



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
APLICACIÓN CLÍNICA DE LA
PROTEÓMICA REDOX

Autor: Rocío Fernández Mazcuñán

Tutor: Antonio Martínez Ruiz

Convocatoria: Junio 2019

ÍNDICE

1.Abreviaturas utilizadas	
2.Resumen.....	
3.Introducción.....	
4.Objetivos.....	
5.Métodos.....	
6.Resultados.....	
7.Discusión.....	
8.Conclusiones.....	
9.Bibliografía.....	

1.ABREVIATURAS UTILIZADAS

Cys : Cisteína

DTT: Ditionitrotol

EA : Enfermedad de Alzheimer

HNE : 4-Hidroxi-nonenal

IAM: Yodoacetamida

IFM : Interfibrilares

LC-MS : Cromatografía líquida en espectrometría de masas (*Liquid chromatography–mass spectrometry*)

NEM: N-etilmaleimida

RSN: Especies reactivas de nitrógeno

ROS : Especies reactivas de oxígeno

SD : Síndrome de Down

SDS : Dodecil sulfato sódico (*Sodium dodecyl sulfate*)

SSM : Subsarcolemales

Tyr : Tirosina

UPR : Respuesta a proteínas desplegadas (*Unfolded Protein Response*)

UPS : Sistema Ubiquitina Proteasoma

2.RESUMEN

Las proteínas pueden sufrir modificaciones tras su síntesis, es lo que se conoce como modificaciones postraduccionales de las proteínas. La modificación de las proteínas conduce a cambios en su estructura y función, por lo que también pueden verse alteradas las condiciones fisiológicas o patológicas del organismo. La proteómica redox es la encargada de la identificación y el estudio de aquellas proteínas que han sufrido modificaciones oxidativas.

Los numerosos estudios realizados revelan la asociación del estrés oxidativo con cambios en la calidad de las proteínas y su expresión génica, y su papel en el desarrollo y prevalencia de una enfermedad.

3.INTRODUCCIÓN

La proteómica es el estudio de la estructura y función del conjunto de proteínas que constituyen el proteoma. No solo a nivel de proteínas particulares aisladas, sino como conjunto de todas ellas con carácter global, con las interacciones y características que las relacionan.

La proteómica redox es la rama de la proteómica usada para identificar proteínas oxidadas y determinar su extensión y localización en el proteoma de interés. Es decir, lo que se estudia son las modificaciones postraduccionales de las proteínas, aquellas variaciones que pueden sufrir las proteínas tras haber sido sintetizadas. Una vez que se identifican pueden utilizarse como camino para estudiar diferentes condiciones patológicas o enfermedades. Es importante su estudio porque cualquier modificación oxidativa en proteínas va a alterar su estructura y su función, luego el ambiente oxidativo influye en el desarrollo de cualquier enfermedad.

Si es posible mediante métodos proteómicos determinar el estado de una proteína, cuáles son los cambios inducidos, sus niveles, e incluso su clasificación en una categoría, y con todo esto asociarlo a un perfil de una situación fisiológica o patológica determinada, se podrá avanzar en el diagnóstico y conocimiento del mecanismo de una fisiopatología, así como en su abordaje y diferencia de otras patologías, conocer sus biomarcadores, etiología y características específicas que facilitará el avance tanto en el diagnóstico como en el futuro tratamiento. Por tanto a nivel general los objetivos del estudio de la proteómica redox serían:

- Ampliar el conocimiento científico básico
- Conocer mejor el funcionamiento de nuestro organismo.
- Establecer patrones de asociación de estados oxidativos con factores de riesgo para una enfermedad
- Favorecer el diagnóstico temprano de enfermedades
- Aumentar la eficacia de los tratamientos con la posibilidad de dirigirlos hacia nuevas dianas
- Servir como base de conocimiento para próximas investigaciones relacionadas.

Las modificaciones oxidativas postraduccionales más comunes incluyen la formación de carbonilos en cadenas de péptidos primarios, la oxidación de aminoácidos específicos, la formación de aductos proteína-alquenal elevadamente reactivo como HNE procedente de la peroxidación lipídica, nitración de residuos de Tyr y oxidación de residuos de Cys .²

