

Cagnolo, Fernanda Maitén

Evaluación de la eficacia del nuevo biofármaco Brecept para prevenir la fibrosis cardíaca en ratones con infarto de miocardio : análisis inicial de método de delivery intramuscular de un vector lentiviral

2023

Instituto: Ciencias de la Salud

Carrera: Bioquímica



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.
Atribución – no comercial – sin obra derivada 4.0
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Documento descargado de RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Arturo Jauretche

Cita recomendada:

Cagnolo F. M. (2023). *Evaluación de la eficacia del nuevo biofármaco Brecept para prevenir la fibrosis cardíaca en ratones con infarto de miocardio : análisis inicial de método de delivery intramuscular de un vector lentiviral* [tesis de grado, Universidad Nacional Arturo Jauretche]

Disponible en RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital UNAJ

<https://biblioteca.unaj.edu.ar/rid-unaj-repositorio-institucional-digital-unaj>

Agradecimientos

Comenzaré este trabajo que da el cierre a una carrera maravillosa como es la bioquímica mencionando a aquellas personas que me ayudaron, me empujaron, aconsejaron, me enseñaron más allá de los conocimientos que puede otorgar un libro y sobre todo me apoyaron; en fin, a todos esos seres que estuvieron -y muchos aún están-, en los diferentes momentos de este arduo camino sinuoso universitario.

Agradezco al equipo de investigadores, entre ellos a Ricardo Dewey, el director de este trabajo, quién abrió las puertas de su laboratorio, depositó su confianza en mí, y de este modo me permitió colaborar en una investigación que va a ser revolucionaria.

A Pamela Vázquez, quién me guió e instruyó a lo largo del desarrollo del trabajo, una persona con una paciencia de oro y compañera inigualable. Una profesional de lujo con quién conté todo el tiempo.

Al co- director Martín Zubieta por haber aceptado formar parte de este lindo proyecto y acompañarme en el desarrollo de la tesina.

A todo el equipo que conforma el CEMET y a la directora Viviana Fannesi que me dejó ser parte de un grupo de investigación y desarrollar ahí mi tesina.

A mis padres por el apoyo incondicional, por el empuje y el aguante de siempre; por los consejos, por prestarme el oído y bancarse los monólogos los días antes de los finales.

A mi hermano, que me ayudó y orientó a lo largo de la carrera -y de la vida misma-.

A mi madrina gracias por tu compañía alentadora y por ser un ejemplo a seguir.

A mis abuelos, por estar a pesar de preocuparlos cada vez que rendía un examen. A toda mi familia, sin dar más detalles, que aun cuando no podían entender el porqué de la elección de una carrera que te hace fortalecer los bíceps, de tanto remarla, nunca perdieron la fe de que iba a llegar a concretarla, o al menos eso me hicieron creer.

Agradezco también a mi novio, Pato, por estar, por ayudarme a ver las cosas desde otra perspectiva, por apoyarme, alentarme para seguir mejorando y creciendo. Gracias por desvelarte más de una vez para acompañarme a terminar de escribir mi tesina.

A Agus por prestarme apuntes, darme tips para dar los últimos pasos, gracias cuñada y colega.

A Patri, gracias por estar y brindarme tu apoyo.

Finalmente agradezco a mi notebook Compaq por no morir en el desarrollo de la tesina y guardarme la info del trabajo.



ÍNDICE

Abstract.....	1
Resumen.....	1
1. INTRODUCCIÓN E IMPORTANCIA DEL TEMA.....	3
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	8
2.1. Hipótesis de la investigación.....	8
2.2. Objetivos.....	8
2.2.1. Objetivo General.....	8
2.2.2. Objetivos específicos.....	8
3. METODOLOGÍA	9
3.1. Evaluación inicial de la expresión de Brecept en el plasma, cuádriceps y ventrículo izquierdo de ratones sanos.....	9
3.1.1. Purificación de ARN y Proteínas.....	9
3.1.2. Cuantificación de proteínas con Bradford	10
3.1.3. Cuantificación de proteínas con BCA.....	10
3.1.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blots	11
4. DESARROLLO	12
5. Resultados de cuantificación	14
5.1. Muestras correspondientes a cada grupo de ensayo.....	14
5.2. Resultados de la cuantificación de proteínas	18
6. Resultados del Western blot	23
6.1. Grupo 1 WB.....	24
6.2. Grupo 2 WB.....	26
6.3. Grupo 3 WB.....	27
6.4. Grupo 4 WB.....	31
7. CONCLUSIONES	33
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
9. ANEXO	41
9.1. RT-qPCR.....	41
9.2.1. Muestra #4d7 VI (Grupo 1)	43
9.2.2. Muestra #4d7 MP (Grupo1)	44
9.2.3. Muestra #2d15 MP y VI (Grupo2)	45

