontraban aumentados en este mismo grupo (ácido 2-OH-benzoico, citrato, ácido palmítico y ácido cis-vaccénico).

De los 7 metabolitos disminuidos en el grupo de pacientes con SCASEST destaca la existencia de 5 aminoácidos (alanina, serina, leucina, treonina y glicina) y 1 metabolito relacionado con ellos (ácido 2-ceto-3-metilvalérico).

Estos resultados sugieren que la valoración conjunta de estos 5 aminoácidos puede constituir un perfil de interés clínico para el diagnóstico del SCASEST. En la Figura R\_39 se muestra una representación gráfica de las abundancias medias de estos 5 aminoácidos entre los dos grupos experimentales. La unión de los diferentes puntos mediante una línea de tendencia permite distinguir claramente la existencia de un perfil característico en los pacientes con SCASEST frente a los controles sanos.

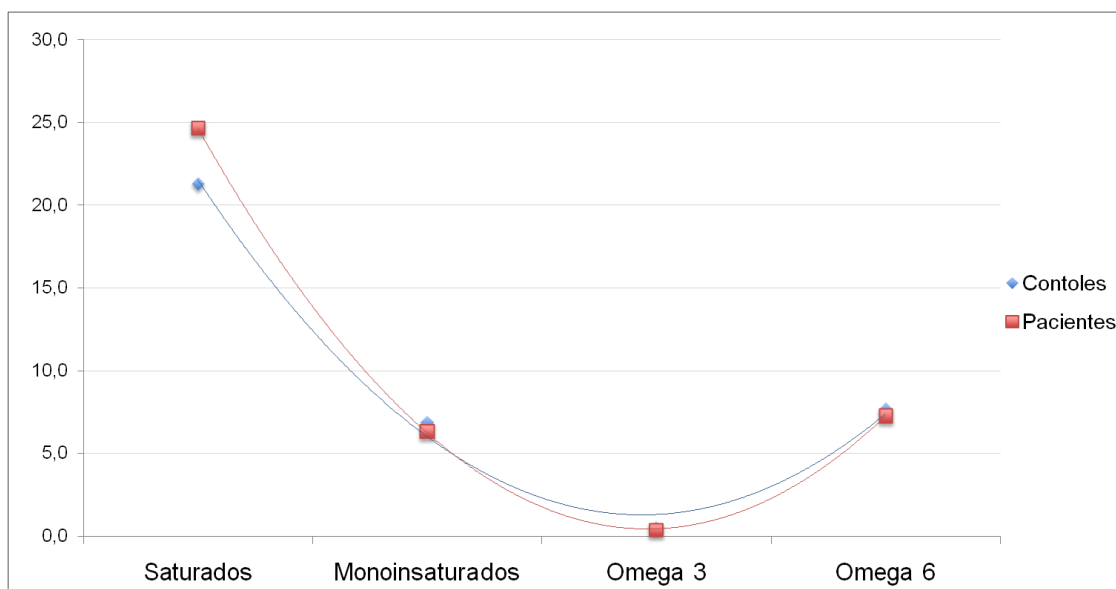


**Figura R\_39.** Representación gráfica de la abundancia total de los cinco aminoácidos significativamente alterados entre el grupo de pacientes con SCASEST y los controles sanos. Mediante una línea de tendencia puede verse claramente que ambos grupos experimentales poseen perfiles diferentes en los cinco aminoácidos.

En el análisis metabólico de ácidos grasos en plasma se encontraron 4 ácidos grasos que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes con SCASEST y el grupo de controles sanos. De ellos, 3 ácidos grasos (ácido palmítico (16:0), ácido trans palmitoleico (16:1n-9), y ácido cis-vaccenico (18:1n-7)) se encontraron elevados en los pacientes con SCASEST mientras que el ácido linoleico (18:2n-6) se encontraba disminuido en este grupo.

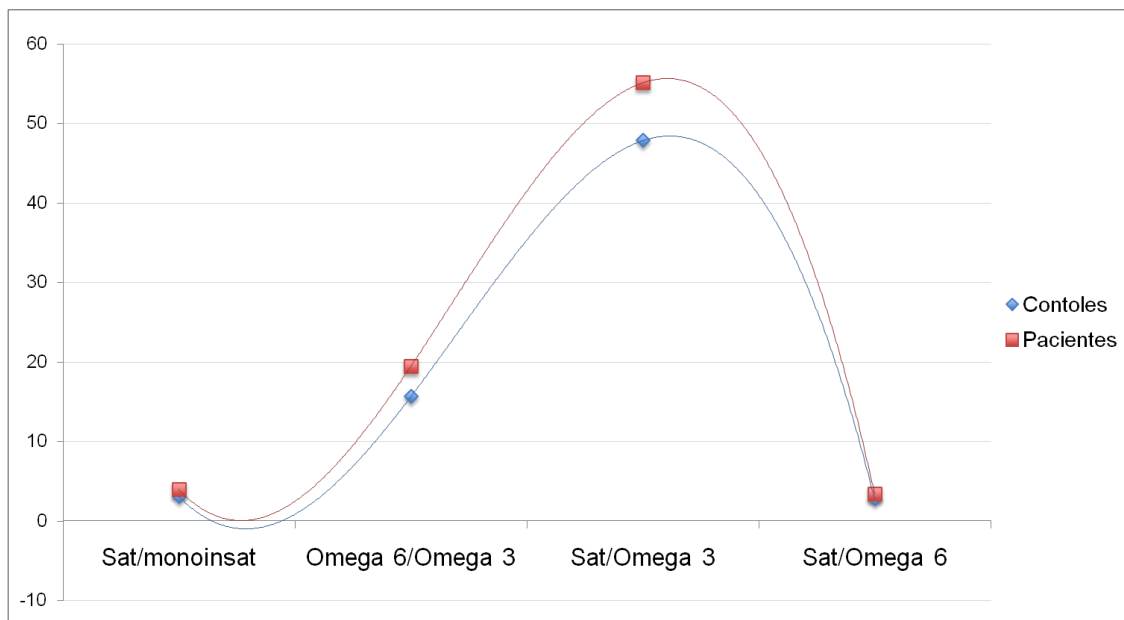
Adicionalmente, se estudiaron los perfiles de ácidos grasos saturados, monoinsaturados, omega 3 y omega 6 que presentaban los dos grupos experimentales. Para ello se sumaron las abundancias totales de los ácidos grasos saturados (14:0 tetradecanoico, 16:0 palmítico, 17:0 heptadecanoico, 18:0 esteárico, 20:0 eicosanoico, 22:0 docosanoico, 23:0 tricosanoico y 24:0 tetracosanoico), de los ácidos grasos monoinsaturados (16:1n-9transpalmitoleico, 16:1n-7 palmitoleico, 18:1n-9 oleico, 18:1n-7 cis-vaccenico, 20:1n-6 eicosanoico y 24:1n-9 tetracosanoico), de los ácidos grasos omega 3 (20:5n-3 eicosapentanoico (EPA), 22:6n-3 docosahexaenoico (DHA) y 22:4n-3 docosatetraenoico) y de los ácidos grasos omega 6 (Gamma-linoleico, 18:2n-6 linoleico, 20:4n-6 araquidónico, 20:3n-6 eicosatrienoico, 20:2n-6 eicosadienoico, 20:1n-6 eicosanoico y 22:5n-6 docosapentaenoico) para cada grupo experimental.

Como puede verse en la Figura R\_40, se encontró que el grupo de pacientes con SCASEST presentaba una mayor concentración plasmática de ácidos grasos saturados y una menor concentración de ácidos grasos monoinsaturados, omega 3 y omega 6.



**Figura R\_40.** Representación gráfica que refleja la mayor abundancia plasmática de ácidos grasos saturados y menor abundancia de ácidos grasos insaturados (monoinsaturados, omega 3 y omega 6) en el grupo de pacientes con SCASEST frente a los controles sanos.

Como consecuencia de la mayor concentración plasmática de ácidos grasos saturados se observó que los pacientes con SCASEST presentaban una relación entre ácidos grasos saturados e insaturados (monoinsaturados, omega 3 y omega 6) mayor que los controles sanos como puede verse en la Figura R\_41.



**Figura R\_41.** Representación gráfica que refleja la mayor relación de ácidos grasos saturados frente a ácidos grasos insaturados (monoinsaturados, omega 3 y omega 6) en el grupo de pacientes con SCASEST frente a los controles sanos.

Nuestro estudio del perfil metabólico de ácidos grasos en plasma reveló, por tanto, la existencia de perfiles diferentes y característicos en los ácidos grasos saturados e insaturados (monoinsaturados, omega 3 y omega 6) entre los dos grupos experimentales lo que está en concordancia con la buena clasificación de los diferentes individuos incluidos en el estudio obtenida mediante ACP (Figura R\_34) y los resultados obtenidos en el análisis de agrupamiento jerárquico (Figura R\_37).

Puesto que los desórdenes en las fracciones lipídicas plasmáticas constituyen un factor de riesgo cardiovascular, es posible que este perfil característico de ácidos grasos pueda tener interés clínico para el diagnóstico temprano de la enfermedad cardiovascular.

## **Discusión**



## Discusión

*La verdadera sabiduría está en reconocer la propia ignorancia*

Sócrates

En esta Tesis Doctoral se presenta por primera vez el estudio proteómico y metabolómico conjunto de muestras de plasma de pacientes con síndrome coronario agudo (SCA) frente a individuos sanos. Mediante estos estudios se han podido identificar proteínas y metabolitos implicados en el proceso fisiopatológico de esta enfermedad aportando nuevos datos que permitan, en un futuro, desarrollar nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas.

En las últimas dos décadas se han producido avances importantes en la comprensión de la fisiopatología de la aterogénesis, especialmente gracias a una mayor comprensión del papel esencial que la inflamación juega en las distintas fases del desarrollo de la placa, desde el inicio de la enfermedad hasta su fisura o rotura, dando lugar a la aparición de un SCA.

En la actualidad se le concede cada vez mayor importancia al estudio de la biología y actividad de la placa aterosclerótica que es la que confiere el riesgo a una lesión de producir un SCA, más que su grado de estenosis luminal [189]. Así se ha descubierto que las lesiones biológicamente más activas tienen una serie de características diferenciales respecto de las más quiescentes. Son características morfológicas e inflamatorias en las que tiene lugar un gran infiltrado de macrófagos y linfocitos, una gran producción de moléculas que destruyen el citoesqueleto de la placa (citocinas, metaloproteinasas, etc.) y una disminución de la síntesis de proteínas, como el colágeno, que le confieren estabilidad.

Se sabe además, que el crecimiento de la lesión aterosclerótica se acompaña de un remodelado adaptativo de la arteria lesionada, de forma que inicialmente la lesión crece hacia el exterior. En esta fase, el análisis de la luz coronaria no permite identificar

ninguna alteración, mientras que el análisis de la pared arterial sí que muestra su existencia. Por tanto, el progresivo incremento de nuestro conocimiento sobre la íntima relación existente entre inflamación y aterogénesis ha permitido una mayor comprensión de la fisiopatología de esta enfermedad [190, 191] y ha dado lugar a la aparición de un gran número de estudios que han permitido descubrir posibles marcadores de enfermedad y nuevas dianas terapéuticas que permitan, en su conjunto, establecer un mejor y más temprano diagnóstico e iniciar un tratamiento adecuado que mejore el pronóstico de supervivencia de los pacientes.

En los estudios de proteómica se puede detectar la composición/estructura de las proteínas, los cambios conformacionales, las alteraciones moduladoras durante el desarrollo y las modificaciones post-traduccionales. El estudio del proteoma permite, así mismo, conocer variaciones cuantitativas de las proteínas dependiendo de su estado de desarrollo, el gasto metabólico, el estado fisiopatológico del organismo, etc., así como las interacciones con otras proteínas o con fármacos. En este sentido, y puesto que las proteínas se encuentran organizadas y expresadas en sistemas que interactúan entre sí, su estudio puede llegar a ser muy complicado debido a las múltiples interacciones que éstas tienen dentro del sistema. La proteómica permite, además, identificar proteínas individuales en mezclas complejas de miles de moléculas a partir de cantidades mínimas de muestra biológica.

Por su parte, la metabolómica permite estudiar el conjunto de los productos finales y subproductos de las vías metabólicas, llamados metabolitos, que existen en los seres humanos y otros organismos [141]. Así se conoce con el término de metaboloma al conjunto de pequeñas moléculas que componen un organismo [142]. La naturaleza de los metabolitos estudiados en un análisis metabolómico es muy amplia e incluye ácidos orgánicos, aminoácidos, aminas, azúcares, esteroides, bases de ácidos nucleicos y otras sustancias, todas ellas intermediarias del metabolismo celular.

La interpretación de los cientos o miles de metabolitos presentes en las rutas metabólicas de un organismo supone un enorme reto debido a la gran variedad de su naturaleza química. Sin embargo, es indudable que la comparación de los perfiles metabolómicos de pacientes y controles sanos supone una herramienta de gran valor para alcanzar un mayor conocimiento y una mejor comprensión de la fisiopatología de la enfermedad [144].

## 1. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE PLASMA

Tal y como habíamos visto en un estudio llevado a cabo anteriormente por nuestro grupo [188], el análisis proteómico de plasma mediante 2D-DIGE permite mejorar el rango dinámico de detección respecto a la 2-DE convencional. En esta Tesis Doctoral hemos realizado un estudio proteómico mediante 2D-DIGE de plasma deplecionado con la columna de inmutofinidat MARS Hu-14 con el objetivo de encontrar nuevos potenciales biomarcadores pronóstico y diagnóstico de SCA. Este estudio supone además un paso adelante con respecto al que ya ha realizado nuestro grupo de investigación en el que se empleó la columna MARS Hu-6 [188]. Hemos realizado también un estudio 2D-DIGE utilizando la tecnología ProteoMiner de ecualización para evaluar la posible co-depleción de proteínas que puedan estar unidas bajo condiciones fisiológicas a las proteínas mayoritarias eliminadas por la columna y un estudio 2D-DIGE para comparar el perfil proteómico de pacientes con SCACEST con respecto al de pacientes con SCASEST.

### 1.1. Análisis proteómico de plasma deplecionado en pacientes con SCASEST vs controles sanos

El análisis proteómico mediante 2D-DIGE de plasma deplecionado con la columna de afinidad MARS Hu-14 permite eliminar 8 proteínas (fibrinógeno, alfa-2-macroglobulina, alfa-1-glicoproteína ácida, IgM, apolipoproteína AI, apolipoproteína A2, complemento C3 y prealbúmina) que no fueron eliminadas por la columna MARS Hu-6 empleada en los estudios realizados anteriormente por nuestro grupo [188].

El análisis de componentes principales (ACP) de las manchas proteicas que presentaron variaciones significativas entre los dos grupos experimentales tras realizar el análisis estadístico mediante una *t-Student* ( $p \leq 0.05$ ), nos proporcionó una distribución de las muestras incluidas en el estudio en dos grupos perfectamente diferenciados (Figura R\_03). La primera componente principal separó de manera manifiesta las muestras de pacientes con SCASEST de los controles sanos lo que demuestra que tanto el diseño experimental como las muestras seleccionadas en el estudio fueron correctos.

Las 23 proteínas diferencialmente expresadas se agruparon en cinco grupos funcionales atendiendo a su posible implicación en el desarrollo del SCA, proteínas de transporte, inflamación e inmunidad, coagulación, proteasas y otras funciones.

### 1.1.1. Proteínas de transporte

La *ceruloplasmina* es una proteína de 122 KDa perteneciente a la familia de las multicuprooxidases que se sintetiza principalmente en el hígado, aunque también es producida por otros tipos celulares como monocitos, astrocitos y células de Sertoli. Se caracteriza desde el punto de vista estructural por presentar tres tipos de sitios de unión para el cobre, y desde el punto de vista funcional, por catalizar la reducción de una molécula de oxígeno con formación de una de agua, sin liberación de intermediarios potencialmente tóxicos [192]. En nuestro estudio, la ceruloplasmina se encontró significativamente disminuía en los pacientes con SCASEST, disminución que fue validada mediante SRM (Figura R\_09). Es posible que los niveles disminuidos de esta proteína debido a su capacidad para catalizar la reducción de moléculas de oxígeno lleven consigo un aumento de oxígeno libre y con ello la oxidación tisular que favorezca el proceso aterogénico. No obstante serán necesarios nuevos estudios que confirmen el papel de la ceruloplasmina en el desarrollo del SCA.

La *hemopexina* (51 KDa) es la proteína plasmática con mayor afinidad de unión al grupo hemo. Se expresa principalmente en el hígado, y pertenece a los reactantes de fase aguda, cuya síntesis es inducida después de la inflamación [193]. Se ha descrito en diversos estudios como determinadas hemoproteínas son desencadenantes activos de la peroxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL), lo que contribuye al desarrollo de la aterosclerosis [194-196]. En este sentido, la hemopexina por tanto jugaría un papel de protección frente a la oxidación de la apolipoproteína B y las LDL provocada por cualquier hemoproteína como la hemoglobina [194, 196]. En este sentido, la hemopexina puede actuar por tanto, como un antioxidante extracelular contra el daño mediado por la hemoglobina en los estados inflamatorios como el que tiene lugar durante la aterosclerosis. Acorde a este planteamiento, nuestros pacientes con SCASEST presentaban niveles claramente disminuidos de hemopexina en comparación al grupo de controles sanos (DIGE ratio P/C = -2.37), diferencia que fue comprobada mediante inmunodetección bidimensional (Figura R\_08).

En nuestro estudio, los pacientes con SCASEST presentaban niveles significativamente disminuidos de la *proteína de unión a retinol-4 (RBP4)*. Se trata de una proteína secretada por adipocitos que ha sido asociada recientemente con la resistencia a la insulina y muchos de los componentes del síndrome metabólico en sujetos con diabetes mellitus tipo 2 u obesidad [197, 198]. La asociación de la resistencia a la insulina y el

síndrome metabólico con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular es bien conocido y constituye un enlace fisiopatológico entre la obesidad, aterosclerosis, y las complicaciones cardiovasculares [199-201]. A pesar de ello, el papel de la RBP4 en las complicaciones cardiovasculares todavía no se conoce completamente y se están desarrollando estudios con modelos animales que permitan entender la asociación de esta proteína con citoquinas pro-inflamatorias y lipoproteínas de baja densidad (LDL) [202-204].