Los residuos de cisteínas son particularmente susceptibles de oxidación , por sus propiedades particulares que le confieren una gran capacidad para reaccionar y oxidarse dando lugar a diferentes productos como el ácido sulfénico , sulfínico , sulfónico , puentes disulfuro , S-nitrosilación ... entre otros. En concreto el análisis del estado oxidativo de las cisteínas se conoce como proteómica redoxiómica . Será el átomo de azufre del aminoácido el que le otorgará la distinción del resto y su facilidad para participar en reacciones de transferencia electrónica . El grupo tiol es rico en electrones y muy nucleófilo, con configuración electrónica electrónica $3s^2 3p 3d^0$, por lo que su estado de oxidación comprende desde -2 a +6 y por ello reacciona con tanta facilidad dando los productos antes mencionados. Serán las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno las que inducirán en la célula diferentes señalizaciones redox por la modificación oxidativa de los residuos de cisteína y el resultado será un cambio en la funcionalidad de la proteína.¹

Los lípidos también son moléculas muy sensibles al estrés oxidativo y al daño molecular, por lo que los productos de la peroxidación lipídica se utilizan como bioindicadores del daño oxidativo. Los productos generados pueden ser altamente reactivos si no son eliminados. Por ejemplo el HNE o 4-Hidroxinonal es uno de los productos más importantes de la peroxidación lipídica. Dada su alta toxicidad es rápidamente metabolizado, sin embargo, no siempre es metabolizado totalmente por lo que una pequeña parte queda intacta y puede reaccionar con todas las biomoléculas y proteínas. Es un alquenal altamente reactivo electrófilo y puede reaccionar formando aductos de Michael con el grupo SH de los residuos de cisteína , el imidazol de residuos de histamina , y los grupos amino de lisina y arginina . El resultado es la formación de aductos proteína-HNE que acompaña al estrés oxidativo y participa en la disfunción del balance redox , por lo que es altamente perjudicial y es considerado un biomarcador de enfermedades importantes.⁹

Así, el estudio de todas estas modificaciones conduce a comprender mejor las bases moleculares de determinadas enfermedades y establecer nuevos objetivos terapéuticos. Los siguientes trabajos presentados son un ejemplo de la aplicación clínica de la proteómica redox:

Trabajo 1: Revisión realizada por Fabio di Domenico, Eugenio Barone, MarziaPerluigi y Allan Butterfield. Se utiliza la proteómica redox para estudiar la Enfermedad de Alzheimer en la cual se identifica un “triángulo de la muerte”, ya que se revela una estrecha relación entre un deficiente metabolismo energético, sobreactivación de mTor y alteración de la homeostasis proteica con el desarrollo de la EA y otras patologías metabólicas.³

Trabajo 2 : Estudio realizado en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario La Princesa y en la Unidad de Investigación del Hospital Santa Cristina el pasado año . Dicho trabajo consistió en el estudio de las diferencias de los proteomas de diferentes patologías . Se compararon los proteomas y proteomas redox de muestras de válvulas aórticas con estenosis aórtica degenerativa e insuficiencia aórtica .¹

Trabajo 3 : Análisis del proteoma y proteoma redox tiólico de un endotelio vascular sometido a estrés oxidativo . Las células fueron estudiadas tras ser sometidas a tres tratamientos diferentes : peróxido de hidrógeno, hipoxia y diamida . ⁷

Trabajo 4 : Análisis del daño oxidativo en mitocondrias de cardiomiocitos sometidos a isquemia-reperfusión y los efectos por pre-acondicionamiento isquémico. Este experimento consistió en el análisis de los proteomas totales y redox tiólicos en las mitocondrias aisladas de cardiomiocitos de rata . ¹⁵

Los últimos tres trabajos comparten que se centran en el estudio de modificaciones postraduccionales reversibles. Son reversibles aquellas modificaciones en las que existe posibilidad de volver al sustrato inicial , bien mediante enzimas u otros mecanismos . La reversibilidad le otorga la capacidad de poder ser útiles para múltiples funciones . Algunos ejemplos son la oxidación de metioninas a sulfóxido , de cisteínas a sulfénico , formaciones de puentes disulfuro,S-tiolación ,S-glutationilación,S-nitrosación o S-nitrosilación .

Por otro lado las irreversibles son aquellas en las que el producto generado es muy estable o no existen sistemas enzimáticos que lo reparen. La única posibilidad de eliminación de la modificación sería la degradación de la proteína . Suelen ser modificaciones asociadas a daños biológicos . Algunos ejemplos son la carbonilación, nitración de tirosinas, oxidación de cisteínas a sulfínico u oxidación de cisteínas a sulfónico. La carbonilación consiste en el ataque directo oxidativo a las cadenas laterales de aminoácidos susceptibles como son la prolina, arginina, lisina y treonina, en presencia de metales que actúan como catalizadores. La incorporación del grupo carbonilo también puede darse por la reacción de la histidina o la cisteína. Así pues , el resultado serán productos como el semialdehído de glutamato y el semialdehídoaminoadípico que la célula solo podría eliminarlos por su degradación . ¹⁰

Nos interesa conocer el grado de carbonilación porque es un buen indicador del estrés oxidativo y del daño celular. Podría ser una propiedad de especificidad y está asociado a determinadas patologías que cursan con alteración de metales y luego afecciones en los centros activos de determinadas enzimas .