9.2.4.	Muestras #1d10 MP, #1d15 MP, #1d20 MP y #2d20 MP (Grupo 3).....	46
9.2.5.	Muestras #2d10, #2d15 y #2d20 (Grupo 3) MP; #1d10 (Grupo4) MP	47
9.3.	Cultivo celular eucariota.....	47
9.3.1.	Recuento celular.....	48
9.3.2.	Generación de vectores lentivirales mediante co- transfección.....	49
9.4.	ELISA	51
9.4.1.	Resultados de la Grupo 1 de muestras de suero	51
9.4.2.	Resultados de la Grupo 2 de sueros.....	54
9.4.3.	Resultados de la Grupo 3 de sueros.....	55
9.4.4.	Resultados de la Grupo 4 de sueros.....	56
10.	APÉNDICE	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Muestras totales obtenidas.....	14
Tabla 2	Grupo 1: músculo pata.....	15
Tabla 3	Grupo 1: músculo cardíaco.....	15
Tabla 4	Grupo 2: músculo pata.....	15
Tabla 5	Grupo 2: músculo cardíaco.....	15
Tabla 6	Grupo 3: músculo pata.....	16
Tabla 7	Grupo 3: músculo cardíaco.....	17
Tabla 8	Grupo 4: músculo pata.....	17
Tabla 9	Grupo 4: músculo cardíaco.....	18
Tabla 10	Muestras WB: Grupo 1	24
Tabla 11	Muestras WB: Grupo 2.....	26
Tabla 12	Muestras WB: Grupo 3	27
Tabla 13	Muestras WB: Grupo 4.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Cuantificación proteínas d2 #2 VI. Técnica: Bradford (Grupo1)	19
Figura 2	Cuantificación proteínas d7 #4 VI. Técnica: Bradford (Grupo1)	19
Figura 3	Cuantificación proteínas d7 #4 MP. Técnica: Bradford (Grupo1).....	20
Figura 4	Cuantificación proteínas d15 #2 VI y MP. Técnica BCA (Grupo2).....	21

Figura 5 Cuantificación de proteínas d10 animales #3- #4 y d15 animales #1- #2. Técnica BCA (grupo 3).....	22
Figura 6 Cuantificación proteínas d10 animales #1 a #5 y d15 animales #1 a #5. Técnica BCA (grupo 3).....	22
Figura 7 Cuantificación proteínas d10 animales #1 a #5 VI (grupo 3), d20 animales #1 a #5 MP (grupo 3), d10 animales #1a #5 VI y MP (grupo 4). Técnica BCA.....	23
Figura 8 Día 2 #2 VI (grupo1).....	24
Figura 9 Día 7 #4 VI (grupo1).....	25
Figura 10 Día 7 #4 MP (grupo1).....	26
Figura 11 Día 15 #2 VI y MP (grupo2).....	27
Figura 12 Día 10 #1 y #2 MP.....	28
Figura 13 Día 15 #1 y día 20 #1 MP.....	28
Figura 14 Día 10 #3 y #4 MP y día 15 #2 MP.....	29
Figura 15 Día 10 animales #1, #2, #3, #4 y #5 (grupo 3).....	29
Figura 16 Día 15 animales #1, #2, #3, #4 y #5 (grupo 3).....	30
Figura 17 Día 10 animales #1, #2, #3, #4 y #5 (repetición del ensayo) y día 20 animales #1, #2 y #3 (grupo 3).....	31
Figura 18 Día 10 animales #1, #2, #3, #4 y #5 (grupo 4) y día 20 #4 y #5 (grupo 3).....	32
Figura 19 RT-qPCR en un paso vs. dos pasos.....	41
Figura 20 Gráfico de amplificación de una PCR a tiempo real.....	42
Figura 21 RT-qPCR #4d7 VI t1.....	43
Figura 22 RT-qPCR #4d7 MP t1.....	44
Figura 23 RT-qPCR #2d15 MP y VI t2.....	45
Figura 24 RT-qPCR #1d10 MP, #1d15 MP, #1d20 MP y #2d20 MP (t3).....	46
Figura 25 RT-qPCR #2d10 t3, #2d15 t3, #2d20 t3; #1d10 t4. Todas las muestras corresponden a músculo de la pata.....	47
Figura 26 Preparación de cultivo celular.....	48
Figura 27 Cámara de Neubauer.....	49
Figura 28 Transfección no utilizada(VAFC).....	50
Figura 29 Transfección utilizada en grupo 3 y grupo 4 (VCFC).....	50
Figura 30 Resultado ELISA grupo 1 suero para VAFC y VCFC.....	51
Figura 31 Repetición de ELISA para grupo 1 con nuevos anticuerpos.....	52
Figura 32 ELISA Grupo 1 concentraciones.....	53
Figura 33 Resultado ELISA Grupo 2 suero día 10 y 15 para VAFC y VCFC.....	54
Figura 34 Resultados ELISA Grupo 2 suero día 20.....	54

Figura 35 Resultados ELISA Grupo 3 sueros del día 10, 15 y 20 para VCFC	55
Figura 36 Resultado ELISA para sueros Grupo 4 del día 10 para VCFC	56