La *proteína de unión a vitamina D* es la proteína encargada del transporte de metabolitos de la vitamina D en la sangre. Adicionalmente, también se une a ácidos grasos y monómeros de actina, impidiendo su polimerización que podría ser perjudicial en el sistema circulatorio [205]. Los beneficios conocidos de la vitamina D sobre la salud ósea y la regulación inmunológica, ha aumentado el interés en la proteína de unión a vitamina D dado su papel en el mantenimiento de los niveles totales de vitamina D en el organismo y en la regulación de las cantidades de libre (no unida) de vitamina disponible para los tejidos y las células. Varios estudios han demostrado que la deficiencia de vitamina D se asocia con las enfermedades cardiovasculares y sus factores de riesgo como la diabetes mellitus tipo II y el empeoramiento de la función renal, constituyendo por tanto un factor de riesgo en sí mismo independiente para eventos cardiovasculares, en particular para los accidentes cerebrovasculares y SCA [206-211]. En nuestro estudio, la proteína de unión a vitamina D presentó niveles disminuidos en los pacientes con SCASEST al igual que el resto de proteínas transportadoras que se encontraron significativamente alteradas en el experimento 2D-DIGE confirmando los estudios publicados hasta la fecha respecto a que niveles disminuidos de esta proteína se asocian con enfermedades cardiovasculares.

Las apolipoproteínas son la parte proteica de las lipoproteínas que generalmente se combinan con los lípidos. La *apolipoproteína A-I* (ApoA-I) está asociada con lipoproteínas de alta densidad (HDL) mientras que la apolipoproteína B (ApoB) se asocia con las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Las lipoproteínas HDL y su principal proteína apolipoproteína AI tienen un efecto protector contra la aterosclerosis a través de varios mecanismos, incluyendo la capacidad de mediar en el transporte inverso de colesterol [212]. En modelos animales se ha observado que una sobreexpresión de ApoA-I y un aumento de los niveles de HDL se relacionan con una reducción significativa en el proceso aterosclerótico [213, 214]. La ApoA-I activa la

enzima lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT), la cual cataliza la esterificación del colesterol que es transportado al hígado para ser metabolizado y excretado. Por tanto, niveles bajos de ApoA-I como los que obtuvimos en nuestro experimento en los pacientes con SCASEST pueden constituir un factor de riesgo para la aterosclerosis, aún con concentraciones normales de ApoB.

La *apolipoproteína A-IV* (ApoA-IV) es una glicoproteína de 46 kDa sintetizada principalmente en las células epiteliales (enterocitos) del intestino delgado durante la absorción de las grasas. Posteriormente, entra en el compartimento de plasma como una proteína estructural de los quilomicrones, de las lipoproteínas de muy baja densidad de lipoproteínas (VLDL) y de las lipoproteínas HDL. A pesar de que la ApoA-IV es una lipoproteína circulante importante, su función fisiológica no se conoce completamente [215]. Varios estudios han señalado que desempeña un papel importante en el transporte reverso del colesterol [216], puede actuar como una señal fisiológica de saciedad postprandial [217], y que tiene propiedades antioxidantes y anti-aterogénicas [218]. Así, se han descrito cambios en la concentración sérica de ApoA-IV en pacientes con diversos trastornos como el síndrome de mala absorción, pancreatitis crónica [219] y enfermedad renal [220]. De manera similar a la ApoA-I es posible que los niveles disminuidos de ApoA-IV encontrados en los pacientes con SCASEST supongan un factor de riesgo para la aterosclerosis debido a su papel en el transporte reverso del colesterol.

La *apolipoproteína E* (ApoE) es una proteína multifuncional glicosilada de 36 KDa que se caracteriza por su amplia distribución tisular. A pesar de su importancia en el transporte de lípidos y la patogénesis de la aterosclerosis [221], la ApoE se asocia también con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson [222] y trastornos autoinmunes, como la esclerosis múltiple y la psoriasis [223]. Entre otros, el papel de la ApoE en la modulación de la inflamación y la oxidación es fundamental para dilucidar los factores de riesgo de las enfermedades mencionadas ya que su función está estrechamente relacionada con las citoquinas pro-inflamatorias y antiinflamatorias. En modelos animales, los ratones deficientes en ApoE presentaban niveles plasmáticos de colesterol elevados, como consecuencia de un catabolismo incorrecto de las lipoproteínas ricas en colesterol [224]. Estos ratones desarrollaban además lesiones ateroscleróticas complejas mientras que si se les aportaba ApoE [225-227] se reducían sus niveles de colesterol en plasma, proporcionándoles

además protección contra la progresión de la aterosclerosis lo que está acorde con los resultados de nuestro estudio donde encontramos niveles disminuidos de ApoE en el grupo de pacientes con SCASEST.

### **1.1.2. Proteínas de inflamación y respuesta inmune**

La proteína *inter alfa tripsina inhibidor cadena pesada H4 (ITIH4)* pertenece a la familia de la inter alfa tripsina inhibidor cadena pesada (ITIH). No se conoce exactamente cuál es su función y se piensa que puede estar involucrada en el transcurso de la fase aguda de las enfermedades ya que ha sido encontrada elevada en suero de pacientes que habían sido sometidos a cirugía así como en diferentes procesos tumorales [228-230]. En nuestro estudio esta proteína se identificó en cinco manchas proteicas diferencialmente expresadas. En cuatro de ellas, la proteína se encontraba elevada mientras que en una presentaba niveles de expresión disminuidos en el grupo de pacientes con SCASEST frente al grupo de controles sanos. Mediante SRM, la ITIH4 presentó niveles disminuidos en el grupo de pacientes. Puesto que no existe un conocimiento claro de cuál es la función de esta proteína y su implicación en la fase aguda, se necesitan estudios posteriores que clarifiquen su papel en el proceso inflamatorio y en el SCA.

La *alfa-1-antiquimiotripsina* es una alfa globulina glicoproteína del grupo de las serpinas, cuya función principal se basa en controlar la actividad de las serinproteasas [231]. Pertenece al grupo de proteínas de fase aguda presentando niveles plasmáticos elevados en plasma en respuesta a procesos de inflamación [232-234]. Esta proteína ha sido, además, encontrada significativamente aumentada en plasma de pacientes con estenosis aórtica degenerativa (EAD) por nuestro grupo de investigación y ha sido patentada como marcador pronóstico y diagnóstico de EAD. En nuestro estudio, esta proteína presentó niveles de expresión significativamente elevados en pacientes con SCASEST lo que indica la existencia de un proceso inflamatorio inherente al proceso aterosclerótico. Por lo tanto, estos resultados obtenidos en EAD y SCA por nuestro grupo de investigación permiten plantear nuevas líneas de investigación para estudiar tanto la posible relación entre EAD y la aterosclerosis como las diferencias entre ambos procesos, lo cual es un paso previo necesario para el desarrollo de nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas específicas.

El *kininógeno-1* es una proteína multifuncional que participa en la vía intrínseca de la coagulación formando parte del sistema Kalikreína-Kininas [235, 236] inhibiendo la

agregación de plaquetas inducida por trombina y plasmina [237, 238]. Nuestro grupo ha encontrado previamente, niveles de expresión de esta proteína aumentados en el plasma de pacientes estables respecto a los controles sanos lo que podría favorecer la inhibición de la coagulación y evitar a la vez la progresión de la aterosclerosis [188]. En nuestro estudio obtuvimos cuatro manchas proteicas que fueron identificadas como kininógeno-1. Tres de ellas presentaban una expresión estadísticamente disminuida en pacientes con SCASEST y una estaba aumentada. En la validación por SRM se encontró una expresión disminuida en pacientes lo que concuerda con los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo, ya que niveles plasmáticos disminuidos de kininógeno-1 podrían favorecer la agregación plaquetaria y la progresión de la aterosclerosis.

La *proteína 1 relacionada con el complemento factor H* no tiene una función definida pero se cree que puede estar relacionada con la activación del complemento y también estar asociada a lipoproteínas jugando un papel en la regulación del metabolismo lipídico. El *complemento factor H*, por su parte, participa en la vía del complemento actuando como cofactor en la inactivación de C3b. Ambas se encontraron disminuidas en el grupo de pacientes con SCASEST. Análogamente a lo descrito anteriormente, nuestro grupo ya había descrito previamente disminución de los niveles plasmáticos del complemento factor H a los 4 días y a los 6 meses de producirse el SCA [188]. Por su parte, el *complemento C1r* es una serin proteasa que se combina con C1q y C1s para formar el complemento C1, el primer componente de la vía clásica del sistema del complemento (Figura D\_01). En anteriores estudios nuestro grupo había encontrado una especie proteica de esta proteína disminuida dos meses después del episodio agudo [188]. En nuestro experimento, el complemento C1r presentó un aumento estadísticamente significativo mientras que un fragmento de esta proteína estaba disminuido. Los datos obtenidos en nuestro experimento junto con los obtenidos previamente por nuestro grupo, muestran que el SCA modifica el sistema del complemento, pero no aclaran las consecuencias de esta modificación, por lo que se requieren futuras investigaciones que esclarezcan su función en esta patología.

La *fibronectina* es una proteína de 262 KDa involucrada en múltiples funciones celulares como son la adhesión, motilidad y mantenimiento de su estructura. Los pacientes con SCA muestran una elevación de los niveles plasmáticos de fibronectina frente al grupo de controles sanos. No está muy estudiado cual puede ser la relación entre valores de expresión alterados de la fibronectina y el desarrollo de la

aterosclerosis, aunque es posible que exista una relación entre los niveles elevados de esta proteína y la migración de células musculares durante el proceso aterosclerótico. No obstante, es necesario llevar a cabo nuevas investigaciones que clarifiquen el papel que esta proteína puede tener en el desarrollo del SCA.

### 1.1.3 Proteínas de coagulación

La *antitrombina III* es un inhibidor de la cascada de coagulación sanguínea que actúa inhibiendo entre otras a la trombina, y a los factores IXa, Xa y XIa. En nuestro experimento encontramos dos manchas proteicas cuyo nivel de expresión se encontraba en una de ellas aumentado y en otra disminuida en pacientes con SCASEST. En la validación por inmunodetección se obtuvieron valores disminuidos de expresión de esta proteína en el grupo de pacientes con SCASEST lo que sugiere que la falta de antitrombina III puede contribuir a la aparición de coágulos sanguíneos que a través de la obstrucción de la luz arterial desencadenen la aparición de un SCA. También encontramos niveles de expresión disminuidos en pacientes con SCASEST en otra proteína inhibidora de la trombina, la *heparina cofactor 2* cuyo déficit, de manera análoga a lo explicado en el caso de la antitrombina III, podría contribuir a la aparición de coágulos sanguíneos.

El *fibrinógeno* es una proteína directamente implicada en la cascada de la coagulación, fundamental en la formación de la fibrina la cual participa directamente en la formación del trombo [239] y en los mecanismos que provocan agregación plaquetaria [240]. En este sentido, se ha comprobado que los niveles de fibrinógeno están elevados en el plasma de pacientes con cardiopatía isquémica respecto a controles sanos [241-244], llegando a relacionar los niveles elevados de fibrinógeno con una mayor tasa de isquemia recurrente [245]. Nuestro grupo ya había encontrado en experimentos previos alteraciones en los niveles de expresión de múltiples isoformas de fibrinógeno gamma algunas de las cuales se hallaban disminuidas y otras aumentadas [188]. En este caso encontramos una única mancha proteica correspondiente a fibrinógeno gamma cuyos niveles de expresión se encontraban disminuidos en pacientes con SCASEST, resultado que fue posteriormente validado mediante inmunodetección (Figura R\_08). Esta aparente discrepancia de los niveles de expresión de la proteína hace que nuestros resultados sean difíciles de interpretar y consideramos necesario realizar nuevos estudios para tratar de esclarecerlos.

La *alfa-2-macroglobulina* es una de las catorce proteínas mayoritarias del plasma que teóricamente debe deplecionar la columna MARS Hu-14. Según los documentos de la casa comercial se produce una depleción del 99.6% en suero y del 99.3% en plasma de esta proteína por lo que existe una cantidad muy pequeña de proteína no deplecionada cuyos niveles de expresión pudieran aparecer alterados como así sucedió en nuestro experimento. En este caso, obtuvimos niveles aumentados de expresión de la alfa-2-macroglobulina en pacientes con SCASEST que concuerdan con resultados previamente publicados por nuestro grupo empleando una MARS Hu-6 cuyos niveles de expresión se encontraron disminuidos a los 4 días de producirse el evento coronario y elevados a los 6 meses [188]. De manera análoga a los descrito anteriormente con el fibrinógeno gamma parece existir una discrepancia de los niveles de expresión de la proteína en diferentes momentos (t=0, t=4 días y t=6 meses) tras producirse el evento coronario lo hace que estos resultados sean difíciles de interpretar y requieran nuevos estudios.

#### **1.1.4. Proteasas**

La *beta-Ala-His dipeptidasa* y la *cadena catalítica de la carboxipeptidasa N* son dos proteínas con actividad proteolítica cuyos niveles de expresión se encontraron disminuidos en caso de la cadena catalítica de la carboxipeptidasa N y aumentados en caso de la beta-Ala-His dipeptidasa, si bien en ambos casos, no está descrito su papel en el desarrollo del SCA.

Por su parte la *alfa-2-glicoproteína rica en leucina* cuya función es desconocida presentó niveles de expresión disminuidos en pacientes con SCASEST. Esta proteína ha sido encontrada previamente por nuestro grupo en plasma deplecionado utilizando la columna MARS Hu-14 en pacientes con estenosis aórtica degenerativa (EAD) [246]. A diferencia de los encontrado en nuestro experimento, en este caso la alfa-2-glicoproteína rica en leucina presentaba niveles de expresión ligeramente aumentados (ratio P/C DIGE=1.51) por lo que pensamos que pueda jugar un papel en el desarrollo del proceso inflamatorio subyacente en ambas patologías (EAD y SCA) aunque se requieren futuros estudios que clarifiquen su papel en ambas enfermedades.

## 1.2. Análisis proteómico de plasma ecualizado en pacientes con SCASEST vs controles sanos

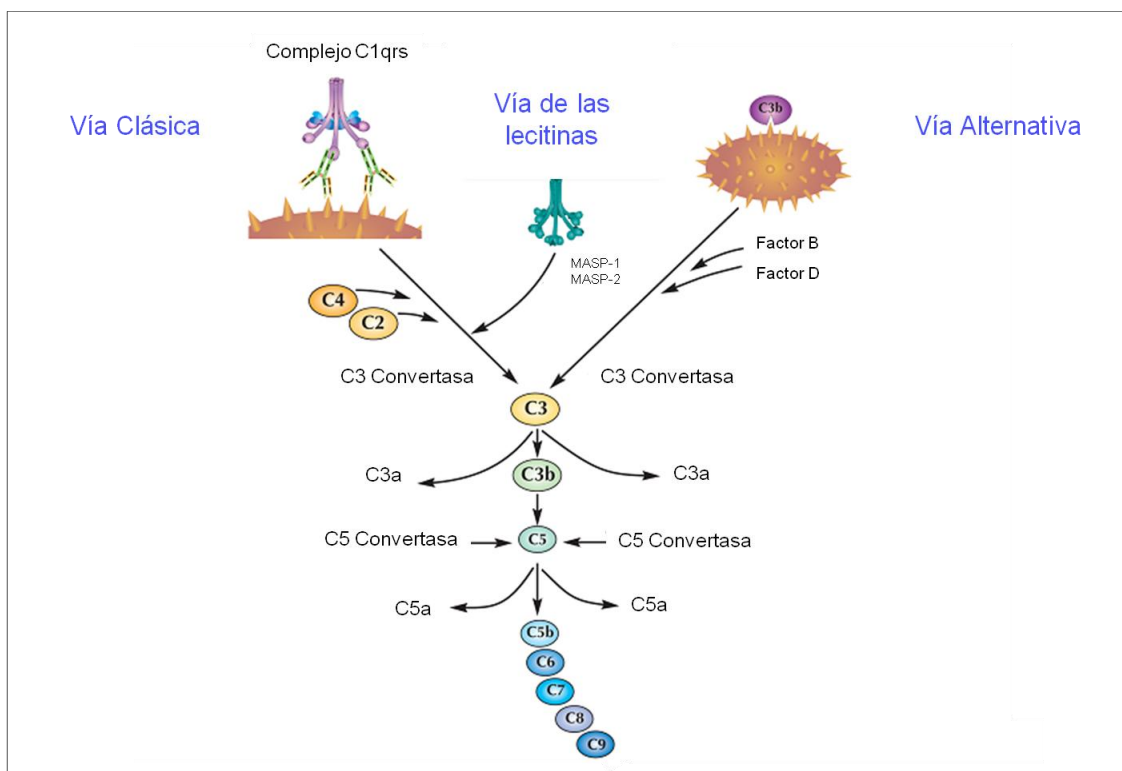
La principal ventaja de la utilización de la columna de afinidad MARS Hu-14 reside en que permite eliminar entre un 97.5% y un 99% de las 14 proteínas más abundantes del plasma lo que corresponde al 94% de su contenido proteico total. Sin embargo, a pesar de que la utilización de columnas de afinidad para la depleción de las proteínas mayoritarias sea actualmente el método más utilizado para la búsqueda de nuevos biomarcadores plasmáticos, esta técnica presenta una desventaja fundamental que consiste en la posible co-depleción de proteínas que puedan estar unidas bajo condiciones fisiológicas a las proteínas mayoritarias eliminadas por la columna [247]. Para evaluar el alcance de este problema, se llevó a cabo el estudio proteómico de plasma de pacientes con SCASEST utilizando un método alternativo para la eliminación de proteínas mayoritarias. El método elegido fue la tecnología ProteoMiner (BioRad) la cual permite la ecualización de las proteínas presentes en una muestra mediante su unión selectiva a hexapéptidos específicos, que actúan de ligandos para las proteínas de las muestras (Figura MM\_04) reduciendo el rango dinámico de concentración ya que disminuye la concentración de las proteínas más abundantes y enriquece la muestra en proteínas menos abundantes.