Tanto las reversibles como las irreversibles comparten que para que las modificaciones redox sean posibles se hace indispensable la presencia de oxígeno. Unas condiciones aeróbicas van a propiciar la capacidad de oxidación de ciertas moléculas , pero también la generación de especies reactivas como las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies de nitrógeno (RSN) . Estas especies reactivas de oxígeno y nitrógeno adquieren su importancia por su participación en la regulación de varias proteínas involucradas en una gran variedad de procesos biológicos, así como su efecto en genes modificando la expresión y traducción de proteínas, metabolismo, señalización celular y apoptosis .

Es por todo esto que se asocia una alteración en la homeostasis redox con diferentes patologías, como pueden ser las enfermedades neurodegenerativas y las enfermedades cardiovasculares. El efecto nocivo o inocuo de ROS y RSN dependerá así de su equilibrio

producción-destrucción, de manera que si hay una sobreproducción o una escasa eliminación se desencadenará un estrés oxidativo agudo con importantes daños en las biomoléculas de nuestro organismo . En concreto, se ha involucrado el estrés oxidativo con enfermedades como la aterosclerosis, hipertensión, diabetes, cáncer o desórdenes neurodegenerativos .

Son nuestros sistemas de defensa antioxidantes los que se encargan de neutralizar las especies mayoritariamente responsables de los daños, las monoeléctricas. No obstante, aunque las especies radicálicas que son las más reactivas puedan desaparecer eficazmente, seguirán predominando las especies de dos electrones como el peróxido de hidrógeno y el óxido nítrico.

Tanto el peróxido de hidrógeno como el óxido nítrico son especies estables y de baja reactividad. No obstante, esto no las excluye de su participación en una respuesta nociva si se encuentran en elevados niveles . Pueden llegar a atravesar las membranas y actuar como segundos mensajeros o mediadores de la señalización celular . ¹⁰

4. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es presentar la proteómica redox y sus aplicaciones clínicas mediante diferentes trabajos seleccionados .

En cuanto a los trabajos seleccionados sus objetivos son :

-Trabajo 1 (Triángulo de la muerte en EA): Estudiar posibles causas de la EA e identificar la relación del metabolismo energético, vía mTor y la homeostasis proteica con el desarrollo y progresión de la enfermedad. ³

-Trabajo 2(Estudio de válvulas aórticas en diferentes condiciones fisiológicas): Encontrar biomarcadores propios específicos de cada fisiopatología, mejorando la diferenciación entre ellas y la posibilidad de establecer un diagnóstico más preciso . ¹

-Trabajo 3(Estudio del endotelio vascular tras ser sometido a estrés oxidativo) : Analizar los proteomas totales y redoxiólicos para evidenciar el efecto de células endoteliales tras ser sometidas a tres tratamientos diferentes : peróxido de hidrógeno, hipoxia y diamida . ⁷

-Trabajo 4(Estudio de las mitocondrias de cardiomiocitos de diferentes ratas): Analizar las alteraciones en el proteoma de aquellas ratas que habían sido sometidas a isquemia-reperusión en corazón, así como poner de manifiesto el efecto del pre-acondicionamiento isquémico, un mecanismo de protección para disminuir los efectos de la isquemia-reperusión.

Todos los estudios anteriores mantienen en común que su interés por el estudio la proteómica redox tiene como objetivo final poder ampliar el conocimiento científico sobre un tema determinado, conocer los mecanismos moleculares asociados a determinadas patologías, establecer asociaciones entre estados oxidativos y condiciones fisiopatológicas y en definitiva servir como base para mejorar el diagnóstico y tratamiento de enfermedades.

5. MÉTODOS

Para la elaboración de este trabajo ha sido clave el apoyo en el "Manual de la Proteómica" de la Sociedad Española de Proteómica, artículos publicados en la revista ARS(Antioxidants & Redox Signaling) ,y los artículos obtenidos de la base de datos PubMed, de donde también se han recogido revisiones de algunos autores.