Abstract

Fibrosis is associated with alterations in the normal structure of the heart at the level of cardiomyocytes, with excessive deposition and accumulation of extracellular matrix proteins. TGF- β is a multifunctional cytokine involved in critical processes, including wound healing, as well as cellular proliferation, maturation, and differentiation. Three TGF- β isoforms have been identified in mammals: TGF- β 1, TGF- β 2, and TGF- β 3. Members of this superfamily appear to drive fibrosis in the heart, kidneys, lungs, and liver. TGF- β 1 is a well-known promoter of cardiac fibrosis, as it is predominantly found in the cardiovascular system. In animal models of myocardial infarction, treatment with type I TGF-Beta inhibitors was performed to reduce its activity, showing attenuation of myocardial remodeling and left ventricular dysfunction. To modulate the effect of TGF- β in vivo, a lentiviral vector has been constructed that encodes the innovative recombinant protein T β RII-SE fused in frame with the Fc domain of human immunoglobulin 1 (IgG1), called Brecept, which has demonstrated its antifibrotic capacity in animal models of liver fibrosis.

In this work we sought to start with the development of the intramuscular delivery method of a lentiviral vector that encodes Brecept that allows evaluating it as a potential candidate for the treatment of post-myocardial infarction cardiac fibrosis.

Resumen

La fibrosis se asocia con alteraciones de la estructura normal del corazón a nivel de los cardiomiocitos, a una deposición y acumulación excesiva de proteínas de la matriz extracelular. TGF- β , es una citoquina multifuncional involucrada en procesos críticos, incluida la cicatrización de heridas junto con la proliferación, maduración y diferenciación celular. Se han identificado tres isoformas de TGF- β en mamíferos: TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. Los miembros de esta superfamilia parecen conducir a la fibrosis en el corazón, los riñones, los pulmones y el hígado. TGF- β 1 es un conocido promotor de la fibrosis cardíaca, ya que se encuentra predominantemente en el sistema cardiovascular. En modelos animales de infarto del miocardio, se realizó tratamiento con inhibidores del TGF- β 1 para reducir la actividad de este mostrando una atenuación del remodelamiento miocárdico y de la disfunción del ventrículo izquierdo. Para modular el efecto de TGF- β in vivo, se ha construido un vector lentiviral que codifica la innovadora proteína recombinante T β RII-SE fusionado en marco con el dominio Fc de la inmunoglobulina 1 humana (IgG1), denominada Brecept, con la cual se ha demostrado su capacidad anti fibrótica en modelos animales de fibrosis hepática.

En este trabajo se buscó iniciar con la puesta a punto del método de delivery intramuscular de un vector lentiviral que codifica Brecept que permita evaluarlo como un potencial candidato para el tratamiento de la fibrosis cardiaca post-infarto de miocardio.

1. INTRODUCCIÓN E IMPORTANCIA DEL TEMA

La mayoría de las personas que sufren de infarto de miocardio desarrollan una cicatriz del tejido cardíaco, conocida como fibrosis. La fibrosis cardíaca, es un endurecimiento del músculo del corazón que conduce a una variedad de enfermedades, en particular a la insuficiencia cardíaca. Esto se debe a que hay una alteración en el proceso natural de la curación de una herida. En condiciones normales, células especializadas conocidas como fibroblastos depositan capas de proteínas de colágeno para formar una cicatriz y, en consecuencia, permitir sanar las heridas. Sin embargo, en circunstancias anormales, y por razones que se desconocen, la excesiva producción proteica de la matriz, como el colágeno, resulta en la cicatrización patológica, o fibrosis. En el corazón, la acumulación de matriz deja el órgano rígido e inflexible, incapaz de funcionar correctamente y relajarse.¹ La fibrosis miocárdica constituye cambios histológicos y morfológicos en respuesta a las variaciones en la geometría y en la masa miocárdica, generando una sobrecarga de presión, un incremento en el estrés de la pared ventricular e induciendo hipertrofia de los cardiomiocitos, modificaciones que son parcialmente compensatorias y que de forma persistente llevan a cambios no-adaptativos tanto de las células cardíacas como de la matriz extracelular y de la microcirculación coronaria, lo que finalmente se traduce en el remodelamiento del miocardio.² La matriz extracelular del miocardio está compuesta por un complejo número de macromoléculas, incluyendo las proteínas de colágeno. Así, en el miocardio existen fibras tipo I, III y IV, siendo predominantes el tipo I (80%) y el tipo III (10%). Un cúmulo exagerado de fibras de tipo I y III explica la fibrosis difusa o intersticial, lo cual define la forma histopatológica de la fibrosis miocárdica de los corazones humanos sometidos a sobrecarga de presión en el ventrículo izquierdo.³⁻⁶ Se ha demostrado en modelos animales y estudios clínicos que la fibrosis miocárdica se asocia con un incremento en la rigidez del ventrículo izquierdo, lo cual genera incremento de las presiones de llenado del ventrículo izquierdo y contribuye al desarrollo de disfunción diastólica⁷. La rigidez del ventrículo izquierdo depende no solo del número de fibras de colágeno sino también de las propiedades cualitativas del mismo.