Empleando esta tecnología se encontraron en el experimento 2D-DIGE, 21 manchas proteicas diferencialmente expresadas de las cuales se identificaron 12 que dieron lugar a 11 proteínas diferentes (Tabla D\_01). De estas, tan sólo el *fibrinógeno gamma* se encontró alterado en plasma de pacientes con SCASEST frente a controles sanos utilizando ambos procedimientos (depleción y ecualización). En este caso esta proteína presentó niveles de expresión aumentados en los pacientes con SCASEST a diferencia de lo ocurrido en plasma deplecionado que presentaba niveles de expresión disminuidos en este grupo experimental, pero estando sin embargo este resultado en la línea de los resultados publicados por otros autores [241-244]. La otra proteína de coagulación cuyos niveles de expresión estaban alterados fue el *factor XIII de coagulación cadena B* que se encontró disminuida en pacientes con SCASEST. Se trata de una proteína compuesta por 2 subunidades A y 2 subunidades B presente en el plasma, los megacariocitos, las plaquetas y los monocitos, cuya función principal es establecer enlaces covalentes en el polímero de fibrina soluble originando una estructura tridimensional más estable y resistente a la fibrinólisis [248, 249]. También protege a la

fibrina recién formada de la fibrinólisis, principalmente por reticulación de la alfa-2-plasmina inhibidor a la fibrina. Además de los efectos protrombóticos anteriores, el factor XIII de coagulación limita el crecimiento del trombo al disminuir la adhesión de las plaquetas a la fibrina. Atendiendo a su función limitante del crecimiento del trombo, es posible que los niveles disminuidos de esta proteína observados en el grupo de pacientes con SCACEST puedan propiciar un estado protrombótico que dé lugar a la aparición de un SCA.

En el grupo de proteínas relacionadas con la inflamación y la respuesta inmunitaria clasificamos al *complemento C4-A*, *complemento C4-B*, *proteína de unión a C4b cadena alfa*, *región C de la IgM* y la *lecitina serina proteasa 2 de unión a manano*.

El sistema del complemento se compone de más de 30 proteínas plasmáticas que actúan conjuntamente para generar productos con propiedades inmunoprotectoras y proinflamatorias [250]. Se trata de un sistema de defensa citotóxico e innato que normalmente funciona para eliminar agentes extraños y patógenos. Sin embargo, existen evidencias que sugieren que el complemento juega además un papel clave en la fisiopatología de los SCA [251]. En nuestro experimento encontramos niveles de expresión disminuidos en el *complemento C4-A*, *complemento C4-B* y *proteína de unión a C4b cadena alfa* mientras que la *proteína lecitina serina proteasa 2 de unión a manano* estaba elevada en el grupo de pacientes con SCASEST. Estos hallazgos están en la línea de los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo en los que los factores B y H, ambos implicados en la ruta alternativa del complemento, presentaban alteraciones en sus niveles plasmáticos cuatro días después del episodio agudo. El factor B estaba elevado y el factor H mostraba una isoforma elevada y otra disminuida, que también lo estaba a los seis meses. El componente C3 de la ruta clásica estaba ligeramente elevado en los pacientes estables [188]. También hemos encontrado en nuestro grupo de investigación disminuciones de los niveles de expresión de especies proteicas del complemento C4-B en EAD en experimentos 2D-DIGE de plasma ecualizado con ProteoMiner [246]. Estos datos muestran que el SCA modifica el sistema del complemento, si bien no está claro como se produce esta modificación ni sus consecuencias.



**Figura D\_01.** La activación del complemento por la vía clásica se inicia con la activación del complejo C1qrs por complejos antígeno-anticuerpo. Este complejo ataca enzimáticamente a C4, que al adquirir a su vez actividad proteolítica, produce la hidrólisis de C2, que al ser activado, es capaz de degradar enzimáticamente a C3.

La *región C de la IgM* es un fragmento de la cadena pesada de la inmunoglobulina M cuyos niveles de expresión se encontraron elevados en el plasma ecualizado de pacientes con SCASEST. En nuestro grupo de investigación no se ha descrito anteriormente alteraciones en esta proteína en pacientes SCA sin embargo si hemos encontrado igualmente elevaciones de sus niveles de expresión en pacientes con EAD [246]. Estos resultados parecen indicar la existencia de una respuesta inmunitaria tanto en SCA como en EAD lo que de nuevo demostraría la existencia en un proceso inflamatorio inherente al desarrollo de la aterosclerosis y la estenosis.

La disminución en los niveles de expresión encontrados en la *proteína convertasa subtilisin/kexin tipo 9* y *clusterina (apoJ)* están en la línea de los resultados obtenidos en nuestros estudios previos en SCA. La clusterina es una glicoproteína presente en una subpoblación de las partículas HDL junto con la paraoxonasa y la apolipoproteína AI [252, 253]. Aunque su función no está clara todavía, se le ha relacionado con la regulación del complemento [254], respuesta de fase aguda [255], transporte de lípidos [256], apoptosis [257-260] y protección de membranas en las interfases tejido-fluido

donde se expresa [261]. Estas propiedades sugieren que la clusterina podría proteger el endotelio vascular contra factores como los componentes finales de la cascada del complemento [262]. La clusterina también se ha detectado en las lesiones ateroscleróticas y su expresión aumenta con la progresión de la aterosclerosis [263]. Además, se ha comprobado que la expresión de esta proteína se induce en las células del músculo liso vascular tras el daño vascular y que dicha expresión estimula la proliferación y la migración de las mismas [264, 265]. Los resultados obtenidos en plasma ecualizado están directamente relacionados con los obtenidos en plasma deplecionado donde se encontraron niveles de expresión disminuidos en otras apolipoproteínas, concretamente las *apolipoproteínas AI, AIV y E*. Por su parte la función principal de la *proteína convertasa subtilisin/kexin tipo 9* parece estar relacionada con la diferenciación neuronal aunque también se cree que puede estar implicada en la homeostasis del colesterol, lo cual le conferiría un papel en el desarrollo de la aterosclerosis.

Encontramos también niveles de expresión aumentados en la *actina citoplasmática 2*. Se sabe que uno de los sucesos clave en el proceso aterogénico es la proliferación y migración de las células musculares lisas. Mediante experimentos 2-DE se han identificado mediadores de plegamiento proteico (HSP60, HSP70, proteína disulfuroisomerasa) y de síntesis proteica (factor de elongación EF-1 $\beta$ ) entre las proteínas aumentadas por la exposición a factores de crecimiento, junto con proteínas del citoesqueleto (vimentina y actina) asociados a crecimiento hiperplásico o hipertrófico de la placa [266]. Los niveles de expresión aumentados en la actina citoplasmática 2 podrían indicar por tanto un aumento en la proliferación y migración de las células musculares lisas como factor clave del desarrollo de la placa aterosclerótica.

Por último, la *proteína 3 con dominio EH*, presentó niveles de expresión disminuidos en pacientes con SCASEST. Se trata de miembro de la familia de proteínas con dominio EH las cuales desarrollan diversas funciones en el tráfico intracelular por lo que su función en el desarrollo del SCA deberá ser investigado en futuros estudios.

Proteína	Nº de acceso	SCASEST		SCACEST
		Deplección	Proteominer	Deplección
Actina citoplasmica 2	ACTG_HUMAN		Sí	
Alfa-1-antiquimotripsina	AACT_HUMAN	Sí		
Alfa-1B-glicoproteína	A1BG_HUMAN			Sí
Alfa-2-glicoproteína rica en leucina	A2GL_HUMAN	Sí		
Alfa-2-macroglobulina	A2MG_HUMAN	Sí		
Anhidrasa carbónica	CAH1_HUMAN			Sí
Antitrombina-III	ANT3_HUMAN	Sí		Sí
Apolipoproteína A-I	APOA1_HUMAN	Sí		
Apolipoproteína A-IV	APOA4_HUMAN	Sí		
Apolipoproteína E	APOE_HUMAN	Sí		
Beta-2-glicoproteína 1 (ApoH)	APOH_HUMAN			
Beta-Ala-His dipeptidasa	CNDP1_HUMAN	Sí		
Carboxipeptidasa N cadena catalítica	CBPN_HUMAN	Sí		
Ceruloplasmina	CERU_HUMAN	Sí		
Clusterina	CLUS_HUMAN		Sí	
Complemento C1r	C1R_HUMAN	Sí		
Complemento C4-A	CO4A_HUMAN		Sí	
Complemento C4-B	CO4B_HUMAN		Sí	
Complemento factor H	CFAH_HUMAN	Sí		
Factor XIII de coagulación cadena B	F13B_HUMAN		Sí	
Fibrinógeno gamma	FIBG_HUMAN	Sí	Sí	
Fibronectina	FINC_HUMAN	Sí		Sí
Ficolina-3	FCN3_HUMAN	Sí		
Haptoglobina	HPT_HUMAN			Sí
Hemopexina	HEMO_HUMAN	Sí		Sí
Heparina cofactor 2	HEP2_HUMAN	Sí		
Inter-alfa-inhibidor de la tripsina cadena pesada H1	ITIH1_HUMAN			Sí
Inter-alfa-inhibidor de la tripsina cadena pesada H2	ITIH2_HUMAN			Sí
Inter-alfa-inhibidor de la tripsina cadena pesada H4	ITIH4_HUMAN	Sí		
Kallistatina	KAIN_HUMAN			Sí
Kininógeno-1	KNG1_HUMAN	Sí		
Lecitina serina proteasa 2 de unión a manano	MASP2_HUMAN		Sí	
Peroxiredoxina-2	PRDX2_HUMAN			Sí
Proteína convertasa subtilisin/kexin tipo 9	PCSK9_HUMAN		Sí	
Proteína 3 con dominio EH	EHD3_HUMAN		Sí	
Proteína de unión a C4b cadena alfa	C4BPA_HUMAN		Sí	
Proteína de unión a retinol-4	RET4_HUMAN	Sí		
Proteína de unión a vitamina D	VTDB_HUMAN	Sí		
Proteína relacionada con el complemento factor H	FHR1_HUMAN	Sí		
Región C de la IgM	IGHM_HUMAN		Sí	
Vitronectina	VTNC_HUMAN	Sí		

**Tabla D\_01.** Resumen de las proteínas diferencialmente expresadas detectadas e identificadas mediante 2D-DIGE.

Por tanto atendiendo a los resultados obtenidos en nuestros experimentos, la depleción de proteínas mayoritarias del plasma resultó ser una mejor metodología para el descubrimiento de nuevos biomarcadores ya que permitió identificar el mayor número de manchas proteicas diferencialmente expresadas (43 frente a las 21 obtenidas en plasma ecualizado) y también permitió identificar un mayor número de proteínas (23 proteínas frente a 11 obtenidas en plasma ecualizado). Sin embargo, sólo se encontró una proteína común empleando ambas metodologías lo que sugiere que la depleción y la ecualización deben utilizarse de manera complementaria en la búsqueda de nuevos biomarcadores de enfermedad.

### **1.3. Análisis proteómico de plasma deplecionado en pacientes con SCACEST vs controles sanos**

Para completar el estudio proteómico de plasma, quisimos comprobar si existía un perfil de proteínas comunes entre pacientes que habían sufrido un SCASEST y pacientes que habían sufrido un SCACEST o si por el contrario la mayor hipoxia a la cual se ve sometida el miocardio en el segundo caso y en consecuencia la mayor extensión de necrosis tisular provocaban la existencia de un perfil proteómico característico. Para ello realizamos un experimento 2D-DIGE en plasma, previamente deplecionado utilizando la columna de afinidad MARS Hu-14, en individuos con SCACEST y controles sanos. En este caso se encontraron 24 manchas proteicas diferencialmente expresadas de las cuales se identificaron 18 que dieron lugar a la identificación de 11 proteínas diferentes.

De las 11 proteínas identificadas tres, *hemopexina*, *antitrombina III* y *fibronectina* se habían encontrado también diferencialmente expresadas en plasma deplecionado de pacientes con SCASEST. Resulta llamativo que se trate de tres proteínas funcionalmente muy diferentes ya que, como se ha explicado con detenimiento anteriormente, la hemopexina es una proteína de transporte, la antitrombina III participa en el proceso de coagulación sanguínea y la fibronectina se clasificó dentro del grupo de proteínas de inflamación e inmunidad.

La familia de las *alfa tripsina inhibidor (ITI)* son proteínas con actividad inhibidora de proteasas como plasmina, tripsina y elastasa [267, 268], o cuando se incuban con células inflamatorias, en particular, los neutrófilos o células cancerosas [269, 270].

En nuestros experimentos encontramos elevación en los niveles de expresión de cuatro isoformas de la ITI cadena pesada H4 en pacientes con SCASEST (un fragmento de esta proteína se encontró disminuido) mientras que ocho isoformas de la ITI cadena pesada H2 y una de la *ITI cadena pesada H1* presentaron niveles de expresión aumentados en los pacientes con SCACEST. Dada la relación existente entre niveles plasmáticos de ITI y su relación con enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide, la cirrosis hepática y la enfermedad de Chorn [271-275], el descubrimiento de varios componentes de esta familia en nuestros experimentos pueden ser un buen marcador de la existencia de inflamación asociada al proceso aterosclerótico que desencadena SCA.

La *anhidrasa carbónica* es una enzima perteneciente a una familia de metaloenzimas que catalizan la conversión rápida de dióxido de carbono y agua a bicarbonato y

protones para mantener el equilibrio ácido-base en la sangre y otros tejidos según la siguiente reacción:



En nuestro experimento 2D-DIGE, esta enzima presentó niveles de expresión muy disminuidos (ratio P/C=-5.02). Esto puede ser debido a que la hipoxia tisular a la que se está viendo sometido el músculo cardiaco lleva consigo una situación de acidosis intracelular por la producción de ácido láctico a partir de la fermentación anaerobia del piruvato obtenido en la glucólisis. Precisamente esa situación de acidosis desplazaría el equilibrio de la reacción en sentido contrario al catalizado por la enzima de modo que el propio metabolismo disminuiría su síntesis para evitar la formación y liberación de mayor contenido ácido en las células. Por tanto dado que la anhidrasa carbónica se encontró alterada en pacientes que habían sufrido un SCACEST y no en los pacientes que habían sufrido un SCASEST, los niveles plasmáticos disminuidos de esta enzima podrían tener potencial para diferenciar la magnitud de la necrosis cardiaca en un SCA.

Al igual que ocurrió en los dos experimentos 2D-DIGE anteriores, se encontraron niveles de expresión disminuidos de apolipoproteínas en pacientes con SCACEST. La  $\beta$ -2-Glicoproteína (también conocida como Apolipoproteína H) es una proteína abundante del plasma de 50 kDa, capaz de asociarse a elementos aniónicos [276], considerada como proteína de unión a fosfolípidos. Por el momento, su papel fisiológico aún no está claro, aunque se le han atribuido un papel regulador en la coagulación [277-280], recientemente ha sido propuesto como marcador de infarto cerebral [281] y además se le han atribuido la capacidad de unirse a oxLDL, por lo que podría tratarse de una proteína antiaterogénica [282]. Por tanto los niveles de expresión disminuidos obtenidos en nuestros experimentos podrían favorecer la aparición de un estado protrombótico y favorecer a la vez la progresión de la aterosclerosis.

Al igual que ocurría con la alfa-2-macroglobulina la existencia de niveles de expresión de la *haptoglobina*, una de las catorce proteínas retenidas por la columna de depleción, pone de manifiesto el importante papel que las proteínas plasmáticas más abundantes pueden tener también como marcadores de enfermedad tal y como ya ha sido reflejado previamente por nuestro grupo en el análisis de plasma crudo en EAD [246]. La *haptoglobina* es una proteína plasmática de 45 kDa con propiedades antioxidantes debido a su unión a la hemoglobina libre evitando el daño tisular oxidativo producido

por esta. Es sintetizada principalmente por los hepatocitos, aumentando sus niveles durante la inflamación o infección, por lo tanto, su participación en estados de oxidación e inflamación ha generado un gran interés por su posible asociación con la enfermedad vascular. A pesar de tratarse de un reactante de fase aguda positivo, en nuestro experimento hemos encontrados niveles de expresión de esta proteína disminuidos en los pacientes con SCACEST. Esta aparente discordancia podría explicarse considerando que precisamente los niveles plasmáticos disminuidos de esta proteína en el grupo de pacientes contribuye a que tenga lugar el daño tisular oxidativo producido por la hemoglobina libre contribuyendo a la aparición de la enfermedad cardiovascular.

Lo mismo se observó con los niveles plasmáticos de la *alfa 1B glucoproteína*, una glicoproteína de fase aguda de 52 KDa sintetizada en el hígado como respuesta a la inflamación y daño del tejido. Esta proteína juega un importante papel en el proceso inflamatorio ya que su liberación aumenta las defensas antioxidantes y reduce la producción de citocinas inducidas por los radicales de oxígeno. Al igual que ocurría en el caso de la haptoglobina, niveles disminuidos en pacientes que han sufrido SCACEST podrían indicar la presencia de daño tisular oxidativo al carecer del efecto antioxidante protector de esta proteína.

Estrechamente unido a la haptoglobina parece estar el daño tisular oxidativo producido por niveles plasmáticos disminuidos de *peroxirredoxina-2*. Las peroxirredoxinas son proteínas antioxidantes con capacidad para proteger a otras proteínas del daño oxidativo inducido por especies de oxígeno reactivas (ROS), especialmente el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [283]. En modelos animales se ha visto que ratones *knock out* para esta proteína desarrollaban anemia hemolítica lo que a su vez implica niveles plasmáticos aumentados de hemoglobina produciéndose un doble daño tisular oxidativo [284]. En nuestro experimento la peroxirredoxina-2 presentó niveles de expresión disminuidos lo que podría estar produciendo el daño tisular en el endotelio y por tanto favoreciendo el desarrollo de la enfermedad.