Los tres primeros trabajos estudian las modificaciones redox reversibles por lo que tienen técnicas comunes en su investigación. El análisis del proteomaredox tiólico no es facilitado por métodos tradicionales , ya que en la espectrometría de masas no podríamos detectar todas las modificaciones, la ionización MALDI rompe la S-nitrosilación, la S-glutationilación es difícil de detectar por la fragmentación del glutatión, e incluso podrían darse alteraciones en el estado redox de las cisteínas en el propio proceso .

Es por todo lo anterior por lo que para el análisis del proteoma redox tiólico se recurre comúnmente a un método general de derivatización química de los grupos tioles. Esta estrategia consiste en la derivatización de las cisteínas usando reactivos específicos para tioles que permitan el marcaje de estos residuos para posteriormente detectarlos o purificarlos. Los pasos a seguir son bloqueo, reducción, marcaje, etiquetado y análisis (cuantitativo o cualitativo) .

Gelsilox es un método de análisis novedoso cuya importancia reside en que es capaz de diferenciar los cambios en el estado de oxidación de los péptidos de los cambios en la abundancia de proteínas. Su estrategia consiste en basar los resultados obtenidos del análisis en la validación de la hipótesis nula tanto a nivel del péptido como de la proteína, pudiendo calcular así la relevancia de los cambios en el redoxoma y en el proteoma total. Es decir, nos permite analizar de manera global todas las alteraciones y diferenciar entre estados oxidativos de péptidos con cisteínas comparándolos con la hipótesis nula. En definitiva , este método hace posible llevar estudios de proteómica cuantitativa convencional que con una variación nos permite obtener también información de la proteómica redox .

Su técnica consiste en la combinación de la proteómica con la cromatografía líquida y la espectrometría de masas en un análisis masivo . El procedimiento experimental se basa en la extracción de proteínas en presencia de SDS y un reactivo alquilante (suele emplearse NEM o IAM) que va a reaccionar con los tioles libres o con los tioles reducidos , en este paso se trata cada muestra por separado. Seguidamente se someten los extractos a una electroforesis monodimensional para la concentración de las muestras en una sola banda de proteoma en la interfaz de los geles concentrador y separador. Las proteínas quedan

inmovilizadas en el gel y eliminamos el SDS con lavados de agua y acetonitrilo. Al aplicar el reductor DTT todas las cisteínas oxidadas reversiblemente son reducidas. Para los tiolatos liberados se utilizará un agente alquilante diferente al de la extracción. De esta manera se consiguen tener dos grupos de cisteínas, las oxidadas y reducidas, diferenciadas claramente por tener etiquetas diferentes. Los péptidos generados son sometidos a un marcaje diferencial con o18 y o16 , y separados en fracciones por isoelectroenfoco para analizarlos posteriormente por LC-MS . Aquellos péptidos que no contengan cisteína serán útiles para la cuantificación relativa de las proteínas, mientras que los que contienen cisteínas se cuantifican en su estado de oxidación o reducción .¹⁰

En los trabajos seleccionados los procedimientos fueron :

Trabajo 1 (Triángulo de la muerte en EA)

Fueron comparados muestras de cerebros en condiciones fisiológicas frente a EA. Antes de comenzar el estudio se consideró la calidad de la muestra a disposición . Factores como el pH cerebral, intervalo postmortem y métodos de aislamiento y almacenamiento pueden afectar a las modificaciones postraduccionales de las proteínas cerebrales, ya que unas condiciones inadecuadas aumentarían la oxidación de proteínas.

El principal método llevado a cabo fue la doble electroforesis en gel, en los cerebros control y los cerebros con EA paralelamente. Las muestras fueron inicialmente homogenizadas y las proteínas separadas por electroforesis 2D en geles de poliacrilamida. Los geles se incorporan en una membrana de nitrocelulosa y son incubados con anticuerpos específicos de los marcadores buscados, en este caso proteínas carboniladas, proteínas nitrosiladas o aductos de proteína-HNE . En las membranas se formarán manchas de diferente densidad que nos permitirán diferenciar las proteínas del cerebro control del cerebro con EA. Estas manchas son extraídas de los geles, digeridas con tripsina y llevadas a la espectrometría de masas para el análisis de las proteínas. ³

Trabajo 2(Estudio de válvulas aórticas en diferentes condiciones fisiológicas)

Las muestras fueron 24 válvulas aórticas de tres grupos clínicos diferentes: insuficiencia aórtica, estenosis aórtica degenerativa y válvula normofuncional de trasplante cardiaco .