Desde el punto de vista puramente mecánico se ha propuesto que la acumulación progresiva del colágeno del endomisio puede resultar en el atrapamiento de cardiomiocitos, generando una reducción en la extensión del sarcómero, lo que, tal como predice la ley de Frank-Starling, lleva a una reducción de la fuerza de contracción del ventrículo izquierdo.⁸

El proceso de remodelación iniciado como una respuesta compensatoria al daño y al estrés mecánico, se convierte lentamente en un proceso que conduce a la disfunción ventricular progresiva.⁹ Después del IAM se presenta una importante respuesta inflamatoria en la que se producen y liberan varias citocinas. Las citocinas son importantes mediadores del sistema inmune y se pueden subdividir en pro y antiinflamatorias. Están involucradas importantemente en procesos patológicos como el edema pulmonar, las anomalías del músculo esquelético, la apoptosis de los miocitos, la disfunción endotelial y diferentes enfermedades cardíacas.¹⁰

Se ha reportado que en el período agudo del IAM, aumenta la producción de varias citocinas, entre ellas el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina-6 (IL-6), la interleucina-1 beta (IL-1 β) y el factor de crecimiento transformante-beta1 (TGF- β 1).^{11,12} Estas citocinas son consideradas las más relacionadas con el proceso de remodelación ventricular postinfarto.¹³ No se encuentran constitutivamente expresadas en el corazón en condiciones normales.¹⁴ Sin embargo ante un daño al miocardio, se presenta un gran aumento en sus niveles plasmáticos.¹¹⁻¹⁴

La fibrosis se asocia con alteraciones de la estructura normal del corazón a nivel de los cardiomiocitos y a una deposición en conjunto con una acumulación excesiva de proteínas de la matriz extracelular. Los mediadores celulares de la fibrosis predominantemente son los fibroblastos, se supone que éstos se originan de las células embrionarias mesenquimatosas y que aumentan en número únicamente como consecuencia de la proliferación de los fibroblastos adultos residentes. Esta hipótesis ha sido cuestionada por un estudio que sugiere que, durante los procesos fibrosantes, los fibroblastos derivados de la médula ósea y las células epiteliales también contribuyen a la acumulación de estos, por medio de un proceso llamado transición epitelio-mesenquimal. Las señales inductivas, como el factor de crecimiento transformador beta (TGF- β) y las proteínas morfogénicas óseas (BMP), están diseñadas para regular esa transición.¹ TGF- β , es una citoquina multifuncional involucrada en procesos críticos, incluida la regulación inmunitaria y la cicatrización de heridas junto con la proliferación, maduración y diferenciación celular.¹⁵ Se han identificado tres isoformas de TGF- β en mamíferos: TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. Están codificados por genes distintos que comparten una identidad de secuencia del 64% al 82%. Estos genes se regulan según el desarrollo y de manera específica para cada tejido.¹⁶ Los miembros de esta superfamilia parecen conducir a la fibrosis en el corazón, los riñones, los pulmones y el hígado. TGF- β 1 es un conocido promotor de la fibrosis cardíaca, ya que se encuentra predominantemente en el sistema cardiovascular. A su vez, es capaz de inducir la transición epitelio-mesenquimal, mientras que la BMP 7, un antagonista de la vía de TGF- β , conserva el fenotipo endotelial y

revierte o impide la transición inducida por TGF- β 1. La forma activa de TGF- β se une a los receptores de membrana y estimula a Smad2 y Smad3 (que también participan en las vías de señalización de las proteínas morfogénicas del hueso). La respuesta fibrótica se puede dividir en tres fases: la fase de inicio, la fase efectiva y la fase de amplificación. Después de los estímulos, los niveles de factores de crecimiento y citocinas profibróticas circulantes y miocárdicos aumentan, desencadenando la respuesta fibrótica.¹⁷ En la fase efectiva, estos factores de crecimiento y citocinas profibróticas se unen a sus receptores y luego desencadenan la activación de la vía de señalización y factores transcripcionales que incluyen Smad, proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), proteína quinasa B (PKB, también llamada AKT) y factor nuclear kappa B (NF- κ B). Estas activaciones patológicas conducen a la transformación de los fibroblastos cardíacos (CF) en miofibroblastos, que expresarían la proteína altamente contráctil α -SMA y producirían una serie de metaloproteinasas de matriz (MMP) e inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP) para regular la homeostasis de la matriz extracelular (MEC). Además, estos factores transcripcionales profibróticos regulan la síntesis y secreción de factores de crecimiento profibróticos y citocinas en las CF. Los factores de crecimiento y las citoquinas secretadas por las CF u otras células, por ejemplo, los cardiomiocitos, las células endoteliales y las células inflamatorias, pueden funcionar en las CF o los cardiomiocitos, formando una retroalimentación positiva y eventualmente amplificando la respuesta fibrótica.^{17,18} La identificación de la sobre regulación de TGF- β 1, Smad2 y Smad3 en los corazones fibróticos apoya la idea de que esta vía es importante para el desarrollo y la progresión de la cicatrización cardíaca y la hipertrofia del órgano.