Finalmente, la *kallistatina* es una proteína de 46 KDa, miembro de la superfamilia de los inhibidores de serin proteasas con diversos efectos incluyendo una potente actividad vasodilatadora, inhibición de angiogénesis y actividad antiinflamatoria [285-287]. Recientemente se ha observado que el aumento del estrés oxidativo después de un SCA

se asocia con una reducción de los niveles circulantes de kallistatina, lo que sugiere que podría estar implicada en la progresión del daño oxidativo cardíaco. Nuestros resultados concuerdan por tanto con los resultados publicados por otros autores ya que obtuvimos niveles de expresión disminuidos en los pacientes con SCACEST frente al grupo de controles sanos.

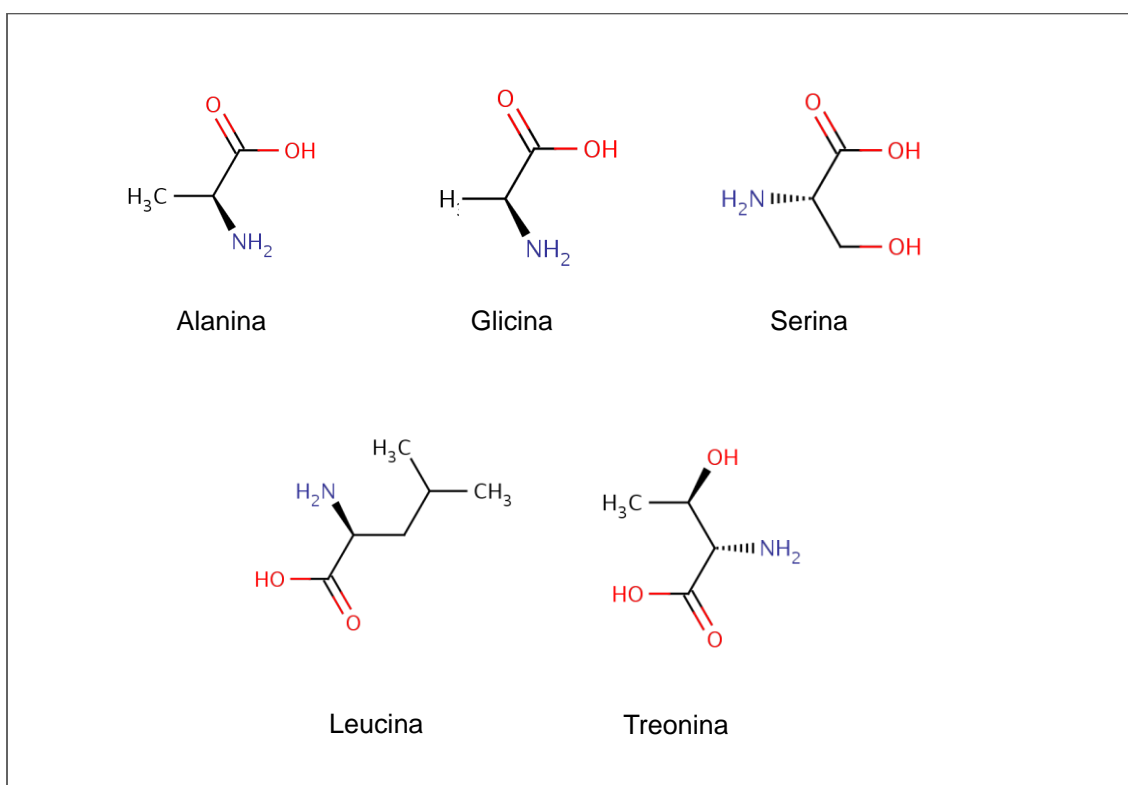
Como conclusión, vemos como los pacientes con SCACEST poseen un perfil proteómico característico que les diferencia de aquellos pacientes que han sufrido un SCASEST. A diferencia de lo que podría ser esperado de antemano, las proteínas que se encuentran diferencialmente expresadas no son proteínas estructurales que provienen de la ruptura de tejido muscular, como lo son los marcadores cardíacos clásicos de uso clínico (CK, CKMB y Trp). Entre las proteínas que conforman el perfil característico de pacientes con SCACEST destacan los niveles de expresión disminuidos de tres proteínas con actividad antioxidante (kallistatina, peroxirredoxina-2 y haptoglobina) lo que refleja la existencia de un daño oxidativo tisular que va a catalizar el daño producido, entre otros, por las ROS plasmáticas sobre el endotelio.

## 2. ANÁLISIS METABOLÓMICO DE PLASMA EN PACIENTES CON SCASEST VS CONTROLES SANOS

El análisis metabolómico completo de plasma en pacientes con SCASEST permitió identificar 11 metabolitos cuyos niveles de concentración se encontraban estadísticamente alterados entre los dos grupos experimentales a estudio. Por su parte, el análisis metabolómico de ácidos grasos en plasma permitió identificar 4 metabolitos significativamente alterados, 3 de los cuales también lo estaban en el análisis completo de plasma. Considerando ambos experimentos de manera conjunta, el análisis metabolómico de plasma permitió la identificación de 12 metabolitos que fueron clasificados según su naturaleza química en tres grupos diferentes, amino metabolitos, ácidos orgánicos/hidroxílicos y ácidos grasos.

### 2.1. Amino metabolitos

Uno de los resultados más interesantes que proporcionó el análisis metabolómico que llevamos a cabo, fue la existencia de 5 aminoácidos cuya concentración se encontraba disminuida significativamente en el grupo de pacientes con SCASEST (Figura D\_02).



**Figura D\_02.** Estructura de los amino metabolitos significativamente alterados en el análisis metabolómico de plasma de pacientes con SCASEST vs controles sanos.

La existencia de alteraciones cuantitativas en los niveles plasmáticos de aminoácidos ha sido previamente descritas en diferentes enfermedades cardiovasculares con resultados

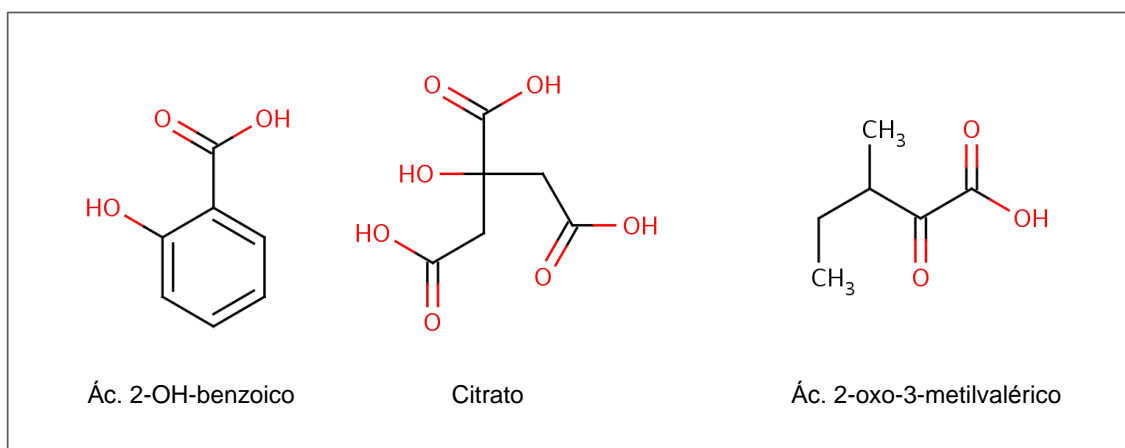
disparos [171, 288-292]. En nuestro experimento, los seis metabolitos fueron encontrados disminuidos en el grupo de pacientes con SCASEST respecto al grupo de controles sanos lo que sugiere un descenso en las rutas anabólicas de estos metabolitos o un aumento en las rutas catabólicas.

De ambas posibilidades, el aumento del catabolismo de los aminoácidos puede explicarse considerando de manera conjunta la capacidad glucogénica y cetogénica de los aminoácidos junto con la situación de hipoxia gradual a la que se ven sometidas las células del músculo cardíaco en las fases más desarrolladas de la aterosclerosis.

En general, el nitrógeno potencialmente tóxico de los aminoácidos es eliminado vía transaminación/desaminación en el ciclo de la urea. Por su parte, los esqueletos de carbono se conservan generalmente como carbohidratos, vía gluconeogénesis, o como ácidos grasos vía síntesis del ácido graso. Esto es la razón de su carácter glucogénico, cetogénico, o glucogénico y cetogénico. Los aminoácidos glucogénicos son los que dan lugar a una producción neta de piruvato o intermediarios del ciclo de Krebs ( $\alpha$ -cetoglutarato u oxaloacetato) que a su vez son precursores de la glucosa vía gluconeogénesis. Todos los aminoácidos excepto la lisina y la leucina son al menos en parte glucogénicos. La lisina y la leucina son los únicos aminoácidos que son solamente cetogénicos, dando lugar exclusivamente a acetil-CoA o a acetoacetil-CoA, ninguno de los cuales puede generar la producción neta de glucosa pero cuyos productos catabólicos si pueden incorporarse al ciclo de Krebs permitiendo la producción de energía en las células.

Ante una situación de hipoxia inicial el piruvato obtenido en la glucólisis para la obtención de energía va a sufrir parcialmente fermentación láctica debido a la falta de oxígeno, por lo que las células pueden verse obligadas a aumentar el consumo de glucosa para mantener sus niveles de producción de energía. Es posible, por tanto, que el metabolismo celular utilice bajo esta situación sus reservas de aminoácidos como fuentes de producción de energía para la formación de glucosa en caso de los glucogénicos cuyos niveles de concentración se encontraron disminuidos (alanina, glicina, serina y treonina) y como formadores de acetil-CoA en el caso de la leucina que podrán incorporarse al ciclo de Krebs en un intento de compensar el déficit de energía secundario a la hipoxia.

## 2.2. Ácidos orgánicos/hidroxicos

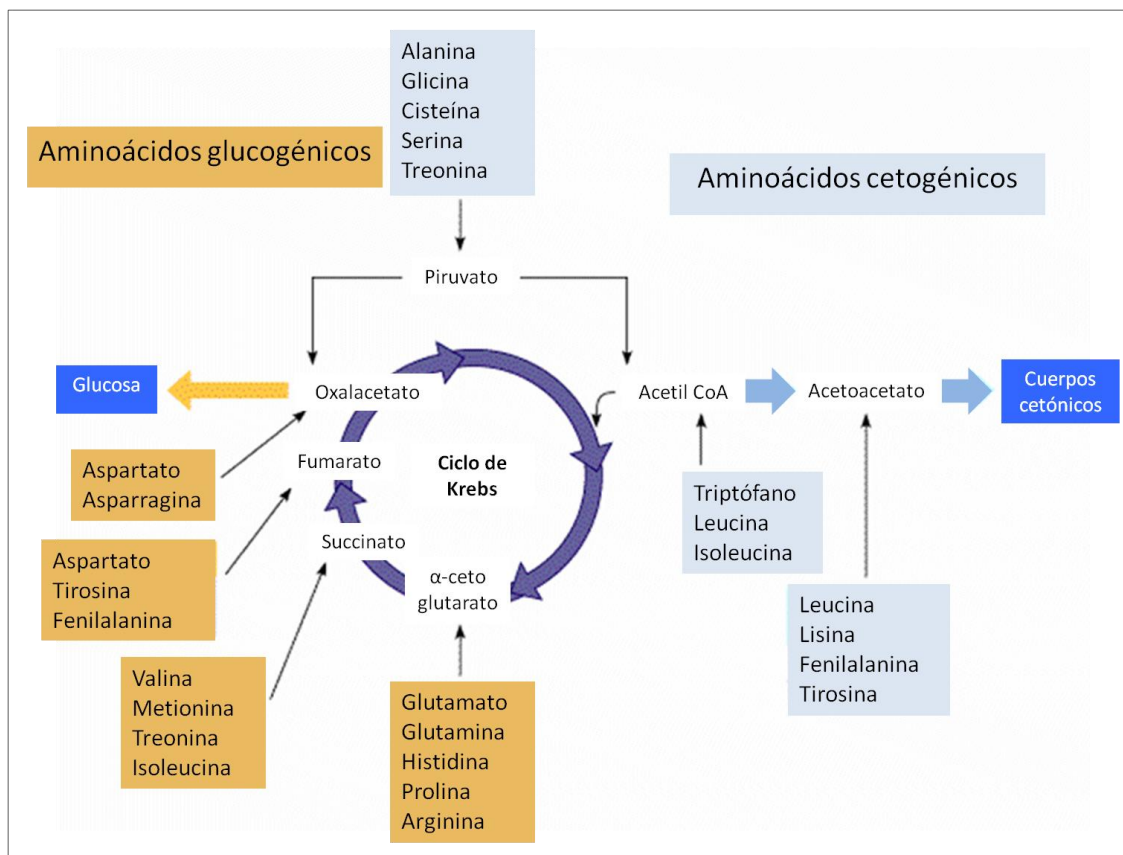


**Figura D\_03.** Estructura de los ácidos orgánicos/hidroxicos significativamente alterados en el análisis metabolómico de plasma de pacientes con SCASEST vs controles sanos.

El citrato junto con otros metabolitos del ciclo de Krebs ( $\alpha$ -cetoglutarato y oxaloacetato) han sido encontrado alterados en estudios previos en pacientes con isquemia [290, 291]. Posiblemente, estas alteraciones puedan estar relacionadas con los niveles disminuidos de aminoácidos que también observamos en el grupo de pacientes con SCASEST. Como se explicó anteriormente, pensamos que el bajo rendimiento energético que el metabolismo de la glucosa produce en las células sometidas a hipoxia debido a la fermentación láctica del piruvato obtenido en la glucólisis puede hacer que se utilicen las reservas de aminoácidos gracias a su potencial glucogénicos dando lugar a piruvato o intermediarios del ciclo de Krebs que a su vez son precursores de la glucosa vía gluconeogénesis. Por tanto la producción de intermediarios del ciclo de Krebs a partir de las reservas de aminoácidos podría explicar los niveles plasmáticos elevados de algunos de ellos y a la vez su uso como precursores de glucosa explicaría los niveles disminuidos de otros (Figura D\_04).

El 2-oxo-3-metilvalérico es un metabolito de la isoleucina utilizado como marcador urinario de la enfermedad de jarabe de arce, una enfermedad genética causada por una deficiencia en la actividad del complejo de la deshidrogenasa de alfa-cetoácidos de cadena ramificada lo que impide metabolizar los aminoácidos leucina, isoleucina y valina, lo cual lleva a una acumulación de sus metabolitos en la sangre. En nuestro análisis metabolómico encontramos niveles aumentados de 2-oxo-3-metilvalérico en pacientes con SCASEST lo que podría confirmar nuestra hipótesis de que la célula cardiaca sometida a hipoxia utiliza sus reservas de aminoácidos como fuente de energía

puesto que la isoleucina puede transformarse en acetyl CoA (Figura D\_04) el cual entraría en el ciclo de Krebs para obtener energía.



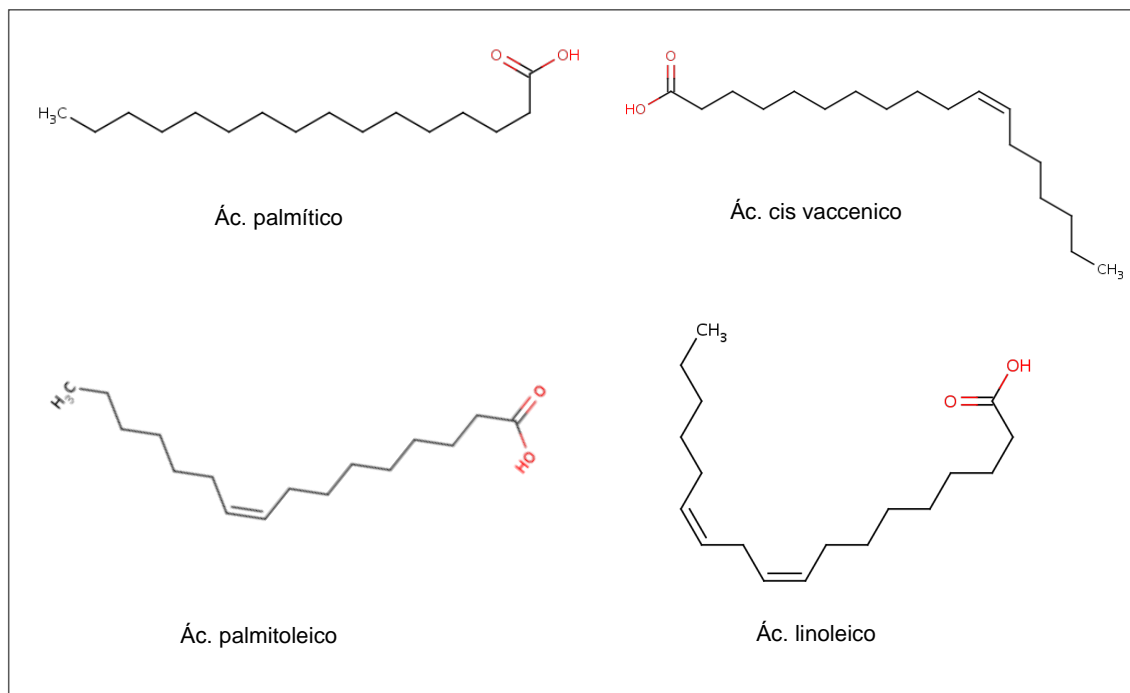
**Figura D\_04.** La falta de oxígeno en las células provoca que estas utilicen sus reservas de aminoácidos para obtener energía gracias a carácter cetogénico y glucogénico.

Por último, encontramos en el grupo de pacientes con SCASEST niveles aumentados de ácido 2-OH-benzoico (ácido salicílico), el cual es el metabolito principal del ácido acetilsalicílico (aspirina), un antiagregante utilizado como parte del tratamiento farmacológico inicial del SCA. Esto explica fácilmente por qué este metabolito se detectó únicamente en el grupo de pacientes con SCASEST y por tanto no ha sido considerado como un posible marcador de SCA.

