

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b>	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>3. OBJETIVOS</b>	5
<b>4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	6
4.1 Enfermedades cardiovasculares	6
4.2 Óxido nítrico (NO)	7
4.2.1 Síntesis de óxido nítrico (NO)	7
4.2.2 Vía de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y óxido nítrico (NO)	8
4.3 Óxido nítrico sintasa (NOS)	9
4.3.1 Isoformas de NOS	10
4.4 Óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS)	11
4.4.1 Regulación de eNOS.	12
4.4.2 Caveola y caveolinas	14
4.5 Función del óxido nítrico (NO)	15
4.6 Endotelio vascular	17
4.6.1 Disfunción endotelial	17
4.6.2 Disfunción endotelial y óxido nítrico	18
4.7 Aterosclerosis	20
4.8 Apolipoproteína E y metabolismo de lípidos.	22
<b>5. MATERIALES Y MÉTODO</b>	25
5.1 Animales	25
5.2 Preparación de tejidos	25
5.3 Determinación de proteínas totales	26
5.4 Análisis de Western blot	27
5.5 Determinación de nitrato y nitrito	31
5.6 Análisis estadístico	33
<b>6. RESULTADOS</b>	34

6.1 Estandarización de Western blot	34
6.1.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida	34
6.1.2 Transferencia	35
6.1.3 Incubación con anticuerpos y revelado	36
6.2 Determinación de proteínas totales	36
6.2.1 Curva de calibración de proteínas	37
6.2.2 Concentración de proteínas de las muestras	39
6.3 Western blot	39
6.4 Determinación de nitratos ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitritos ( $\text{NO}_3^-$ )	43
6.4.1 Curva de calibración de nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ )	44
6.4.2 Contenido de $\text{NO}_2^-$ y $\text{NO}_3^-$ de las muestras	45
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>48</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>52</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>53</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b>	Mortalidad por enfermedades cardiovasculares, ajustado por edad. Chile 1990-2003 y proyección 2004-2010. (MINSAL, 2006).	6
<b>Figura 2</b>	Síntesis del óxido nítrico (Figueras A. y Novoa B. 2012).	8
<b>Figura 3</b>	Vía de nitrato-nitrito-óxido nítrico (Weitzberg E., <i>et al.</i> 2010).	9
<b>Figura 4</b>	Representación de la estructura de eNOS (Dias G., <i>et al.</i> 2011).	12
<b>Figura 5</b>	Regulación de eNOS a nivel de caveolina y del citoplasma de la célula por modificaciones post-traduccionales (Hu L.S., <i>et al.</i> 2013).	14
<b>Figura 6</b>	Estructura de la caveolina (Parton R. and Simons K. 2007).	15
<b>Figura 7</b>	Efectos del óxido nítrico derivado de eNOS a nivel endotelial. (Ben Abdennebi H. <i>et al.</i> 2011).	16
<b>Figura 8</b>	A. Disminución de tetrabiopterina y desacoplamiento de eNOS; B. Incremento de ADMA; C. Alteración en la transcripción de eNOS. Acosta A., <i>et al.</i> 2006.	20
<b>Figura 9</b>	Formación de placa de ateroma. Kumar; <i>et al.</i> 2007.	22
<b>Figura 10</b>	Captación de triglicérido por el hígado y tejido adiposo en presencia y ausencia de ApoE. (Pendse A., <i>et al.</i> 2009).	23
<b>Figura 11</b>	Reducción de $\text{Cu}^{2+}$ y formación de complejo $\text{Cu}^{+1}(\text{BCA})_2$ .	26
<b>Figura 12</b>	Reacciones del método de Griess.	32
<b>Figura 13</b>	Gel cargado con el marcador de peso molecular preteñido y con las muestras de tejido cardíaco A. en la cámara de BIO-RAD y B. Una vez terminada la electroforesis.	35
<b>Figura 14</b>	Membrana de nitrocelulosa donde se visualiza el marcador de peso molecular preteñido.	35

<b>Figura 15</b>	Revelado de membrana, de izquierda a derecha, los primeros 4 pocillos contienen tejido cardiaco de ratones Apo E <sup>+/-</sup> y los últimos 2 de ratones Wild type.	36
<b>Figura 16</b>	A. Representación gráfica de la curva de calibración de concentración de albumina de suero de bovino por el método del ácido bicinconínico B. Primer segmento de la curva original C. Segundo segmento de la curva original.	38
<b>Figura 17</b>	Expresión de eNOS en tejido cardiaco de ratones ApoE <sup>+/-</sup> y sus controles (wild type). A. Western blot para eNOS. B. Western blot para tubulina C. Cuantificación de eNOS. D. Cuantificación de eNOS normalizada por contenido de tubulina. UA = unidades arbitrarias. El * indica un valor de $p = 0,048$ . **, $p = 0,046$ . n= 4 wild type y 5 ApoE <sup>+/-</sup> .	41
<b>Figura 18</b>	Expresión de eNOS fosforilada en tejido cardiaco de ratones ApoE <sup>+/-</sup> y sus controles (Wild type). A. Western blot para eNOS fosforilada en Serina 1177. B. Western blot para eNOS C. Cuantificación de eNOS fosforilada. D. Cuantificación de eNOS fosforilada normalizada por contenido de eNOS. UA = unidades arbitrarias. El * indica un valor de $p = 0,05$ ; n= 4 wild type y 5 ApoE <sup>+/-</sup> .	42
<b>Figura 19</b>	Placa con curva de calibración de nitrato de potasio y muestras para determinar contenido de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> y NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mediante método de Griess.	43
<b>Figura 20</b>	Representación gráfica de la curva de calibración de KNO <sub>3</sub> mediante el método de Griess.	44
<b>Figura 21</b>	Concentración de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> en tejido cardiaco, cuantificado por el método de Griess.	46
<b>Figura 22</b>	Concentración de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> en tejido cardiaco normalizado por: A. concentración de proteínas y por B. peso de los corazones.	46

**Figura 23** Concentración de  $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$  en plasma de ratones 47  
deficientes en ApoE y sus controles (wild type), cuantificado  
por el método de Griess.

## Índice de tablas

<b>Tabla 1</b>	Resumen de las características de las 3 isoformas de NOS. (Assumpção C.R. <i>et al.</i> 2008).	11
<b>Tabla 2</b>	Preparación de gel de poliacrilamida al 7%.	28
<b>Tabla 3</b>	Preparación de gel de poliacrilamida al 10%.	28
<b>Tabla 4</b>	A. Preparación y B. Composición de solución Hunt Auto X-Ray Revelador.	30
<b>Tabla 5</b>	A. Preparación y B. Composición de solución Hunt Auto X-Ray Fijador.	30
<b>Tabla 6</b>	Curva de calibración de concentración de albumina de suero de bovino, mediante método de BCA.	37
<b>Tabla 7</b>	Datos morfométrico de ratones Apo E <sup>+/-</sup> y controles.	39
<b>Tabla 8</b>	Curva de calibración de nitrato de potasio (KNO <sub>3</sub> ), analizado por el método de Griess.	44
<b>Tabla 9</b>	Contenido de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> en tejido cardiaco de ratones ApoE <sup>+/-</sup> y sus controles.	45
<b>Tabla 10</b>	Concentración de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> en plasma de ratones ApoE <sup>+/-</sup> y sus controles.	47