La señalización canónica comienza cuando las isoformas de TGF- β maduras y diméricas se unen a complejos de receptores de la superficie celular que comprenden receptores “Tipo II” (T β RII) y “Tipo I” (T β RI).¹⁹

Hace unos años, científicos del laboratorio en el que se desarrolló este trabajo de tesis identificaron una nueva variante de *splicing* de TGFBR2 en linfocitos humanos. La nueva isoforma fue denominada T β RII-SE (T β RII Soluble Endógeno) y presenta una deleción de 149 nucleótidos en el dominio extracelular (deleción de los últimos 66 nucleótidos del exón II y de los primeros 83 nucleótidos del exón III del gen *tgfbr2*). Esta deleción en el ARNm produce un cambio en el marco de lectura a partir del aminoácido 68, que se corresponde con la aparición prematura de un codón de terminación, generándose una proteína truncada de sólo 80 aminoácidos carente del dominio transmembrana.²⁰ Además, como consecuencia del corrimiento de marco de lectura, los 13 aminoácidos del extremo C-terminal de esta nueva isoforma soluble (FSKVHYEGKKKAW) difieren de los residuos correspondientes en las

otras dos variantes. A diferencia de T β RII y su variante de splicing T β RII-B, la isoforma T β RII-SE se une a los tres ligandos de TGF- β , en el rango de afinidad pico molar, sin la participación de receptores adicionales. Para evaluar funcionalmente la capacidad de T β RII-SE para modular el efecto de TGF- β in vivo, se ha construido un vector lentiviral que codifica la innovadora proteína recombinante T β RII-SE fusionado en marco con el dominio Fc de la inmunoglobulina 1 humana (IgG1), denominada Brecept, con la cual se ha demostrado su capacidad anti fibrótica en modelos animales de fibrosis hepática. A nivel terapéutico, la administración de vectores lentivirales portadores de T β RII-SE /Fc en un modelo de fibrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono (CCl₄) en ratas, redujo el daño hepático y el desarrollo de la fibrosis, a niveles semejantes a los demostrados por T β RII-Fc.²⁰

Cabe mencionar que un vector es un medio transportador que permitirá introducir el material genético de interés.²¹ Los vectores lentivirales son una especie de retrovirus, el mejor estudiado es el VIH. Los vectores lentivirales tienen la capacidad de ingresar a la célula e insertar su material genético en células en activa división, como las células madre, y células que no se dividen, como las células cardíacas. Los lentivirus integran su material genético en el genoma del huésped. Esta integración significa que el material genético tiene una mayor durabilidad, lo que permite una expresión continua del transgén.^{22,23,24}

Siguiendo con el tema de la fibrosis tisular, ésta afecta a muchos órganos, incluidos el hígado, la piel, el corazón, los riñones y los pulmones; y es además una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo.²⁵ El TGF- β se considera un regulador maestro de la acumulación de Matriz extracelular (MEC) y, en consecuencia, un impulsor clave de la fibrosis.²⁶ Dada la señalización aumentada de TGF- β en cáncer y fibrosis,²⁷ TGF- β se ha convertido en un objetivo terapéutico prometedor. Las enfermedades fibróticas causan anualmente más de 800.000 muertes en todo el mundo, de las cuales la mayoría se debe a fibrosis pulmonar y cardíaca. Una remodelación patológica de la matriz extracelular ya sea por envejecimiento o como resultado de una lesión o enfermedad conduce a cicatrices fibróticas. En el corazón, estas cicatrices causan varias disfunciones cardíacas, ya sea por la reducción de la fracción de eyección debido a una matriz miocárdica rígida, o por el deterioro de la conductancia eléctrica, o incluso pueden conducir a la muerte.²⁸

La enfermedad cardiovascular (ECV) es la primera causa de muerte global, representando el 31,8% del total de las muertes.²⁹ Además es responsable de una de cada tres muertes a nivel global y se estima que en el mundo fallecen unos 18 millones de personas al año.³⁰ El infarto de miocardio (IM) a menudo conduce a la remodelación del ventrículo izquierdo (VI), que se caracteriza por dilatación ventricular, disminución del rendimiento cardíaco y mala recuperación de la función.³¹ Por lo tanto, los pacientes que escapan a la muerte durante la

etapa aguda de un MI grande tienen alto riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca (IC) durante la etapa crónica. De hecho, los pacientes con IC post-infarto representan casi la mitad de los candidatos para un trasplante cardíaco.³² El grado de muerte de los cardiomiocitos durante la etapa aguda del infarto de miocardio es un determinante crítico de la remodelación ventricular subsiguiente y la eventual insuficiencia cardíaca, pero el complejo proceso de remodelación cardíaca no está determinado únicamente por eso; las respuestas hipertróficas ocurren en los cardiomiocitos en la porción sobreviviente del ventrículo, seguidas de dilatación ventricular debido al reordenamiento arquitectónico de los cardiomiocitos y las células intersticiales que forman el miocardio.³³⁻³⁵ En ese sentido, la fibrosis miocárdica es uno de los cambios estructurales más característicos de los corazones infartados y contribuye a la disfunción tanto sistólica como diastólica.^{36,37}