### 2.3. Ácidos grasos

Los ácidos grasos son moléculas biológicamente activas con una amplia variedad de efectos. Durante décadas, los ácidos grasos han sido un foco de las recomendaciones dietéticas para la salud del corazón. Los ácidos grasos saturados y los ácidos grasos insaturados trans se consideran como los más perjudiciales para la salud mientras que los ácidos grasos insaturados(omega 3 y omega 6) se han considerado como

beneficiosos para el corazón si bien recientes investigaciones epidemiológicas cuestionan la existencia de estos beneficios [293].



**Figura D\_05.** Estructura de los ácidos grasos significativamente alterados en el análisis metabolómico de ácidos grasos en plasma de pacientes con SCASEST vs controles sanos.

En el estudio metabolómico de ácidos grasos en plasma encontramos cuatro metabolitos que presentaban alteraciones estadísticamente significativas entre los dos grupos experimentales, ácido palmítico, ácido trans palmitoleico, ácido cis-vaccenico y ácido linoleico (Figura D\_05). De ellos, 3 ácidos grasos, ácido palmítico, ácido trans palmitoleico y ácido cis-vaccenico se encontraron elevados en pacientes con SCASEST mientras que el ácido linoleico se encontraba disminuido en este grupo. Además, 3 de los 4 ácidos grasos significativamente alterados en este estudio (ácido palmítico, ácido cis-vaccenico y ácido linoleico) también se encontraban significativamente alterados en el estudio metabolómico completo de plasma y posteriormente fueron validados mediante GC/MS de modo que esta validación confirmó la validez de los resultados obtenidos en el estudio de ácidos grasos.

Como se puede ver en la Figura D\_05 el ácido palmítico, ácido palmitoleico y ácido cis-vaccenico que se encontraron elevados en el grupo de pacientes con SCASEST son ácidos grasos saturados y monoinsaturados lo que concuerda con los resultados descritos previamente por otros autores. Por el contrario, el ácido linoleico, un ácido

graso omega 6 se encontró disminuido en el grupo de pacientes con SCASEST lo que confirmaría su carácter protector frente a enfermedades cardiovasculares.

El primer paso en la biosíntesis de ácidos grasos es la síntesis de ácido palmítico que es precursor del los demás ácidos grasos mediante un mecanismo de alargamiento y desaturación. Diversos autores han descrito niveles plasmáticos aumentados de ácido palmítico en pacientes con SCA [294-296]. Estos resultados parecen indicar que el ácido palmítico produce una serie de alteraciones metabólicas que favorecen el desarrollo de la aterosclerosis. Así se ha identificado que la presencia de niveles plasmáticos elevados induce la secreción y expresión de ARNm de TNF-alfa, IL-1A, IL1B, IL6, IL8, CXCL2, CXCL3, CCL20 y SPP1 entre otras [297, 298] lo que demuestra su contribución al desarrollo de inflamación vascular.

Del mismo modo se ha asociado un elevado riesgo de sufrir un SCA en pacientes con niveles elevados de fosfolípidos formados ácido palmitoleico y ácido cis vaccenico [299]. La escala de riesgo Framingham muestra una asociación positiva entre la presencia aumentada de fosfolípidos que contienen ácido cis-vaccenico y valores de estimación de filtrado glomerular disminuido. Por tanto, según estos resultados altos niveles plasmáticos de fosfolípidos formados por ácido cis-vaccenico provocarían un daño renal el cual contribuye como un factor de riesgo a la aparición de un SCA. A pesar de estos resultados son necesarios nuevos estudios que expliquen por qué este tipo concreto de fosfolípidos producen daño renal y su contribución al desarrollo de un SCA.

En nuestro estudio encontramos niveles de ácido linoleico disminuidos en pacientes con SCASEST. A pesar del efecto protector y cardiosaludable que se le ha atribuidos históricamente a los ácidos grasos omega 3 y omega 6, los resultados obtenidos por estudios recientes revelan su posible efecto pro-aterogénico y pro-inflamatorio. Así se ha descubierto que el ácido linoleico activa las células endoteliales a través de diversos mecanismos y actúa como un agente pro-aterogénico y pro-inflamatorio además de activar al el factor nuclear-kappa B (NF-kB) y aumentar la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales en medios de cultivo [300, 301]. Sin embargo también se sabe que el ácido linoleico tiene un efecto beneficioso sobre la función renal, retrasando la aparición de insuficiencia renal gracias a una disminución en la concentración de moléculas inflamatorias [302]. Es posible por tanto, que la presencia de las distintas fracciones de ácidos grasos tenga efectos diferentes en cada parte del

organismo, por lo que se requieren nuevos estudios que permitan descubrir el papel que niveles aumentados o disminuidos de los ácidos grasos pueden tener sobre el desarrollo del SCA.

## **Conclusiones**



# Conclusiones

*No basta con alcanzar la sabiduría, es necesario saber utilizarla*

Marco Tulio Cicerón

- 1) La depleción de las proteínas mayoritarias del plasma humano utilizando un sistema cromatográfico de inmutofinidat constituye un método eficaz y reproducible que permite estudiar la expresión de las proteínas menos abundantes mediante electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE).
- 2) La ecualización de las proteínas del plasma humano utilizando el sistema comercial ProteoMiner (BioRad) constituye un método eficaz y reproducible que permite estudiar la expresión de las proteínas menos abundantes mediante 2D-DIGE.
- 3) La depleción y la ecualización son dos métodos de pre-tratamiento de la muestra que permite disminuir el rango dinámico del plasma y que ofrecen resultados complementarios en la búsqueda de nuevos biomarcadores de SCA.
- 4) El análisis mediante 2D-DIGE del plasma deplecionado en pacientes con SCASEST mostró 23 proteínas diferencialmente expresadas respecto a los individuos sanos. Por su parte, el análisis mediante 2D-DIGE del plasma ecualizado en pacientes con SCASEST mostró 11 proteínas diferencialmente expresadas respecto a los individuos sanos.
- 5) El análisis mediante 2D-DIGE del plasma deplecionado en pacientes con SCACEST mostró 11 proteínas diferencialmente expresadas respecto a los individuos sanos de las cuales tres, antitrombina III, fibronectina y hemopexina aparecían también diferencialmente expresadas en el análisis mediante 2D-DIGE del plasma deplecionado en pacientes con SCASEST.
- 6) Los resultados obtenidos mediante 2D-DIGE muestran la existencia de un perfil proteómico diferente y característico en los pacientes con SCACEST frente al que poseen los pacientes con SCASEST.

7) En conjunto, los datos obtenidos mediante 2D-DIGE revelan la existencia de 41 proteínas diferencialmente expresadas en el plasma de pacientes con SCA frente a controles sanos las cuales están implicadas en varios procesos fisiológicos, tales como la coagulación, la inflamación y respuesta inmune, el metabolismo, el transporte y la inhibición de proteasas.

8) El uso combinado de la inmunodetección y la técnica de monitorización de reacción seleccionada (SRM), permitió llevar a cabo la validación de 21 proteínas que se encontraron diferencialmente expresadas en SCA mediante 2D-DIGE.

9) La cromatografía de gases unida a espectrometría de masas (GC-MS) constituye una técnica robusta, sensible y de elevada reproducibilidad para el estudio metabólico de muestras de plasma permitiendo la identificación de 68 metabolitos diferentes.

10) El análisis metabólico mediante GC-MS de plasma en pacientes con SCASEST frente a controles sanos permitió la identificación de 15 metabolitos significativamente alterados, de los cuales 7 metabolitos se encontraron significativamente disminuidos en pacientes con SCASEST y 8 metabolitos estaban significativamente aumentados.

11) El análisis metabólico mediante GC-MS de ácidos grasos en plasma de pacientes con SCASEST frente a controles sanos permitió la identificación de 4 ácidos grasos significativamente alterados.

12) Mediante GC-MS se validaron 11 de los 15 metabolitos que se encontraron significativamente alterados en el estudio metabólico completo de plasma en pacientes con SCASEST frente a controles sanos.





## Bibliografía

1. Steinberg D, *Atherogenesis in perspective: hypercholesteolemia and inflammation as partner in crime.* . Nat Med., 2002. **11**: p. 1211-7.
2. Fuster V, B.L., Badimon JJ, Chesebro JH., *The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1).* N Engl J Med, 1992. **326**: p. 242-50.
3. Fuster V, B.L., Badimon JJ, Chesebro JH., *The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2).* . N Engl J Med, 1992. **326**: p. 310-8.
4. Falk E, S.P., Fuster V, , *Pathogenesis of plaque disruption.* In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease.* New York: Raven Press, 1996.
5. Falk E, *Pathogenesis of Atherothrombosis.* In: Fuster V, Topol EJ, Nabel EG, eds. *Atherothrombosis and coronary artery disease.* Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2005.
6. Murray CJ, L.A., *Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study.* . Lancet., 1997. **349**: p. 1269-76.
7. Heukeshoven J, *Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining.* Electrophoresis, 1985. **6**(3): p. 103-12.
8. Schevchenko A, W.M., Vorm O, Mann M, , *Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels.* Anal. Chem, 1996. **68**: p. 850-8.
9. Naghavi M, L.P., Falk E, Ward S, et al., *From Vulnerable Plaque to Vulnerable Patient. A Call for New Definitions and Risk Assessment Strategies: Part I.* . Circulation, 2003. **108**: p. 1664-72.
10. Tuñon J, H.-P.M., Ortego M, Blanco-Colio L et al., *Aterogénesis y complicación de la placa.* J Cardiovasc Risk Fact, 2000. **9**: p. 77-89.
11. Lupu F, H.D., Bachamann F, Hurni M, Kakkar VV, Kruihof EK., , *Plasminogen activator expression in human atherosclerotic lesions.* . Arterioscler Thromb Vasc Biol,, 1995. **15**: p. 1444-55.
12. Vita Ja, K.J.J., *Endothelial Function: A Barometer For Cardiovascular Risk?* Circulation, 2002. **106**: p. 640-642.
13. Ganz P, V.J., *Testing endothelial vasomotor function: nitric oxide, a multipotent molecule.* Circulation, 2003. **108**: p. 2049-2053.
14. Benjamin Ej, L.M., Keyes Mj, Mitchell Gf, Vasani Rs, Keaney Jf Jr, Lehman B, Fan S, Osypiuk E, Vita Ja. , *Clinical Correlates And Heritability Of Endothelial Function In The Community: The Framingham Heart Study.* . Circulation, 2004. **109**: p. 613-19.
15. Hamburg Nm, L.M., Vita Ja, Vasani Rs, Keyes Mj, Widlansky Me, Fox Cs, Mitchell Gf, Levy D, Meigs Jb, Benjamin Ej. , *Metabolic Syndrome, Insulin Resistance, And Brachial Artery Vasodilator Function In*

- Framingham Offspring Participants Without Clinical Evidence Of Cardiovascular Disease.* Am J Cardiol, 2008. **101**: p. 82-8.
16. Vita Ja, K.J.J., Larson Mg, Keyes Mj, Massaro Jm, Lipinska I, Lehman B, Fan S, Osypiuk E, Wilson Pwf, Vasan Rs, Mitchell Gf, Benjamin Ej. , *Brachial Artery Vasodilator Function And Systemic Inflammation In The Framingham Offspring Study.* 2004. **110**: p. 3604-09.
  17. Halcox Jp, D.A., Ellins E, Witte Dr, Shipley Mj, Brunner Ej, Marmot Mg, Deanfield Je. , *Endothelial Function Predicts Progression Of Carotid Intima-Media Thickness.* Circulation, 2009. **119**: p. 1105-12.
  18. Suwaidi Ja, H.S., Higano St, Nishimura Ra, Holmes Dr, Lerman A. , *Long-Term Follow-Up Of Patients With Mild Coronary Artery Disease And Endothelial Dysfunction.* Circulation, 2000. **101**: p. 948 - 54.
  19. Schachinger V, B.M., Zeiher Am., *Prognostic Impact Of Coronary Vasodilator Dysfunction On Adverse Long-Term Outcome Of Coronary Heart Disease.* Circulation, 2000: p. 1899-1906.
  20. Halcox Jp, S.W., Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw Ma, Nour Kr, Quyyumi Aa. , *Prognostic Value Of Coronary Vascular Endothelial Dysfunction.* Circulation, 2002. **106**: p. 653-58.
  21. Yeboah J, C.J., Hsu Fc, Burke Gl, Herrington Dm. , *Brachial Flow-Mediated Dilatation Predicts Incident Cardiovascular Events In Older Adults: The Cardiovascular Health Study. .* Circulation, 2007. **115**: p. 2390-97.
  22. Gokce N, K.J.J., Menzoian Jo, Watkins M, Hunter L, Duffy Sj, Vita Ja. , *Risk Stratification For Postoperative Cardiovascular Events Via Noninvasive Assessment Of Endothelial Function.* Circulation, 2002. **105**: p. 1567-72.
  23. Huang Al, S.A., Shvenke E, Schopfer Dw, Jahangir E, Titas Ma, Shpilman A, Menzoian Jo, Watkins Mt, Raffetto Jd, Gibbons G, Woodson J, Shaw Pm, Dhady M, Eberhardt Rt, Keaney Jf Jr, Gokce N, Vita Ja. , *Predictive Value Of Reactive Hyperemia For Cardiovascular events in patients with peripheral arterial disease undergoing vascular surgery.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007: p. 2113-19.
  24. Yeboah J, F.A., Burke GL, Johnson C, Polak JF, Post W, Lima JA, Crouse JR, Herrington DM. , *Predictive value of brachial flowmediated dilatation for incident cardiovascular events in a population-based study: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis.* Circulation, 2009. **120**: p. 502-09.
  25. Stary HC, C.A., Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME et al., *A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Special*

- report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1994. **14**: p. 840-56.
26. Osende J, *Fisiopatología de la cardiopatía isquémica*. En: Delcán JL, editor. *Cardiopatía Isquémica*. Cardigam multimedia, 1999: p. 97-151.
  27. Li Z, L.L., Zielke HR, Cheng L, Xiao R, Crow MT, et al, , *Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions*. . *Am J Pathol*, 1996. **148**: p. 121-8.
  28. Wood KM, C.M., Ramshaw AL, Parums DV., , *The distribution of adhesion molecules in human atherosclerosis*. *Histopathology*, 1993. **23**: p. 437-44.
  29. Stary HC, C.A., Dinsmore R, Fuster V, Glagov S, Insull W et al,, *A definitioin of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the committe on vascular lesions of the Council on Atherosclerosis, American Heart Association*. *Circulation*, 1995. **92**: p. 1355-74.
  30. Klein LW, *Clinical implication and mechanisms of plaque rupture in the acute coronary syndromes*. *Am Heart Hosp J* 2005. **3**(4): p. 249-55.
  31. Rossi A, F.L., Fusaro M, Cicoira M, Eleas AA, Golia G et al. , *Carotid atherosclerotic plaque instability in patients with acute myocardial infarction*. *Int J Cardiol*, 2005.
  32. Siqueira AF, A.D., Ferreira SR. , *LDL: from metabolic syndrome to instability of the atherosclerotic plaque*. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2006. **50**(2): p. 334-43.
  33. Virmani R, B.A., Farb A, Kolodgie FD. , *Pathology of the vulnerable plaque*. *J Am Coll Cardiol*, 2006. **47**: p. 13-8.
  34. Fuster V, M.P., Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. , *Atherothrombosis and high risk plaque: part 1: involving concepts*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. **46**(6): p. 937-54.
  35. Lupi Herrera E, C.V.E., Gaspar J, Ferez Santander SM,, *From the single vulnerable plaque to the multiple complex coronary plaques. From their basis, to the modern therapeutic approach. A clinical reality in the spectrum of the acute coronary syndromes*. *Arch Cardiol Mex*, 2006. **76**(1): p. 6-34.
  36. Fuster V, *Remodelado del trombo: punto clave en la progresión de la aterosclerosis coronaria*. *Rev Esp Cardiol* 2000. **53**(2).
  37. Anderson JL, A.C., Antman EM, et al,, *ACC/AHA 2007 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction-Executive Summary A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction) Developed in Collaboration with the American College of Emergency Physicians, the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and the Society of Thoracic Surgeons Endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation and the Society for Academic Emergency*

- Medicine. *J Am Coll Cardiol*, 2007. **50**: p. 652-726.
38. Antman EM, A.D., Armstrong PW, et al., *ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction--executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines* *J Am Coll Cardiol*, 2004. **44**: p. 671-719.
  39. Hamm CW, B.M., Braunwald E,, *Acute coronary syndrome without ST elevation: implementation of new guidelines.* *Lancet*, 2001. **358**: p. 1533-8.
  40. Boersma E, M.N., Poldermans D, Gardien M, Vos J, Simoons ML, , *Acute myocardial infarction.* *Lancet*, 2003. **361**: p. 847- 58.
  41. Wiviott SD, B.E., *Unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction: part II. Coronary revascularization, hospital discharge, and post-hospital care.* . *Am Fam Physician*, 2004. **70**: p. 535-8.
  42. *Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group.* . *Lancet* 1988: p. 349-60.
  43. Clarke RJ, M.G., FitzGerald GA, Fitzgerald DJ,, *Combined administration of aspirin and a specific thrombin inhibitor in man.* . *Circulation*, 1991. **83**: p. 1510-8.
  44. Freemantle N, C.J., Young P, Mason J, Harrison J,, *beta Blockade after myocardial infarction: systematic review and meta regression analysis.* *BMJ* 1999. **318**: p. 1730-7.
  45. Freemantle N, U.H., Eastaugh J, Hobbs FD,, *What is the place of beta-blockade in patients who have experienced a myocardial infarction with preserved left ventricular function? Evidence and (mis)interpretation.* . *Prog Cardiovasc Dis*, 2002. **44**: p. 243-50.
  46. Latini R, T.G., Maggioni AP, et al,, *Clinical effects of early angiotensin- converting enzyme inhibitor treatment for acute myocardial infarction are similar in the presence and absence of aspirin: systematic overview of individual data from 96,712 randomized patients.* *Angiotensin-converting Enzyme Inhibitor Myocardial Infarction Collaborative Group.* *J Am Coll Cardiol* 2000. **35**: p. 1801-7.
  47. Flather MD, Y.S., Kober L, et al,, *Long- term ACE-inhibitor therapy in patients with heart failure or left-ventricular dysfunction: a systematic overview of data from individual patients.* *ACE-Inhibitor Myocardial Infarction Collaborative Group.* *Lancet*, 2000. **355**: p. 1575- 81.
  48. Heart Protection Study Collaborative Group, *MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial.* . *Lancet*, 2002. **360**: p. 7- 22.
  49. Brown BG, G.A., *Impact of management on stabilization of*