La investigación al estar centrada en el estudio del estado oxidativo de los residuos de cisteína y su relación con determinadas condiciones fisiológicas y patológicas fueron muy útiles el cambio por biotina y el cambio por fluorescencia, ya que emplean reactivos que reaccionan específicamente con los tioles. Además, se usaron principalmente métodos de análisis estadísticos junto con GELSILOX para cada muestra clínica. ¹

Trabajo 3 (Estudio del endotelio vascular tras ser sometido a estrés oxidativo)

Se partió de tres muestras de endotelio vascular para aplicar sobre cada una un tratamiento diferente: peróxido de hidrógeno, hipoxia y diamida .

Trabajo 4 (Estudio de las mitocondrias de cardiomiocitos de diferentes ratas)

Se utilizaron dos muestras diferentes de mitocondrias: subsarcolemales(SSM) e interfibrilares (IFM) procedentes de cardiomiocitos de rata . Un parte de ellas fue sometida directamente a isquemia reperfusión y en otras se aplicó preacondicionamiento isquémico,un mecanismo de protección frente a los efectos de la isquemia-reperfusión.¹⁵

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La oxidación de las proteínas va a modificar su estructura y su función, por lo que también se van a ver alteradas las condiciones fisiológicas o patológicas del organismo. Así, se asocian defectos en la calidad de proteínas con determinadas patologías. Por ejemplo son propios los defectos en la calidad de las proteínas en neuropatologías como el Síndrome de Down (SD). Un estudio de MarziaPerluigi con otros autores identifican alteraciones en el Sistema Ubiquitina Proteasom (UPS). Hay una relación entre el defecto en la poli-ubiquitinación y la oxidación de proteínas, ya que UPS participa en la red de proteostasis. Los cerebros con SD comparados con controles presentan diferencias significativas en la calidad de las proteínas.¹⁴

En pacientes con EA y deterioro cognitivo leve numerosos estudios han desmotrado el incremento de la peroxidación lipídica en estas patologías. MariaPerluigi junto con otros colegiados realizó un estudio para identificar el papel de la peroxidación lipídica en el progreso de la patogénesis de la EA .En la investigación se dectaron numerosos aductos de proteína-HNE en el cerebro de los pacientes con EA. ⁶

Las modificaciones postraduccionales también están presentes en pacientes fumadores. La revisión realizada por Isabella Dalle Donne y otros colegiados presenta el efecto del extracto del humo del tabaco con la carbonilación de las células del epitelio bronquial.Se identifica que en las muestras celulares expuestas a el humo de cigarrillos se induce la carbonilación de proteínas implicadas en procesos metabólicos primarios como el metabolismo lipídico, la agregación de cromosomas y citocinesis. Como consecuencia de la carbonilación se modifica la estructura y función de las proteínas lo que puede conducir a una desregulación de procesos básicos implicados en la homeostasis celular. ⁴

En los trabajos seleccionados los resultados obtenidos fueron :

Trabajo 1 (Triángulo de la muerte en EA)

Se considera el Alzheimer como una enfermedad de demencia multifactorial caracterizada por la acumulación de péptido beta amiloide ,hiperfosforilación de tau,daño en las enzimas relacionadas con el metabolismo, activación de mTor, alteración de la proteostasis, defectos en las mitocondrias y deficiente degradación proteica.

La diana de rapamicina en células de mamífero o mTor es activada particularmente en EA desde sus primeros estadíos, participando en la neurodegeneración y por otro lado inhibiendo las señales de insulina por un mecanismo de feed back negativo . Su

participación en la señalización de la insulina la realiza desde su control en la modulación P13K/AkT y regulando su hiperactivación.

Paralelamente , la resistencia a la insulina cerebral contribuye a la alteración no solo el metabolismo en el cerebro sino también a la alteración del crecimiento neuronal, las relaciones sinápticas y neuroprotección, resultando un incremento de péptido beta amiloide, hiperfosforilación de tau, estrés oxidativo e inflamación.

Por tanto, la EA comparte muchas características en común con las enfermedades relacionadas con la resistencia a la insulina, por lo que podría considerarse una enfermedad metabólica en la que la producción de insulina está reducida y se desencadenan señales de supervivencia, aumento del estrés oxidativo, activación de las citoquinas proinflamatorias, disfunción mitocondrial, metabolismo energético dañado y alteración de la homeostasis proteica.