Varias líneas de evidencia apuntan al papel fundamental que desempeña el TGF- β) durante la progresión de la fibrosis miocárdica: (1) TGF- β 1 induce aumentos tanto en la producción como en la secreción de colágeno, aumenta la abundancia de ARNm de colágeno tipo I y III en fibroblastos cardíacos de rata cultivados, y estimula la expresión de proteínas de matriz extracelular in vivo; (2) la transferencia génica in vivo de TGF- β 1 puede inducir fibrosis miocárdica;³⁸ (3) la expresión de TGF- β está marcadamente aumentada tanto en áreas infartadas como no infartadas de corazones después de MI;^{39,40} y (4) el TGF- β está asociado con la fibrosis mediada por angiotensina II, mientras que la inhibición de la señalización de la angiotensina II mitiga la remodelación cardíaca posterior al IM y mejora la función.^{41,42} En conjunto, estos hallazgos sugieren fuertemente que TGF- β juega un papel fundamental durante el proceso de curación después de un infarto de miocardio y, por lo tanto, afecta la remodelación y función cardíacas durante la etapa crónica.

La enfermedad cardiovascular (ECV), una clase de enfermedades que afectan el corazón o el sistema cardiovascular es responsable del 31 % de todas las muertes y sigue siendo la principal causa de mortalidad en todo el mundo.⁴³ La cardiopatía isquémica y la fibrosis endomiocárdica son las principales causas de insuficiencia cardíaca terminal. En 2012, 1 de cada 9 muertes en los EE. UU. se debió a insuficiencia cardíaca. Según la Asociación Estadounidense del Corazón, los costos anuales estimados para ECV y accidentes cerebrovasculares son de \$316,6 mil millones por año, más que cualquier otro grupo de diagnóstico.⁴⁴ Los costos estimados de las enfermedades cardiovasculares en Europa son de 210.000 millones de euros al año.⁴⁵ Existe una necesidad urgente de desarrollar terapias mejoradas en el área de la enfermedad cardíaca y especialmente en la fibrosis cardíaca.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis de la investigación

Si un vector lentiviral que codifica la proteína recombinante Brecept inyectado en el cuádriceps de ratones produce la proteína, la secreta a la circulación sanguínea y es capaz de llegar al miocardio, como un paso inicial para evaluar su efecto antifibrótico en un modelo de infarto de miocardio.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo General

Evaluar la inyección intramuscular de un vector lentiviral que codifica Brecept y medir su expresión en el cuádriceps y en el suero de ratones sanos.

2.2.2. Objetivos específicos

- a) Puesta a punto de la purificación simultánea de ARNm y proteínas de tejidos provenientes de cuádriceps y ventrículo izquierdo de ratones sanos.
- b) Evaluar la cinética de expresión de Brecept a distintos tiempos post inyección intramuscular del vector lentiviral mediante ELISA (suero), Western Blot y RT-qPCR (cuádriceps y ventrículo izquierdo) para determinar el pico de expresión de Brecept *in vivo*.

3. METODOLOGÍA

3.1. Evaluación inicial de la expresión de Brecept en el plasma, cuádriceps y ventrículo izquierdo de ratones sanos.

Para evaluar si Brecept estaba presente en el plasma, luego del delivery intramuscular del vector lentiviral,- se inyectaron ratones C57BL/6J macho de 10 semanas, con el vector lentiviral Lv.Brecept en el cuádriceps de cada uno de los animales del experimento cumpliendo con el siguiente esquema:

- ✚ Grupo 1: Se inyectó vector lentiviral una sola vez en 20 μ l (concentración del vector 4.1×10^7 Unidades de Transducción o UT) y las muestras se analizaron a los 2, 5 y 7 días post inyección.
- ✚ Grupo 2: Se inyectó vector lentiviral una sola vez en 20 μ l (concentración del vector 4.1×10^7 UT) y las muestras se analizaron a los 10, 15 y 20 días.
- ✚ Grupo 3: Se inyectó vector lentiviral una sola vez en 20 microlitros (concentración del vector $2,7 \times 10^9$ UT) + polybreno (es un polímero catiónico que se usa habitualmente para mejorar la eficiencia de la transferencia de genes mediada por vectores de retrovirus), y las muestras se analizaron a los 10, 15 y 20 días.
- ✚ Grupo 4: Se inyectó vector lentiviral tres veces en 20 microlitros durante 3 días consecutivos en la misma pata (concentración total del vector $2,7 \times 10^9$ UT).

Luego del sacrificio de los animales a distintos tiempos post inyección se obtuvo el plasma y se evaluaron los niveles de Brecept mediante test de ELISA. Para evaluar la presencia del vector lentiviral en el cuádriceps y la expresión de Brecept en el sitio de inyección se midió la presencia del ARNm de Brecept por RT-qPCR y de la proteína Brecept por Western Blot. Además, se evaluó mediante Western Blot si la proteína Brecept circulante por plasma era capaz de localizarse en el ventrículo izquierdo.