- plaque and reduction of cardiovascular events. In: Fuster V, Topol EJ, Nabel EG, eds. *Atherothrombosis and coronary artery disease*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
50. *Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction*. Eur Heart J., 2000. **21**(18): p. 1502-13.
  51. Bel M, S.J., Llanos J, *Marcadores biológicos de necrosis miocárdica*. Rev Esp Cardiol, 2003. **56**(7): p. 703-20.
  52. Bais R, E.J., *Creatine kinase*. Crit Rev Clin Lab Sci, 1982. **16**: p. 291-335.
  53. Adams JE, A.D., Jaffe AS, *Biochemical markers of myocardial injury: is MB creatin kinase the choice for the 1990s?* Circulation 1993. **88**: p. 750-63.
  54. Califf RM, O.E., *The diagnosis of acute myocardial infarction*. Chest 1992. **101**: p. 106-15.
  55. Frey N, M.-B.M., Katus HA, *Myocardial damage: the role of troponin T*. En: Kaski JC, Holt DW, editors. *Myocardial damage. Early detection by novel biochemical markers*. Dordrecht Hardbound: Kluwer Academic Publishers, 1998: p. 27-40.
  56. Bertinchant JP, L.C., Pernel I, Leedermann B, Fabbro-Peray P, Beck L, et al., *Release kinetics of serum cardiac troponin I in ischemic myocardial injury*. Clin Biochem, 1996. **29**: p. 587-94.
  57. Collinson PO, B.F., Gaze DC, *Measurement of cardiac troponins*. Ann Clin Biochem 2001. **38**: p. 423-49.
  58. Hamilton RW, H.M., Shihabi ZK, *Myoglobinuria, hemoglobinuria, and acute renal failure* Clin Chem, 1989. **35**: p. 1713-20.
  59. Vuori J, H.K., Vuotikka P, Vaananen HK, *The use of myoglobin/carbonic anhydrase III ratio as a marker for myocardial damage in patients with renal failure*. 1997. **265**: p. 33-40.
  60. Chappelle JP, A.A., Smeets JP, Boland J, Heusghem C, Kulbertus HE, *Serum myoglobin determinations in the assessment of acute myocardial infarction*. Eur Heart J, 1982. **3**: p. 122-9.
  61. Roxin LE, C.I., Groth T, Hallgren T, Venge P, *The value of serum myoglobin determinations in the early diagnosis of acute myocardial infarction*. Acta Med Scand, 1984. **215**: p. 417-25.
  62. Gibler WB, G.C., Weinschenker E, Abbottsmith C, Hedges JR, Barsan WG, et al., *Myoglobin as an early indicator of acute myocardial infarction*. Ann Emerg Med, 1987. **16**: p. 851-6.
  63. Ohman EM, C.C., Bengtson JR, Pryot P, Tommey W, Horgan JH, *Early detection of acute myocardial infarction: additional diagnostic information from serum concentrations of myoglobin in patients without ST-elevations*. Br Heart J, 1990: p. 335-8.
  64. Martín-Ventura JL, B.-C.L., Tuñón J, Muñoz-García B, Madrigal-Matute J, Moreno JA, Vega de Céniga M, Egido J, *Biomarkers in cardiovascular medicine*. Rev Esp Cardiol, 2009. **62**(6): p. 677-88.

65. Ridker PM, H.C., Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J,, *Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men.* Lancet, 1998. **351**: p. 88-92.
66. Ridker PM, H.C., Buring JE, Rifai N,, *C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women.* . N Engl J Med, 2000. **342**: p. 836-43.
67. Hwang SJ, B.C., Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM, et al,, *Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study.* . Circulation, 1997. **96**: p. 4219-25.
68. Ridker PM, B.J., Rifai N,, *Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events.* Circulation, 2001. **103**: p. 491-5.
69. Blankenberg S, R.H., Bickel C, Peetz D, Hafner G, Tiret L, et al,, *Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease.* Circulation, 2001. **104**: p. 1336-42.
70. Mulvihill NT, F.J., Murphy RT, Curtin R, Crean PA, Walsh M,, *Risk stratification in unstable angina and non-Q wave myocardial infarction using soluble cell adhesion molecules.* . Heart, 2001. **85**: p. 623-7.
71. Malik I, D.J., Whincup P, Bhatia V, Papacosta O, Walker M, et al,, *Soluble adhesion molecules and prediction of coronary heart disease: a prospective study and metaanalysis.* . Lancet, 2001. **358**: p. 971-6.
72. Keating L, B.J., Beetham R, et al,, *The PRIMA study: presentation ischemiamodified albumin in the emergency department.* . Emerg Med J, 2006. **23**: p. 764-8.
73. Bhagavan NV, L.E., Rios PA, et al,, *Evaluation of human serum cobalt binding assay for the assessment of myocardial ischemia and myocardial infarction.* Clin Chem, 2003. **49**: p. 581-5.
74. Talswalkar SS, B.-H.M., Miller JJ, et al,, *Ischemia modified albumin, a marker of acute ischemic events: a pilot study.* Ann Clin Lab Sci, 2008. **38**: p. 132-7.
75. Christenson RH, D.S., Sanhai WR, et al,, *Characteristics of an albumin cobalt binding test for assessment of acute coronary syndrome: a multicenter study.* Clin Chem, 2001. **47**: p. 464-70.
76. Peacock F, M.D., Anwaruddin S, et al,, *Meta-analysis of ischemia-modified albumin to rule out acute coronary syndromes in the emergency department.* . Am Heart J, 2006. **152**: p. 253-62.
77. Ramasamy I, *Biochemical markers in acute coronary syndrome.* Clin Chim Acta, 2011. **412**: p. 1279-96.
78. Pilz S, S.H., Tiran B, Wellnitz B, Seelhorst U, Boehm BO, et al,, *Elevated plasma free fatty acids predict sudden cardiac death: a 6.85-year follow-up of 3315 patients after coronary*

- angiography*. Eur Heart J 2007. **28**: p. 2763–9.
79. Mozaffarian D, *Free fatty acids, cardiovascular mortality, and cardiometabolic stress*. Eur Heart J, 2007. **28**: p. 2699–700.
80. Glatz JFC, K.A., van Nieuwenhoven FA, et al., *Fatty acid binding protein as a plasma marker for the estimation of myocardial infarct size in humans*. Br Heart J 1994. **71**: p. 135–40.
81. Erlikh AD, K.A., Trifonov IR, et al., *Prognostic significance of heart fatty acid binding protein in patients with non-ST elevation acute coronary syndrome: results of follow up for 12 months*. Kardiologia, 2005. **45**: p. 13–21.
82. Nizeki T, T.Y., Arimoto T, Nozak N, Hirono O, Watanabe T, et al., *Persistently increased serum concentration of heart-type fatty acid-binding protein predicts adverse clinical outcomes in patients with chronic heart failure*. Circ J, 2008. **72**: p. 109–14.
83. Ishii J, O.Y., Lu J, et al., *Prognostic value of serum concentration of heart type fatty acid binding protein relative to cardiac troponin T on admission in the early hours of acute coronary syndrome*. Clin Chem, 2005. **51**: p. 1397–404.
84. Viswanathan K, K.N., Morrell C, Thistlewaite SJ, Sivanathan MU, Hassan TB, et al., *Heart type acid binding protein predicts long-term mortality and reinfarction in consecutive patients with suspected acute coronary syndrome who are troponin negative*. J Am Coll Cardiol 2010. **55**: p. 2590–8.
85. O'Donoghue M, d.L.D., Morrow DA, et al., *Prognostic utility of heart type fatty acid binding protein in patients with acute coronary syndrome*. Circulation, 2006. **114**: p. 550–7.
86. Talwar S, S.I., Downie PF, McCullough AM, Campton MC, Davies JE, et al., *Profile of plasma N-terminal proBNP following acute myocardial infarction*. Eur Heart J, 2000. **21**: p. 1514–21.
87. Ndrepepa G, B.S., Mehilli J, von Beckerath N, Nekolla S, Vogt W, et al., *Nterminal pro-brain natriuretic peptide on admission in patients with acute myocardial infarction and correlation with scintigraphic infarct size, efficacy of perfusion and prognosis*. Am J Cardiol 2006. **97**: p. 1151–6.
88. Sadanandan S, C.C., Chekuri K, Murphy SA, DiBattiste PM, Morrow DA, et al., *Association of elevated B-type natriuretic peptide levels with angiographic findings among patients with unstable angina and non-ST segment elevation myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol 2004. **44**: p. 564–8.
89. Morita E, Y.H., Yoshimura M, Ogawa H, Jougasaki M, Matsumara T, et al., *Increased plasma levels of brain natriuretic peptide in patients with acute myocardial infarction*. Circulation, 1993. **88**: p. 82–91.
90. Van Kimmenade RRJ, J.J., Bakker JA, Houben AJ, Rennenberg R, Kroon AA, et al., *Renal clearance of B-type natriuretic peptide and amino terminal pro-Btype natriuretic peptide*. J Am Coll Cardiol, 2009. **53**: p. 884–90.

91. Srisawasdi P, V.S., Charoenpanichkit C, Kroll MH,, *The effect of renal function on BNP, NT-proBNP and their ratio.* Am J Clin Pathol, 2010. **133**: p. 14–23.
92. Deo R, K.A., McGuire DK, Murphy SA, Meo Neto J de P, Morrow DA, et al., *Association among plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1, traditional cardiovascular risk factors, and subclinical atherosclerosis.* J Am Coll Cardiol, 2004. **44**: p. 1812-8.
93. de Lemos JA, M.D., Sabatine MS, Murphy SA, Gibson CM, Antman EM, et al., *Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes.* Circulation., 2003. **107**: p. 690-5.
94. Cesari M, P.B., Newman AB, Kritchevsky SB, Nicklas BJ, Sutton-Tyrrell K, et al., *Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study.* . Circulation., 2003. **108**: p. 2317-22.
95. Biasucci LM, L.G., Fantuzzi G, Caligiuri G, Rebuffi AG, Ginnetti F, et al., *Increasing levels of interleukin (IL)-1Ra and IL-6 during the first two days of hospitalization in unstable angina are associated with increased risk of in-hospital coronary events.* Circulation. , 1999. **99**: p. 2079-84.
96. Koukkunen H, P.K., Kempainen A, Halinen M, Penttila I, Rantanen T, et al., *C reactive protein, fibrinogen, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in the prognostic classification of unstable angina pectoris.* Ann Med. , 2001. **33**: p. 37-47.
97. Lindmark E, D.E., Wallentin L, Siegbahn A.,, *Relationship between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: effects of an early invasive or noninvasive strategy.* JAMA., 2001. **286**: p. 2107-13.
98. Brennan ML, P.M., Van Lente F, Nambi V, Shishebor MH, Aviles RJ, et al., *Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain.* . N Engl J Med, 2003. **349**: p. 1595–604.
99. Roman RM, C.P., Borges FK, Rossini AP, Polanczyk CA.,, *Prognostic value of myeloperoxidase in coronary artery disease: comparison of unstable and stable angina patients.* Coron Artery Dis, 2010. **21**: p. 129–36.
100. Ridker PM., *C-reactive protein and the prediction of cardiovascular events among those at intermediate risk: moving an inflammatory hypothesis toward consensus.* J Am Coll Cardiol, 2007. **49**: p. 2129-38.
101. Danesh J, W.J., Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, et al., *C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease.* . N Engl J Med., 2004. **350**: p. 1387-97.

102. Anderson JL., *Lipoprotein-associated phospholipase A (2): An independent predictor of coronary artery disease events in primary and secondary prevention.* Am J Cardiol., 2008. **101**: p. 23-33.
103. Kai H, I.H., Yasukawa H, Kai M, Seki Y, Kuwahara F, et al., *Peripheral blood levels of metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes.* J Am Coll Cardiol, 1998. **32**: p. 368-72.
104. Varo N, d.L.J., Libby P, Morrow DA, Murphy SA, Nuzzo R, et al., *Soluble CD40L. Risk prediction after acute coronary syndromes.* Circulation, 2003. **108**: p. 1049-52.
105. Heeschen C, D.S., Hamm CW, van den Brand MJ, Boersma E, Zeiher AM, et al., *Soluble CD40 ligand in acute coronary syndrome.* N Engl J Med 2003. **348**: p. 1104-11.
106. Olenchock BA, V.S., Murphy SA, Cannon CP, Rifai N, Braunwald E, et al., *Lack of association between soluble CD40L and risk in large cohort of patients with acute coronary syndrome in OPUS TIMI-16.* J Thromb Thrombolysis, 2008. **26**: p. 79-84.
107. Pandey A, M.M., *Proteomics to study genes and genomes.* Nature, 2000. **405**: p. 837-46.
108. Blackstock WP, W.M., *Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins.* Tibtech, 1999. **17**: p. 121-7.
109. Twyman RM, *Principles of Proteomics.* 2004.
110. Gorg A, O.C., Boguth G, et al, *The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients.* Electrophoresis, 2000. **21**: p. 1037-53.
111. Gygi SP, C.G., Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R, *Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology.* Proc Natl Acad Sci 2000. **97**: p. 9390-5.
112. Rabilloud T, *Solubilization of proteins for electrophoretic analyses.* Electrophoresis, 1996. **17**: p. 813-829.
113. Kenrick KG, M.J., *Isoelectric focusing and gradient gel electrophoresis: a twodimensional technique.* Anal Biochem 1970. **33**: p. 204-7.
114. Klose J, *Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals.* Humangenetik 1975. **26**: p. 231-43.
115. O'Farrell PH, *High resolution twodimensional electrophoresis of proteins.* J Biol Chem, 1975. **250**: p. 4007-21.
116. Bjellqvist B, E.K., Righetti PG, et al, *Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications.* J Biochem Biophys Methods, 1982. **6**: p. 317-39.
117. Laemmli UK., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**: p. 680-5.
118. Rabilloud T, *Proteome research, two-dimensional gel electrophoresis and identification methods.* Springer- Verlag, 2000.
119. Palagi PM, H.P., Walther D, Appel RD,, *Proteome informatics I: bioinformatics*

- tools for processing experimental data. .  
Proteomics, 2006. **6**: p. 5435-44.
120. Patton WF, *A thousand points of light: the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional del electrophoresis and proteomics*. Electrophoresis, 2000. **21**: p. 1123-44.
121. Dowsey AW, D.M., Yang GZ,, *The role of bioinformatics in two-dimensional gel electrophoresis*. Proteomics, 2003. **3**: p. 1567-96.
122. Gorg A, W.W., Dunn MJ,, *Current twodimensional electrophoresis technology for proteomics*. Proteomics, 2004. **4**: p. 3665-85.
123. Ahmed FE, *The role of capillary electrophoresis-mass spectrometry to proteome analysis and biomarker discovery*. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 2009. **887**: p. 1963-81.
124. Osatinsky R, *¿Qué es la electroforesis capilar?* . Bioquímica y patología clínica, 2007. **71**(2): p. 60-66.
125. Washburn MP, W.D., Yates JR,, *III Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology*. . Nat Biotechnol, 2001. **19**: p. 242-47.
126. Medzihradszky KF, L.H., Baldwin Ma, Burlingame AL,, *Protein identification by ingel digestión, high-performance liquid chromatography and mass spectrometry: peptide analysis by complementary ionization techniques*. J Am Soc Mass Spectrom, 2001. **12**: p. 215-21.
127. Pieper R, G.C., Makusky AJ, Russo PS, Schatz CR, Miller SS, Su Q, McGrath AM, Estock MA, Parmar PP, Zhao M, Huang ST, Zhou J, Wang F, Esquer-Blasco R, Anderson NL, Taylor J, Steiner S,, *The human proteome: display of nearly 3700 chromatographically separated protein spots on two-dimensional electphoresis gels and identification of 325 distinct proteins*. Proteomics, 2003. **3**: p. 1345-64.
128. Badock V, S.U., Bommert K, Otto A,, *Prefractionation of protein samples for proteome analysis using reversed-phase high performance liquid chromatography*. Electrophoresis 2001. **22**: p. 2856-64.
129. Lesley SA, *High-throughput proteomics: protein expresión and purification in the postgenomic world*. . Protein Expr Purif 2001. **22**: p. 159-64.
130. De Hoffman E, S.V., *Mass spectrometry: principles and applications*. Third edition. Wiley,, 2007.
131. Merchant M, W.S., *Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight-mass spectrometry*. Electrophoresis 2000. **21**: p. 1164-77.
132. Kinter M, S.N., *Protein Sequencing and identification using tandem mass spectrometry*. Wiley-Interscience, 2005.
133. Wang R, Z.R., *Evolution of the Solvent Polarity in an*