En el estudio se identifican modificaciones oxidativas en enzimas clave implicadas en la glicolisis, ciclo de Krebs y en las implicadas en el uso de glucosa a nivel cerebral. Dichas condiciones conducen finalmente a la disfunción de las mitocondrias y la promoción de la fuga de ROS. Las alteraciones identificadas en las proteínas fueron :

TABLE 1. REDOX PROTEOMIC DATA IN ALZHEIMER'S DISEASE AND ALZHEIMER'S DISEASE-LIKE DEMENTIA

Protein	Modification	Pathology	Pathway	References
FBA	PC, 3-NT	EAD, MCI	Glycolysis	(209, 242)
GAPDH	PC, 3NT	Rat brain+A β , hAD	Glycolysis	(23)
ENO1	PC, 3NT, HNE,	EAD, MCI, AD	Glycolysis	(32, 38, 49, 50, 208, 209, 239, 243, 244)
PK	PC, 3NT	MCI	Glycolysis	(38, 207)
LDH	3NT, HNE	MCI, AD	Lactic fermentation	(50, 207)
MDH	PC, 3NT, HNE	EAD, MCI, AD	TCA cycle	(145, 208, 244)
EF1A	HNE	MCI	Protein synthesis	(207)
eIF2 α	HNE	MCI	UPR/protein synthesis	(207)
V _o -ATPase	PC	DS	Autophagy	(75)
CatD	PC	DS	Autophagy	(75)
GFAP	PC	Synaptosomes+A β	Chaperone-mediated autophagy	(22)
Grp78/BiP	HNE	DS/AD	UPR	(79)
HSP70/HSC71	HNE	DS/AD, MCI	Chaperones	(79, 207)
HSP60	PC	Rat brain+A β	Chaperones	(23)
HSP90	PC	PCAD	Chaperones	(4)
UCH-L1	PC, HNE	DS, DS/AD, AD	UPS	(48, 57, 75, 79, 239)

3-NT, 3-nitrotyrosine; AD, Alzheimer's disease; DS, Down syndrome; EAD, early Alzheimer's disease; HNE, 4-hydroxynonenal; MCI, mild cognitive impairment; PC, protein carbonyl; PCAD, preclinical Alzheimer's disease; TCA, tricarboxylic acid; UPR, unfolded protein response; UPS, ubiquitin-proteasome system.

Es por tanto que las alteraciones del metabolismo energético, con las señales mTOR y la homeostasis proteica supongan las bases para la muerte y degeneración de neuronas y desarrollo de la EA. Con los estudios proteómicos realizados se identifica el estrés oxidativo con el aumento de las especies reactivas de oxígeno y de las especies de nitrógeno el combustible para este triángulo dañino o círculo vicioso.

El Sistema Ubiquitina Proteasoma(UPS) y la Respuesta a Proteínas Desplegadas (UPR) trabajan en consonancia con al autofagia para promover el mantenimiento de la calidad de las proteínas y degradación de aquellas oxidadas y dañadas . No obstante , estos mecanismos de defensa pueden dañarse por ROS, anulando su función detoxificadora .

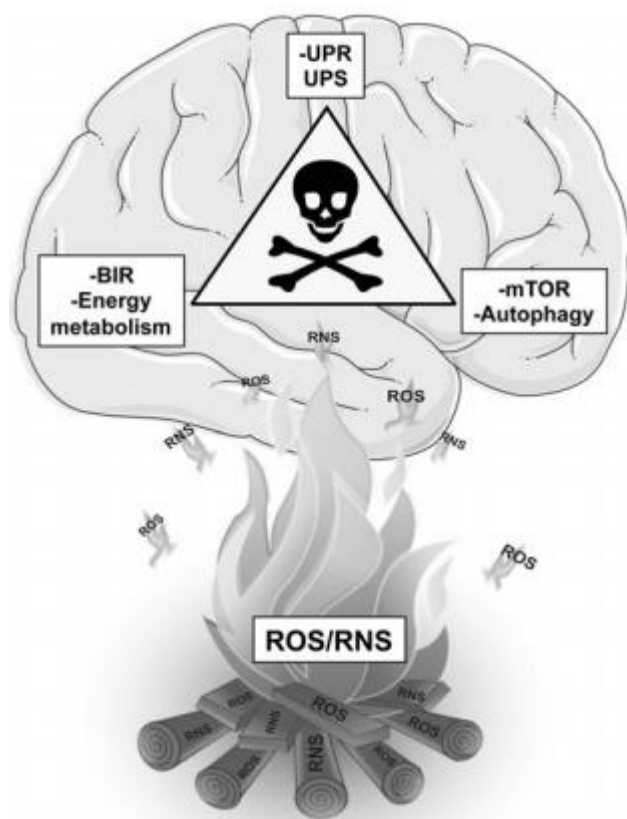


FIG : The Triangle of Death in Alzheimer's Disease Brain

Se representa el estrés oxidativo mediante ROS y RSN como el motor que posibilita el triángulo dañino en el que hay un desequilibrio en el metabolismo energético, en la vía mTOR con la vía de la autofagia, y en la homeostasis proteica mediante UPR y UPS .³