3.1.1. Purificación de ARN y Proteínas

Para la obtención simultanea de ARN y proteínas tanto en tejido muscular (cuádriceps) y como en cardíaco de los animales de muestra, se utilizó el kit TransZol (Transgen Biotech) siguiendo las instrucciones del fabricante. TransZol lisa las células con isotiocianato de guanidina. En el proceso de lisis de la muestra, TransZol puede mantener la integridad del ARN. Después de agregar el agente de extracción de ARN, la solución se divide en una fase acuosa incolora y una fase orgánica rosa. El ARN está en la fase acuosa. El ARN se puede

recuperar por precipitación con isopropanol. El alcohol isopropílico recupera la proteína. Se hizo una puesta a punto de esta técnica ya que hubo que combinar dos protocolos diferentes para optimizar la extracción de ambas muestras (RNA y proteínas).

3.1.2. Cuantificación de proteínas con Bradford

El ensayo de Bradford se basa en la unión del colorante Coomassie Blue G250 a la proteína. Estudios detallados indican que el colorante libre puede existir en cuatro formas iónicas diferentes para las cuales los valores de pKa son 1,15, 1,82 y 12,4.⁴⁶ De las tres formas cargadas del tinte que predominan en la solución de reactivo de ensayo ácido, las formas roja y verde más catiónicas tienen máximos de absorbancia a 470 nm y 650 nm, respectivamente. Por el contrario, la forma azul más aniónica del tinte, que se une a la proteína, tiene una absorbancia máxima a 590 nm. Por lo tanto, la cantidad de proteína se puede estimar determinando la cantidad de colorante en la forma iónica azul. Esto generalmente se logra midiendo la absorbancia de la solución a 595 nm.⁴⁷ Se utilizó el SmartSpec™ Plus spectrophotometer de Bio-Rad del CEMET.

3.1.3. Cuantificación de proteínas con BCA

Se utilizó el Kit de ensayo de proteínas BCA Pierce™ (Thermo Scientific™). Es un ensayo de proteínas de dos componentes, de alta precisión y compatible con detergentes ideal para la determinación de la concentración de proteínas. El ensayo de proteínas BCA combina la conocida reducción de Cu²⁺ a Cu¹⁺ por proteína en un medio alcalino con la detección colorimétrica altamente sensible y selectiva del catión cuproso (Cu¹⁺) por ácido bicinconínico (BCA).

El primer paso es la quelación del cobre con proteína en un entorno alcalino para formar un complejo de color azul claro. En esta reacción, conocida como la reacción de Biuret, péptidos que contienen tres o más residuos aminoácidos forman un complejo de quelato de colores con iones cúpricos en un entorno alcalino que contiene tartrato de sodio y potasio.

En el segundo paso de la reacción de desarrollo de color, BCA reacciona con el catión reducido (cuproso) que se formó en el primer paso. El producto de la reacción con un intenso color púrpura es el resultado de la quelación de dos moléculas de BCA con un ion cuproso. El complejo de cobre-BCA es soluble en agua y presenta una fuerte absorbancia lineal a 562 nm con un aumento de la concentración de proteínas. El complejo es aproximadamente 100

veces más sensible (límite de detección inferior) que el color azul claro de la primera reacción.⁴⁸

3.1.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blots

Las proteínas provenientes tanto de tejido muscular como cardíaco se separaron en geles de poliacrilamida al 12% con SDS (SDS-PAGE). En primer lugar, se agregaron a las muestras *buffer* de siembra para proteínas 5 X con agente reductor y se calentaron 5 minutos a 95°C. Como control positivo se sembró la proteína recombinante de fusión Brecept. Adicionalmente, se sembró el marcador de pesos moleculares de proteínas pre-teñido PageRuler™ (Thermo Scientific), para poder estimar los pesos de las proteínas separadas. Las electroforesis se llevaron a cabo en *buffer* SDS-PAGE 1X a 60 mA, hasta que el frente de corrida llegaba al final del gel.

Las muestras separadas en SDS-PAGE, fueron transferidas durante 1 hora, a 350 mA con hielo, a membranas de PVDF (Thermo Scientific, IL, USA) en presencia de un *buffer* de transferencia. Luego se incubaron durante 1 hora con agitación en solución de bloqueo, seguido de tres lavados de 10 minutos cada uno, con PBS tween. Las membranas se incubaron con el anticuerpo monoclonal primario anti-TβRII-SE durante 16 horas a 4°C. Se usó como control de carga a la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Como anticuerpo secundario se empleó el anticuerpo α-IgG de ratón conjugado con HRP. La incubación con el mismo se realizaba durante 1 hora a 25°C en agitación, realizando posteriormente, tres lavados de 10 minutos cada uno, esto se hizo antes y después de la misma.