- Electrospray Plume*. J Am Soc Mass Spectrom, 2010. **21**: p. 378-85.
134. Wortmann A, K.-M.A., Zenobi R., *Shrinking Droplets in Electrospray Ionization and Their Influence on Chemical Equilibria*. J Am Soc Mass Spectrom, 2007. **18**: p. 385-93.
135. Domon B, A.R., *Mass spectrometry and protein analysis*. Science 2006. **312**: p. 212-17.
136. Hu Q, N.R., Li H, Makarov A, Hardman M, Graham Cooks R., *The Orbitrap: a new mass spectrometer*. J Mass Spectrom, 2005. **40**(4): p. 430-43.
137. Makarov A, D.E., Kholomeev A, Balschun W, Lange O, Strupat K, Horning S., *Performance evaluation of a hybrid linear Ion Trap/Orbitrap Mass spectrometer*. Anal Chem, 2006. **78**(7): p. 2113-20.
138. Zhou B, X.J., Tuli L, Ressonm HW., *LC-MS-based metabolomics*. Mol Biosyst, 2012. **8**(2): p. 470-81.
139. Xiao JF, Z.B., Ressonm HW., *Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics*. Trends Analyt Chem, 2012. **32**: p. 1-14.
140. Brewis IA, B.P., *Proteomics technologies for the global identification and quantification of proteins*. Adv Protein Chem Struct Biol, 2010. **80**: p. 1-44.
141. Pasikanti K, e.a., *Gas chromatography/mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids* J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 2008. **871**: p. 202-11..
142. Oliver SG, W.M., Kell DB, Baganz F., *Systematic functional analysis of the yeast genome*. Trends Biotechnol, 1998. **16**: p. 373-8.
143. Glassbrook N, B.C., Ryals J, , *Metabolic profiling on the right path*. Nat. Biotechnol. , 2000. **18**: p. 1142.
144. Griffin JL, K.A., *A metabolomics perspective of human brain tumours*. FEBS Journal, 2007. **274**(5): p. 1132-1139, .
145. Musiek ES, Y.H., Milne GL, Morrow JD, , *Recent advances in the biochemistry and clinical relevance of the isoprostane pathway*. 2005. **40**(10): p. 987-94.
146. Cho H, K.J., Lee WY, Chung BC, Choi MH, , *Quantitative metabolic profiling of 21 endogenous corticosteroids in urine by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2009. **632**(1): p. 101-08.
147. Wishart DS, *Metabolomics: the principles and potential applications to transplantation*. Am J Transplant., 2005. **5**: p. 2814-20.
148. Slupsky CM, R.K., Wagner J, et al., *Investigations of the effects of gender, diurnal variation, and age in human urinary metabolomic profiles*. Anal Chem, 2007. **79**: p. 6995-7004.
149. Dettmer K, A.P., Hammock BD., *Mass spectrometry- based metabolomics*. Mass Spectrom Rev, 2007. **26**: p. 51-78.
150. Want EJ, N.A., Morita H, Siuzdak G., *From exogenous to endogenous: the inevitable imprint of mass spectrometry in metabolomics*. . J Proteome Res, 2007. **6**: p. 459-68.
151. Issaq HJ, A.E., Veenstra TD. *Utility of separation science in*

- metabolomic studies. *J Sep Sci.* 2008 Jun;31(11):1936-47., *Utility of separation science in metabolomic studies. J Sep Sci.* , 2008. **31**(11): p. 1936-47.
152. Dunn WB, B.N., Johnson HE,, *Measuring the metabolome: current analytical technologies.* . *Analyst.*, 2005. **130**(5): p. 606-25. .
  153. Issaq HJ, V.Q., Waybright TJ, Muschik GM, Veenstra TD,, *Analytical and statistical approaches to metabolomics research.* *J Sep Sci.*, 2009. **32**: p. 2183-99.
  154. Lange E, T.R., Neumann S, Gropl C,, *Critical assessment of alignment procedures for LC-MS proteomics and metabolomics measurements.* BMC Bioinformatics, 2008. **9**.
  155. Sturm M, B.A., Gropl C, et al,, *OpenMS—an open-source software framework for mass spectrometry.* BMC Bioinformatics, 2008. **9**.
  156. Nicholson JK, W.I., *Opinion: understanding 'global' systems biology: metabolomics and the continuum of metabolism.* *Nat Rev Drug Discov*, 2003. **2**: p. 668-76.
  157. Serkova NJ, B.M., *Quantitative analysis in magnetic resonance spectroscopy: from metabolic profiling to in vivo biomarkers.* *Bioanalysis*, 2012. **4**(3): p. 321-41. .
  158. Pan Z, R.D., *Comparing and combining NMR spectroscopy and mass spectrometry in metabolomics.* *Anal Bioanal Chem*, 2007. **387**: p. 525-7.
  159. Grandori R, S.C., Brocca S, Invernizzi G, Lotti M,, *Electrospray-ionization mass spectrometry as a tool for fast screening of protein structural properties.* *Biotechnol J.* , 2009. **4**: p. 73-87.
  160. Ho C, L.C., Chan M, et al,, *Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications.* *Clin Biochem Rev*, 2003. **24**: p. 3-12.
  161. Tolstikov VV, F.O., *Analysis of highly polar compounds of plant origin: combination of hydrophilic interaction chromatography and electrospray ion trap mass spectrometry.* *Anal Biochem.*, 2002. **301**: p. 298-307.
  162. Chen M, Z.L., Jia W,, *Metabonomic study on the biochemical profiles of a hydrocortisone-induced animal model.* *J Proteome Res.*, 2005. **4**(6): p. 2391-6.
  163. Lee SH, W.H., Jung BH, Lee J, Kwon OS, Pyo HS, Choi MH, Chung BC., *Metabolomic approach to evaluate the toxicological effects of nonylphenol with rat urine.* *Anal Chem.*, 2007. **79**(16): p. 6102-10.
  164. Little JL, *Artifacts in trimethylsilyl derivatization reactions and ways to avoid them.* *J Chromatogr A*, 1999. **844**: p. 1-22.
  165. Horai H, A.M., Kanaya S et al., , *MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences.* *Journal of Mass Spectrometry*, 2010. **45**(7): p. 703-14.
  166. Vallejo M, G.A., Tuñón J, García-Martínez D, Angulo S, Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Almeida P, Egido J, Barbas C,,

- Plasma fingerprinting with GC-MS in acute coronary syndrome.* Anal Bioanal Chem, 2009. **394**(6): p. 1517-24.
167. Lewis GD, W.G., Liu E et al., , *Metabolite profiling of blood from individuals undergoing planned myocardial infarction reveals early markers of myocardial injury.* Journal of Clinical Investigation, 2008. **118**(10): p. 3503-12.
168. Zhang F, J.Z., Gao P et al., , *Metabonomics study of atherosclerosis rats by ultra fast liquid chromatography coupled with ion trap-time of flight mass spectrometry.* Talanta, 2009. **79**(3): p. 836-844.
169. Teul J, R.F., Garcia A et al., , *Improving metabolite knowledge in stable atherosclerosis patients by association and correlation of GC-MS and <sup>1</sup>H NMR fingerprints.* Journal of Proteome Research, 2009. **8**(12): p. 5580-5589.
170. Sabatine MS, L.E., Morrow DA et al.,, *Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia.* Circulation, 2005. **112**(25): p. 3868-75.
171. Shah SH, H.E., Bain JR et al., , *High heritability of metabolomic profiles in families burdened with premature cardiovascular disease.* Molecular Systems Biology, 2009. **5**.
172. Shah SH, B.J., Muehlbauer MJ et al., , *Association of a peripheral blood metabolic profile with coronary artery disease and risk of subsequent cardiovascular events.* Circulation Cardiovascular Genetics, 2010. **3**(2): p. 207-14.
173. Mayr M, Y.S., Weir G et al.,, *Combined metabolomic and proteomic analysis of human atrial fibrillation.* Journal of the American College of Cardiology, 2008. **51**(5): p. 585-94.
174. Bradford MM, *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
175. Gorg A, W.W., Dunn MJ., *Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics.* Proteomics, 2004. **4**: p. 3665-85.
176. Heukeshoven J, D.R., *Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining.* Electrophoresis, 1985. **6**(3): p. 103-12.
177. Jackson JE, *A User's guide to principal components.* New York: Wiley, 1991.
178. Abaira V, P.d.V.A., *Métodos Multivariantes en Bioestadística.* Editorial Centro de Estudios Ramón Areces, 1996.
179. Everitt B., *Cluster analysis.* New York: Wiley, 1974.
180. Kaufman L, R.P., *Finding groups in data an introduction to cluster analysis.* New York: Wiley, 1990.
181. Schevchenko A, W.M., Vorm O, Mann M, *Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels.* Anal. Chem, 1996. **68**(850-58).
182. Perkins DN, P.D., Creasy DM and Cottrell JS, *Probability-based protein identification by searching sequence databases*

- using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 1999. **20**: p. 3551-67.
183. Dettmer K, A.P., Hammock BD., *Mass spectrometry-based metabolomics*. *Mass Spectrom Rev*, 2007. **26**: p. 51-78.
184. Chen M, Z.L., Jia W, *Metabonomic study on the biochemical profiles of a hydrocortisone-induced animal model*. *J. Proteome. Res*, 2005. **4**: p. 2391-6.
185. Lee SH, W.H., Jung BH, Lee J, Kwon OS, Pyo HS, Choi MH, Chung BC., *Metabolomic approach to evaluate the toxicological effects of nonylphenol with rat urine*. *Anal Chem*, 2007. **79**: p. 6102-10.
186. Jiye A, T.J., Gullberg J, Johansson AI, Jonsson P, Antti H, Marklund SL, Moritz T, *Extraction and GC/MS Analysis of the Human Blood Plasma Metabolome*. *Anal. Chem*, 2005. **77**: p. 8086-94.
187. Lepage, G., and Roy CC, , *Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction*. *J. Lipid Res*, 1986. **27**: p. 114-20.
188. Dardé VM, d.l.C.F., Dones FG, Alvarez-Llamas G, Barderas MG, Vivanco F. , *Analysis of the plasma proteome associated with acute coronary syndrome: does a permanent protein signature exist in the plasma of ACS patients?* *J Proteome Res*, 2010. **9**(9): p. 4420-32.
189. Naghavi M, L.P., Falk E, Casscells Sw, Litovsky S, Rumberger J, et al., *From Vulnerable Plaque To Vulnerable Patient. A Call For New Definitions And Risk Assessment Strategies: Part I*. *Circulation*, 2003. **108**: p. 1664-72.
190. Ross R, *Atherosclerosis: An Inflammatory Disease*. *N Engl J Med.* , 1999. **340**: p. 115-26.
191. Libby P, *Inflammation In Atherosclerosis*. *Nature*, 2002. **420**: p. 868-74.
192. Twomey PJ, V.A., House IM, Reynolds TM, Wierzbicki AS., *Relationship between serum copper, ceruloplasmin, and non-ceruloplasmin-bound copper in routine clinical practice*. *Clin Chem*, 2005. **51**(8): p. 1558-9.
193. Tolosano E, A.F., *Hemopexin: structure, function, and regulation*. . *DNA Cell Biol*, 2002. **21**(4): p. 297-306.
194. Miller YI, S.A., Morgan WT, Shaklai N., *Role of hemopexin in protection of low-density lipoprotein against hemoglobin-induced oxidation*. . *Biochemistry*, 1996. **35**(40): p. 13112-7.
195. Grinshtein N, B.V., Tsemakhovich VA, Shaklai N. , *Mechanism of low-density lipoprotein oxidation by hemoglobin-derived iron*. *Biochemistry*, 2003. **42**(23): p. 6977-85.
196. Miller YI, A.S., Shaklai N., *Oxidation of low-density lipoprotein by hemoglobin stems from a heme-initiated globin radical: antioxidant role of haptoglobin*. *Biochemistry*, 1997. **36**(40): p. 12189-98.
197. Graham TE, Y.Q., Blüher M, et al., *Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects*. *N Engl J Med* 2006. **354**(24): p. 2552-63.

198. Cabré A, L.I., Girona J, et al., *Retinol-binding protein 4 as a plasma biomarker of renal dysfunction and cardiovascular disease in type 2 diabetes*. J Intern Med 2007. **262**(4): p. 496-503.
199. Lakka HM, L.D., Lakka TA, et al., *The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men*. JAMA, 2002. **288**(21): p. 2709-16.
200. Steinberger J, M.A., Hong CP, Jacobs Jr DR, Sinaiko AR., *Adiposity in childhood predicts obesity and insulin resistance in young adulthood*. J Pediatr 2001. **138**(4): p. 469-73.
201. von Eynatten M, L.P., Liu D, et al., *Retinol-binding protein 4 is associated with components of the metabolic syndrome, but not with insulin resistance, in men with type 2 diabetes or coronary artery disease*. Diabetologia, 2007. **50**(9): p. 1930-7.
202. Mohapatra J, S.M., Acharya A, Pandya G, Chatterjee A, Balaraman R, Jain MR., *Retinol-binding protein 4 : a possible role in cardiovascular complications*. Br J Pharmacol, 2011. **164**(8): p. 1939-48.
203. von Eynatten M, H.P., *Retinol-binding protein-4 in experimental and clinical metabolic disease*. Expert Rev Mol Diagn, 2008. **8**(3): p. 289-99.
204. Wolf G, *Serum retinol-binding protein: a link between obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes*. Nutr Rev. , 2007. **65**(5): p. 251-6.
205. Chun RF., *New perspectives on the vitamin D binding protein*. Cell Biochem Funct, 2012. **Apr 23**.
206. Pilz S, K.K., Tomaschitz A, Lerchbaum E, Meinitzer A, März W, Zittermann A, Dekker JM., *Vitamin D and cardiovascular disease: Update and outlook*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 2012. **243**: p. 83-91.
207. Pilz S, T.A., März W, Drechsler C, Ritz E, Zittermann A, Cavalier E, Pieber TR, Lappe JM, Grant WB, Holick MF, Dekker JM., *Vitamin D, cardiovascular disease and mortality*. Clin Endocrinol 2011 **75**(5): p. 575-84.
208. Macdonald, H.M., Mavroeydi, A., Fraser, W.D. et al., *Sunlight and dietary contributions to the seasonal vitamin D status of cohorts of healthy postmenopausal women living at northerly latitudes: a major cause for concern?*. Osteoporosis International, 2011.
209. Doorenbos C.R., v.d.B., J., Navis, G. et al., *Possible renoprotection by vitamin D in renal disease: beyond mineral metabolism*. Nature Reviews Nephrology, 2009. **5**: p. 691-700.
210. Cavalier, E., Delanaye, P., Souberbielle, J.C. et al., *Vitamin D and type 2 diabetes mellitus: where do we stand?*. Diabetes and Metabolism, 2011. **37**(4): p. 265-72.
211. Zittermann A, G.J., *Sun, vitamin D, and cardiovascular disease*. J Photochem Photobiol B, 2010. **101**(2): p. 124-9.
212. Smith JD, *Apolipoprotein A-I and its mimetics for the treatment of atherosclerosis*. Curr Opin Investig Drugs, 2010. **11**(9): p. 989-96.

213. Plump AS, S.C., Breslow JL,, *Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E- deficient mouse.* . Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**: p. 9607-9611.
214. Paszty C, M.N., Verstuyft J, Rubin EM.,, *Apolipoprotein AI transgene corrects apolipoprotein E deficiency-induced atherosclerosis in mice.* J Clin Invest, 1994. **94**: p. 899-903.
215. Omori M, W.M., Matsumoto K, Honda H, Hattori H, Akizawa T., *Impact of serum apolipoprotein A-IV as a marker of cardiovascular disease in maintenance hemodialysis patients.* Ther Apher Dial, 2010. **14**(3): p. 341-8.
216. Steinmetz A, B.R., Ghalim N et al.,, *Human apolipoprotein A-IV binds to apolipoprotein A-I/A-II receptor sites and promotes cholesterol efflux from adipose cells.* J Biol Chem 1990. **265**(7859-63).
217. Fujimoto K, C.J., Tso P.,, *Increased apolipoprotein A-IV in rat mesenteric lymph after lipid meal acts as a physiological signal for satiation.* Am J Physiol, 1992. **262**: p. 1002-6.
218. Ostos MA, C.M., Vergnes L et al.,, *Antioxidative and antiatherosclerotic effects of human apolipoprotein A-IV in apolipoprotein E-deficient mice.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**: p. 1023-8.
219. Koga S, M.Y., Funakoshi A et al.,, *Plasma apolipoprotein A-IV levels decrease in patients with chronic pancreatitis and malabsorption syndrome.* Digestion 1985. **32**: p. 19-24.
220. Seishima M, M.Y., *An increased apo A-IV serum concentration of patients with chronic renal failure on hemodialysis.* Clin Chim Acta 1987. **167**: p. 303-11.
221. Knopman DS., R.R., Geda Y. E. et al.,, *Association of prior stroke with cognitive function and cognitive impairment: a population-based study.* Archives of Neurology, 2009. **66**(5): p. 614-9.
222. Kim J, B.J.M., and Holtzman DM.,, *The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease.* Neuron, 2009. **63**(3): p. 287-303.
223. Shi J, Z.C.B., Vollmer T. L., Tyry T. M., and Kuniyoshi S. M.,, *APOE ε4 allele is associated with cognitive impairment in patients with multiple sclerosis.* Neurology, 2008. **70**(3): p. 185-90.
224. Breslow JL., *Mouse models of atherosclerosis.* Science 1996. **272**: p. 685-8.
225. Shimano H, Y.N., Katsuki M, et al.,, *Plasma lipoprotein metabolism in transgenic mice overexpressing apolipoprotein E. Accelerated clearance of lipoproteins containing apolipoprotein B.* J Clin Invest 1992. **90**: p. 2084-91.
226. Nikoulin IR, C.L., *An apolipoprotein E synthetic peptide targets to lipoproteins in plasma and mediates both cellular lipoprotein interactions in vitro and acute clearance of cholesterol-rich lipoproteins in vivo.* J Clin Invest 1998. **101**: p. 223-34.