Trabajo 2 (Estudio de válvulas aórticas en diferentes condiciones fisiológicas)

El estudio consistió en el estudio del proteoma y proteoma redox de válvulas pertenecientes a dos grupos de diferentes patologías: Estenosis aórtica degenerativa e insuficiencia aórtica. La primera se caracteriza por una disminución progresiva del área valvular ,por lo que pasa menor cantidad de sangre al resto del cuerpo y el ventrículo izquierdo tiene que realizar mayor esfuerzo. Por otro lado la insuficiencia aórtica consiste en el reflujo de sangre desde la aorta hacia el ventrículo izquierdo durante la diástole ventricular. Con el estudio del proteoma de válvulas de diferentes patologías se pueden encontrar biomarcadores propios de cada enfermedad y permitir así un diagnóstico mas preciso.

Tras los estudios realizados se identificaron notables diferencias oxidativas en los residuos de cisteínas que permitió diferenciar las válvulas aórticas sanas de las válvulas con insuficiencia aórtica , pero no de las válvulas con estenosis aórtica degenerativa . No obstante , la abundancia en el conjunto de proteínas agrupadas por categorías sí permite diferenciar válvulas con estenosis de válvulas con insuficiencia aórtica y de válvulas sanas . Son las apolipoproteínas , proteínas de la Cascada del complemento y proteínas de la

Señalización del fibrinógeno las que presentan variaciones estadísticamente significativas y que por tanto asociamos con las fisiopatologías tratadas .¹

Trabajo 3 (Estudio del endotelio vascular tras ser sometido a estrés oxidativo)

Se sometió una muestra de endotelio vascular a tres tratamientos diferentes : Peróxido de hidrógeno, hipoxia y diamida , para identificar el efecto de cada uno de ellos .

En los resultados observamos que los tres tratamientos inducen la oxidación del proteoma, independientemente del estrés oxidativo, por lo que los cambios en el nivel oxidativo son similares con cualquiera de los tratamientos. Esto nos sugiere la posibilidad de un mecanismo compartido de acción en la oxidación de las cisteínas del endotelio independientemente de quién sea el estímulo. Además se revelan cuales son las principales dianas del estrés oxidativo en el endotelio, aquellos sitios más reactivos que son más fácilmente oxidados o nitrosilados: la Cys173 de la peroxiredoxina-1, la Cys599 de la hsp-90alfa, la Cys139 de la cofilina 1, la Cys 163 de la L lactato deshidrogenasa , entre otros . No obstante, aunque los cambios en la oxidación sean similares no lo son los cambios en la abundancia. Los cambios en la abundancia inducidos por cada tratamiento muestran diferencias significativas, lo que nos hace pensar que la maquinaria proteica actúa de manera diferente dependiendo del estímulo aplicado. Finalmente también podemos afirmar que los tres tratamientos conllevan una disminución de las proteínas asociadas al crecimiento celular, de la síntesis de proteínas, replicación de ADN y procesamiento y transcripción del ARNm.⁷

Trabajo 4 (Estudio de las mitocondrias de cardiomiocitos de diferentes ratas)

Se analizó el proteoma total y el proteoma redox tiólico en las mitocondrias aisladas de cardiomiocitos de rata. Un grupo de ellas habían sido sometidas directamente a isquemia-reperfusión, y otras previamente acondicionamiento isquémico como mecanismo de protección. Las mitocondrias analizadas fueron subsarcolemales e interfibrilares, a los que se asocia a cada tipo una sensibilidad diferente de apertura inducida por calcio, mecanismo fundamental relacionado con la muerte celular por isquemia reperfundida

Son elegidas las mitocondrias como objeto de investigación por las evidencias existentes de su papel en la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, así como su participación tanto en la isquemia reperfundida como en el pre-acondicionamiento isquémico. A esto se le suma que las proteínas mitocondriales son diana del daño oxidativo.