227. Desurmont C, C.J., Emmanuel F, et al., , *Complete atherosclerosis regression after human ApoE gene transfer in ApoEdeficient/nude mice.* . Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000. **20**: p. 435-42.
228. Májek P, R.Z., Suttner J, Cermák J, Dyr JE,, *Plasma protein alterations in the refractory anemia with excess blasts subtype 1 subgroup of myelodysplastic syndrome.* Proteome Sci 2012. **10**(1): p. 31.
229. Opstal-van Winden AW, V.R., Peeters PH, Beijnen JH, van Gils CH,, *Early diagnostic protein biomarkers for breast cancer: how far have we come? .* Breast Cancer Res Treat, 2011.
230. Abdullah-Soheimi SS, L.B., Hashim OH, Shuib AS,, *Patients with ovarian carcinoma excrete different altered levels of urine CD59, kininogen-1 and fragments of inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 and albumin.* Proteome Sci, 2012. **8**: p. 58.
231. Travis J, S.G., *Human plasma proteinase inhibitors.* Annu Rev Biochem, 1983. **52**: p. 655-709.
232. Abdullah NM, K.M., Walker A, Hawley AE, Wroblewski SK, Myers DD, Strahler JR, Andrews PC, Michailidis GC, Henke PK, Wakefield TW. , *Microparticle Surface Proteins are Associated with Experimental Venous Thrombosis: A Preliminary Study.* . Clin Appl Thromb Hemost, 2009. **15**(2): p. 201-8.
233. Zhang S, J.S., *Multi-functional capability of proteins: alpha1antichymotrypsin and the correlation with Alzheimer's disease.* J Alzheimers Dis 2002. **4**(115-22).
234. Cojocaru IM, C.M., Muşuroi C, Druţă A, Băcanu M.,, *Study of some markers of inflammation in atherothrombotic pathogenesis of acute ischemic stroke.* . Rom J Intern Med, 2002. **40**: p. 103-16.
235. Colman RW, S.A., *Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive and proinflammatory attributes.* Blood 1997. **90**: p. 3819-43.
236. Isordia-Salas I, S.I., Pixley RA, Martinez-Murillo C, Colman RW.,, *High molecular weight kininogen in inflammation and angiogenesis: a review of its properties and therapeutic applications.* Rev Invest Clin 2005. **57**: p. 802-13.
237. Asakura S, H.R., Skorstengaard K, Ohkubo I, Mosher DF,, *Inhibition of cell adhesion by high molecular weight kininogen.* J Cell Biol 1992. **116**: p. 465-76.
238. Chavakis T, B.N., Santoso S, et al.,, *Inhibition of platelet adhesion and aggregation by a defined region (Gly-486- Lys-502) of high molecular weight kininogen.* J Biol Chem, 2002. **227**: p. 23157-64.
239. Neumann FJ, K.H., Hoberg E, et al.,, *Increased plasma viscosity and erythrocyte aggregation: indicators of an unfavourable clinical outcome in patients with unstable angina pectoris.* Br Heart J 1991. **66**: p. 425-30.
240. Meade TW, V.M., Thompson SG, Seghatchian MJ.,, *The effect of physiological levels of fibrinogen on platelet aggregation.* Thromb Res 1985. **38**: p. 527-34.

241. Danesh J, L.S., Thompson SG, et al., *Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant metaanalysis*. JAMA 2005. **294**(1799-809).
242. Abdelmouttaleb I, D.N., Ilardo C, et al., *C-Reactive protein and coronary artery disease: additional evidence of the implication of an inflammatory process in acute coronary syndromes*. Am Heart J 1999. **137**: p. 346-51.
243. Abrignani MG, N.G., Di GA, et al., *Increased plasma levels of fibrinogen in acute and chronic ischemic coronary syndromes*. Cardiologia, 1999. **44**: p. 1047-52.
244. Arnau Vives MA, R.S., Martinez Dolz LV, et al., *Prognostic value of fibrinogen in patients admitted with suspected unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction*. Rev Esp Cardiol 2002. **55**: p. 622-30.
245. Becker RC, C.C., Bovill EG, et al., *Prognostic value of plasma fibrinogen concentration in patients with unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction (TIMI IIIB Trial)*. Am J Cardiol, 1996. **78**(142-7).
246. Gil-Dones F, D.V., Alonso-Orgaz S, Lopez-Almodovar LF, Mourino-Alvarez L, Padial LR, Vivanco F, Barderas MG., *Inside human aortic stenosis: a proteomic analysis of plasma*. J Proteomics, 2012. **75**(5): p. 1639-53.
247. Zhou M, L.D., Chan KC, Issaq HJ, Petricoin EF, Liotta LA, et al., *An investigation into the human serum interactome*. Electrophoresis 2004. **25**(9): p. 1289-98.
248. Ichinose A, *Physiopathology and regulation of factor XIII*. Thromb Haemost 2001. **86**: p. 57-65.
249. Anwar R, M.K., *Factor XIII deficiency*. Br J Haematol 1999. **107**: p. 468-84.
250. Muller-Eberhard HJ., *Molecular organization and function of the complement system*. Annu Rev Biochem 1988. **57**: p. 321-47.
251. Shernan SK, C.C., *Role of the complement system in ischaemic heart disease: potential for pharmacological intervention*. BioDrugs, 2001. **15**: p. 595-607.
252. Kelso GJ, S.W., Richter RJ, Furlong CE, Jordan-Starck TC, Harmony JA., *Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma*. Biochemistry 1994. **33**: p. 832-9.
253. Blatter MC, J.R., Messmer S, Barja F, Pometta D., *Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45. Identity of K-45 with paraoxonase*. Eur J Biochem 1993. **211**: p. 871-9.
254. Tschopp J, C.A., Hertig S, French LE., *Clusterin, the human apolipoprotein and complement inhibitor, binds to complement C7, C8 beta, and the b domain of C9*. J Immunol 1993. **151**: p. 2159-65.
255. Hardardottir I, K.S., Moser AH, et al., *Endotoxin and cytokines increase hepatic messenger RNA levels and serum concentrations*

- of apolipoprotein J (clusterin) in Syrian hamsters. *J Clin Invest* 1994. **94**: p. 1304-9.
256. Rosenberg ME, S.J., *Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations*. *Int J Biochem Cell Biol*, 1995. **27**: p. 633-45.
257. Wong P, P.J., Lakins J, et al., *Genomic organization and expression of the rat TRPM- 2 (clusterin) gene, a gene implicated in apoptosis*. *J Biol Chem* 1993. **268**: p. 5021-31.
258. French LE, W.A., Sappino AP, Tschopp J, Schifferli JA., *Human clusterin gene expression is confined to surviving cells during in vitro programmed cell death*. *J Clin Invest* 1994. **93**: p. 877-84.
259. Fratelli M, G.G., Minto M, Pasinetti GM., *Role of clusterin in cell adhesion during early phases of programmed cell death in P19 embryonic carcinoma cells*. *Biochim Biophys Acta* 1996. **1311**: p. 71-6.
260. O'Sullivan J, W.L., Drake J, Tenniswood M., *Alterations in the post-translational modification and intracellular trafficking of clusterin in MCF-7 cells during apoptosis*. *Cell Death Differ* 2003. **10**: p. 914-27.
261. Aronow BJ, L.S., Brown TL, Harmony JA, Witte DP., *Apolipoprotein J expression at fluid-tissue interfaces: potential role in barrier cytoprotection*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993. **90**: p. 725-9.
262. Navab M, H.-L.S., Van Lenten BJ, et al., *Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio*. *J Clin Invest* 1997. **99**: p. 2005-19.
263. Ishikawa Y, A.Y., Ishii T, et al., *Distribution and synthesis of apolipoprotein J in the atherosclerotic aorta*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998. **18**: p. 665-72.
264. Miyata M, B.S., Kaieda H, et al., *Apolipoprotein J/clusterin is induced in vascular smooth muscle cells after vascular injury*. *Circulation* 2001. **104**: p. 1407-12.
265. Millis AJ, L.M., McCue HM, Rosenberg ME, Moulson CL., *Clusterin regulates vascular smooth muscle cell nodule formation and migration*. *J Cell Physiol* 2001. **186**: p. 210-9.
266. Patton WF, E.-B.H., Marks AR, Tempst P, Taubman MB., *Components of the protein synthesis and folding machinery are induced in vascular smooth muscle cells by hypertrophic and hyperplastic agents. Identification by comparative protein phenotyping and microsequencing*. *J Biol Chem* 1995. **270**: p. 21404-10.
267. Dietl T, D.W., Hochstrasser K., *Human inter-alpha-trypsin inhibitor. Limited proteolysis by trypsin, plasmin, kallikrein and granulocytic elastase and inhibitory properties of the cleavage products*. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 1979. **360**(9): p. 1313-8.
268. Pratt CW, P.S., *Mechanism of action of inter-alpha-trypsin inhibitor*. *Biochemistry*, 1987. **26**(10): p. 2855-63.
269. Pratt CW, S.M., Pizzo SV., *Inflammatory cells degrade inter-alpha inhibitor to liberate urinary proteinase inhibitors*. *J*

- Leukoc Biol, 1989. **45**(1): p. 1-9.
270. Kobayashi H, G.J., Hirashima Y, Terao T., *Inter-alpha-trypsin inhibitor bound to tumor cells is cleaved into the heavy chains and the light chain on the cell surface.* . J Biol Chem, 1996. **271**(19): p. 11362-7.
271. Kida, D., Yoneda, M., Miyaura, S., Ishimaru, T., Yoshida, Y., Ito, T., Ishiguro, N., Iwata, H., and Kimata, K., *The SHAP-HA complex in sera from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis* J. Rheumatol., 1999. **26**: p. 1230-8.
272. Yingsung, W., Zhuo, L., Morgelin, M., Yoneda, M., Kida, T., Watanabe, H., Ishiguro, N., Iwata, H., and Kimata, K., *Molecular heterogeneity of the SHAP-hyaluronan complex. Isolation and characterization of the complex in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis.* J. Biol. Chem., 2003. **278**: p. 32710-18.
273. De La Motte, C.A., Hascall, V. C., Drazba, J., Bandyopadhyay, S. K., and Strong, SA., *Mononuclear leukocytes bind to specific hyaluronan structures on colon mucosal smooth muscle cells treated with polyinosinic acid:polycytidylic acid: inter-alpha-trypsin inhibitor is crucial to structure and function.* Am. J. Pathol, 2003. **163**: p. 121-133.
274. Laurent, T.C., *Biochemistry of hyaluronan.* Acta Otolaryngol. Suppl., 1987. **442**: p. 7-24.
275. Laurent, T.C., *The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and Its Derivatives* Portland Press, 1998: p. 305-314.
276. McNally T, M.I., Machin SJ, Isenberg DA., *Elevated levels of beta 2 glycoprotein-I (beta 2 GPI) in antiphospholipid antibody syndrome are due to increased amounts of beta 2 GPI in association with other plasma constituents.* Blood Coagul Fibrinolysis 1995. **6**: p. 411-6.
277. Schousboe I., *beta 2-Glycoprotein I: a plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway.* Blood 1985. **66**: p. 1086-91.
278. Takeuchi R, A.T., Ieko M, Amasaki Y, Ichikawa K, Koike T., *Suppressed intrinsic fibrinolytic activity by monoclonal anti-beta-2 glycoprotein I autoantibodies: possible mechanism for thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome.* Br J Haematol 2002. **119**: p. 781-8.
279. Sheng Y, R.S., Herzog H, et al., *Impaired thrombin generation in beta 2- glycoprotein I null mice.* . J Biol Chem 2001. **276**: p. 13817-21.
280. Miyakis S, G.B., Krilis SA., *Beta 2 glycoprotein I--function in health and disease.* . Thromb Res 2004. **114**: p. 335-46.
281. Yasuda S, A.T., Ieko M, et al., *Nicked beta2-glycoprotein I: a marker of cerebral infarct and a novel role in the negative feedback pathway of extrinsic fibrinolysis.* Blood 2004. **103**: p. 766-72.
282. Hasunuma Y, M.E., Makita Z, Katahira T, Nishi S, Koike T., *Involvement of beta 2-*

- glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in oxidatively modified low-density lipoprotein uptake by macrophages.* Clin Exp Immunol 1997. **107**: p. 569-73.
283. Rhee SG, W.H., Kil IS, Bae SH,, *Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides.* J Biol Chem, 2012. **287**(7): p. 4403-10.
284. Lee TH, K.S., Yu SL, Kim SH, Park DS, Moon HB, Dho SH, Kwon KS, Kwon HJ, Han YH, Jeong S, Kang SW, Shin HS, Lee KK, Rhee SG, Yu DY., , *Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice.* Blood, 2003. **101**(12): p. 5033-8.
285. Chao J, S.J., Liang YM, et al., *Kallistatin is a potent new vasodilator.* J Clin Invest 1997. **100**: p. 11-17.
286. Miao RQ, A.J., Chao L, et al., *Kallistatin is a new inhibitor of angiogenesis and tumor growth.* Blood 2002. **100**: p. 3245-52.
287. Wang CR, C.S., Wu CL, et al., *Prophylactic adenovirus-mediated human kallistatin gene therapy suppresses rat arthritis by inhibiting angiogenesis and inflammation.* Arthritis Rheum 2005. **52**: p. 1319-24.
288. Lewis GD, W.G., Liu E et al., *Metabolite profiling of blood from individuals undergoing planned myocardial infarction reveals early markers of myocardial injury.* Journal of Clinical Investigation, 2008. **118**(10): p. 3503-12.
289. Zhang F, J.Z., Gao P et al., , *Metabonomics study of atherosclerosis rats by ultra fast liquid chromatography coupled with ion trap-time of flight mass spectrometry.* Talanta, 2009. **79**(3): p. 836-44.
290. Teul J, R.F., Garcia A et al., , *Improving metabolite knowledge in stable atherosclerosis patients by association and correlation of GC-MS and <sup>1</sup>H NMR fingerprints.* Journal of Proteome Research, 2009. **8**(12): p. 5580-9.
291. Sabatine MS, L.E., Morrow DA et al., *Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia.* Circulation, 2005. **112**(25): p. 3868-75.
292. Mayr M, Y.S., Weir G et al., *Combined metabolomic and proteomic analysis of human atrial fibrillation.* Journal of the American College of Cardiology, 2008. **51**(5): p. 585-94.
293. Baum SJ, K.-E.P., Willett WC, Lichtenstein AH, Rudel LL, Maki KC, Whelan J, Ramsden CE, Block RC., *Fatty acids in cardiovascular health and disease: A comprehensive update.* J Clin Lipidol, 2012. **6**(3): p. 216-34.
294. Chen X, L.L., Palacios G, Gao J, Zhang N, Li G, Lu J, Song T, Zhang Y, Lv H., , *Plasma metabolomics reveals biomarkers of the atherosclerosis.* J Sep Sci. , 2010. **33**(17-18): p. 2776-83.
295. Titov VN, K.V., Shiriaeva IuK., *Prevention of atherosclerosis. Excess of palmitic acid in food-- a cause of hypercholesterolemia, inflammatory syndrome, insulin resistance in myocytes, and apoptosis.* Klin Lab Diagn., 2011. **2**: p. 4-15.

296. Korpachev VV, K.o.N., *Features of fatty-acid spectrum of triglycerides in patients with insulin resistance and metabolic syndrome* Lik Sprava. , 2009(7-8): p. 50-5.
297. Håversen L, D.K., Fogelstrand L, Wiklund O., , *Induction of proinflammatory cytokines by long-chain saturated fatty acids in human macrophages.* . Atherosclerosis, 2009. **202**(2): p. 382-93.
298. Krogmann A, S.K., Haas C, Gommer N, Peter A, Heni M, Machicao F, Häring HU, Staiger H.,, *Inflammatory response of human coronary artery endothelial cells to saturated long-chain fatty acids.* Microvasc Res. , 2011. **81**(1): p. 52-9.
299. Wu JH, L.R., Imamura F, King IB, Song X, Spiegelman D, Siscovick DS, Mozaffarian D.,, *Fatty acids in the de novo lipogenesis pathway and risk of coronary heart disease: the Cardiovascular Health Study.* . Am J Clin Nutr. , 2011. **94**(2): p. 431-8.
300. Hennig, B., M. Toborek, and C.J. McClain. , *High-energy diets, fatty acids and endothelial cell function: implications for atherosclerosis.* Journal of the American College of Nutrition 2001. **20**: p. 97-105.
301. Toborek, M., and Hennig B., *The role of linoleic acid in endothelial cell gene expression. Relationship to atherosclerosis.* Subcellular Biochemistry 1998. **30**: p. 415-36.
302. Wakefield AP, O.M., Ibrahim N, Aukema HM.,, *A dietary conjugated linoleic acid treatment that slows renal disease progression alters renal cyclooxygenase-2-derived prostanoids in the Han: SPRD-cy rat.* J Nutr Biochem, 2011.

## **Anexo**



## Trabajos publicados durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral

- **Artículos científicos**

Barderas MG, **Laborde CM**, Posada M, de la Cuesta F, Zubiri I, Vivanco F, Alvarez-Llamas G. Metabolomic profiling for identification of novel potential biomarkers in cardiovascular diseases. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:790132

**Laborde CM**, Zubiri I, Alonso-Orgaz S, Mourino-Alvarez L, Álvarez-Llamas G, Barderas MG. Aportaciones de la proteómica al laboratorio clínico. *Laboratorio Clínico.* 2011;04:214-24.

**Laborde CM**, Mourino-Alvarez L, Akerstrom F, Padial LR, Vivanco F, Gil-Dones F, Barderas MG. Potential blood biomarkers for stroke. *Expert Rev Proteomics.* 2012 Aug;9(4):437-49.

Posada-Ayala M, Zubiri I, Martin-Lorenzo M, Sanz-Maroto A, Molero D, Gonzalez-Calero L, Fernandez-Fernandez B, de la Cuesta F, **Laborde CM**, Barderas MG, Ortiz A, Vivanco F, Alvarez-Llamas G. Urine metabolomic cardiovascular signature in chronic kidney disease patients. *Kidney Int.* (En revisión).

**Laborde CM**, Mourino-Alvarez L, Posada M, Alvarez-Llamas G, Gomez-Serranillos Reus M, Moreu J, Vivanco F, Padial LR, Barderas MG. Plasma metabolomics reveals a potential panel of biomarkers for early diagnosis in acute coronary syndrome. *Metabolomics* (En revisión).

**Laborde CM**, Moreu J, Vivanco F, Padial LR, Barderas MG. The severity of hypoxia leaves a characteristic plasma proteomic signature in acute coronary syndrome patients. *J Proteomics* (En revisión).

- **Capítulos de libro**

Barderas MG, **Laborde CM**. Metabolomics in aortic stenosis: new insight in stenosis diagnosis, prognosis and treatment. *Aortic Stenosis: New Research.* Ed. Nova Science Publishers. 2012 (Aceptado)

Mourino-Alvarez L, Barderas MG, **Laborde CM**. Proteomics and metabolomics in aortic stenosis: studying healthy valves for a better understanding of the disease. *Aortic Stenosis.* Ed. Intech (En revisión).