Los resultados obtenidos reflejaron que la isquemia-reperfusión induce un cambio importante en la abundancia de cisteínas oxidadas en SSM, siendo este efecto mucho menos significativo en IFM. Además, se pone de manifiesto la relación directa entre el pre-acondicionamiento isquémico y la inhibición del daño oxidativo. De todos los péptidos con cisteínas oxidadas, se reconocen hasta un 72% en otros modelos como centros activos sensibles a redox. Concluimos por tanto que gracias a la técnica GELSILOX tenemos información de los mecanismos fisiopatológicos subyacentes al pre-acondicionamiento

isquémico y su efecto protector sobre el daño oxidativo ya que cubre las dos alteraciones dinámicas , de abundancia y de estado de oxidación .¹⁵

7.CONCLUSIONES

- Las proteínas pueden sufrir cambios tras su síntesis o modificaciones postraduccionales.
- La modificación oxidativa de las proteínas conlleva cambios en su estructura y en su función.
- Los cambios en los niveles oxidativos de las proteínas están involucrados en el avance y desarrollo de diversas patologías.
- Los defectos en la calidad de las proteínas están asociados a determinadas enfermedades .
- Las investigaciones realizadas revelan notables diferencias de las proteínas de muestras con una patología frente a las muestras control por cambios tanto en la abundancia como en el nivel de oxidación de las proteínas .
- Todos los nuevos avances en el conocimiento científico del proteoma asientan las bases de futuros objetivos terapéuticos y métodos de diagnóstico temprano de diferentes enfermedades.

8.BIBLIOGRAFÍA

1. Cabrera Garcia,J. (2018). Aplicación de la proteómica redox tiólica a muestras clínicas: Enfermedades de válvula aórtica .Trombos de ictus isquémico. Universidad Autónoma de Madrid.
2. Butterfield DA. y Perluigi M. Redox Proteomics: A Key Tool for New Insights into Protein Modification with Relevance to Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*; 2017:277–279.
3. Di Domenico F, Barone E, Perluigi M, Butterfield DA. The Triangle of Death in Alzheimer's Disease Brain: The Aberrant Cross-Talk Among Energy Metabolism, Mammalian Target of Rapamycin Signaling, and Protein Homeostasis Revealed by Redox Proteomics . *Antioxidants & Redox Signaling*; 2017: 364-387 .
4. Dalle-Donne I,Colombo G, Gornati R, L. Garavaglia M, Portinaro N, Giustarini D, Bernardini G, Rossi R, Milzani A. Protein Carbonylation in Human Smokers and Mammalian Models of Exposure to Cigarette Smoke: Focus on Redox Proteomic Studies. *Antioxidants & Redox Signaling*; 2017: 406-426.

5. Sultana R, Perluigi M, y Butterfield DA. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: A redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. *Free Radic Biology & Medicine* ;2013 :157-169.
6. Perluigi M, Sultana R, Cenini G, Di Domenico F, Memo M , M. Pierce W ,Coccia R y Butterfield A. Redox proteomics identification of 4-hydroxynonenal-modified brain proteins in Alzheimer's disease: Role of lipid peroxidation in Alzheimer's disease pathogenesis : *Proteomics Clin Appl*; 2009 : 682–693.
7. González A, Díez J, Fortuño A, Zalba G, Beaumont J, San José G, Moreno U, López B, Ravassa S, Muñiz P, Fortuño MA. Estrés oxidativo vascular y disfunción endotelial. *Revista de Nefrología*(2001)Vol 21.
8. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence? *Lancet* ;1994: 344:721-4.
9. Castro JP, Jung T, Grune T y Siems W. 4-Hydroxynonenal (HNE) modified proteins in metabolic diseases. *Free Radic Biology & Medicine*.2017: 309-315.
10. Corrales, F. and Calvete, J. (2014). *Manual de proteómica*. Pamplona: Sociedad Española de Proteómica.
11. Mieyal JJ. y Chock PB. Posttranslational modification of cysteine in redox signaling and oxidative stress: focus on S-glutathionylation. *Antioxidants & Redox Signaling*; 2012: 471–475.
12. Schafer FQ .y Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biology & Medicine*; 2001: 1191–1212.
13. Young-Mi Go y Jones DP. The Redox Proteome . *Journal Biological Chemistry* ;2013, 288:26512-26520.
14. Tramutola A, Di Domenico F, Barone E, Giorgi A, di Francesco L, Schinia ME, Coccia R, Head E, Butterfield DA, and Perluigi, M. Ubiquitinylation profile in Down syndrome brain prior to and after development of Alzheimer neuropathology. *Antioxid Redox Signal*;2016: :280-298
15. Garcia-Dorado D, Rodríguez A, Ruiz M, Inserte J. Protección contra el daño miocárdico por isquemia-reperfusión en práctica clínica. *Revista Española Cardiología* (2014):394-404 Vol 67 Num 05
16. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: *Source, biochemistry and role in human disease*; 1991: 14S-22S.