La detección de proteínas se realizó con el kit comercial Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Life Sciences, UK) o UltraScience Pico Plus Western Substrate (BioHelix, Taiwan) siguiendo las indicaciones de los respectivos fabricantes.

El proceso de revelado del Western blot se realizó con un kit llamado EasySee®, utilizado según protocolo. Éste consta de tres reactivos, el reactivo A, el B y el C, se combinan en una cierta proporción para permitir la visualización de las muestras transferidas a la membrana de nitrocelulosa, a través de la quimioluminiscencia, el equipo de revelado utilizado fue el del CEMET, llamado Las 500 Images®. Y de este modo evaluar la presencia o ausencia de proteínas en el tejido estudiado, para el día evaluado.

4. DESARROLLO

El desarrollo del trabajo se realizó en base a cuatro grupos de muestras que fueron obtenidas en diferentes tiempos del ensayo. Cada una de ellas presenta diferentes características en cuanto a la dosis del vector y la cantidad de inyecciones dadas al animal. Eso se fue modificando en base a los resultados que se iban obteniendo en los ensayos.

Los médicos cardiólogos que forman parte de esta investigación se encargaron de inyectar el vector lentiviral en el cuádriceps de los ratones experimentales, el cual fue enviado por nuestro laboratorio. Un vector lentiviral es un tipo de vector utilizado en terapia génica para entregar el material genético a células de animales. Los lentivirus son un subtipo de virus que pueden integrarse al DNA de la célula huésped y replicarse junto con él; le permite así que el material genético terapéutico se transmita a las células hijas durante la división celular. Por lo tanto, los vectores lentivirales se utilizan para transportar genes terapéuticos a células objetivo de manera eficiente y estable. A estos vectores se les inserta el material genético deseado como un gen terapéutico, y se los utiliza para transportarlos a las células objetivo. Para este trabajo el vector se realizó de la siguiente manera: el ADNc que codifica T β RII-SE con IgG1 Fc se clonó en el vector lentiviral pRRLsin18.cPPT. WPRE, generando el vector pRRLsin18.cPPT.CMV-coT β RII-SE/Fc.ires.eGFP.WPRE (Lv.Brecept). Se generaron así, lentivirus pseudotipados con proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) por transfección transitoria de los vectores de transferencia junto con el plásmido de la cubierta (pCMV-VSVG), el plásmido de empaquetamiento (pMDLg/pRRE) y el plásmido Rev (pRSV-REV), en la línea celular 293T, como se describirá en el *Anexo*.⁴⁰ Los sobrenadantes celulares se recogieron una vez cada 12 h, durante 48 h, y se congelaron en alícuotas. Los títulos virales se determinaron mediante la transducción de células A549, dando 107 TU (unidades de transducción) por mililitro.

Pasado el tiempo de ensayo correspondiente en cada grupo de ratones, se procedió con el sacrificio de estos, luego se continuó con la disección y extracción de los tejidos, -el músculo de la pata que recibió directamente la inyección y del músculo cardíaco, el ventrículo izquierdo-, los mismos fueron mantenidos a -80°C hasta el momento de ser procesados.

Por otro lado, en el laboratorio, una vez organizadas las muestras y reservadas en el freezer a -80°C, se procedió con el análisis de cada una de ellas, a medida que llegaban al laboratorio los grupos de muestras. La serie de estudios a realizar comenzó en una primera instancia con

la puesta a punto de las técnicas, para lo cual se utilizaron muestras del grupo 1. El primer paso para llevar a cabo la investigación de campo constó en la extracción del material genético en conjunto con las proteínas, para ello se utilizó una fusión de dos protocolos para el Kit Tranzol y realizar así ambas extracciones en un mismo día de trabajo. Como el protocolo llevaba 8 hs de trabajo continuo, las extracciones obtenidas se reservaban en el freezer a -80°C las correspondientes al RNA, y a -20°C las de proteínas. En un segundo paso se debía cuantificar ambos materiales, para ello se utilizaron dos mecanismos diferentes: en el caso del RNA se utilizó RT- qPCR y para las proteínas, la técnica de Bradford para los primeros grupos de estudio y luego la técnica de BCA. Una vez obtenidos los datos de la cuantificación de las proteínas se hicieron los cálculos pertinentes para obtener la concentración de proteínas totales que tenía cada muestra y poder así, continuar con el análisis a través de la técnica de Western blot y del revelado de las membranas por quimioluminiscencia en un equipo de revelado.

En cada una de las secciones siguientes se desarrollan y presentan los resultados de cada etapa, se anexan además resultados y metodologías que se utilizaron como complemento para la realización del trabajo y como ayuda para la toma de algunas decisiones en base a esos resultados.

5. RESULTADOS DE CUANTIFICACIÓN

A continuación, se presentan los resultados obtenidos a partir de los ensayos realizados, complementados por los resultados de otros procedimientos esenciales para el desarrollo del estudio. Los detalles completos de los grupos de muestras, su cantidad, el tiempo de ensayo y la distribución de estas por tejido se exponen en la *Tabla 1*.

Tabla 1 Muestras totales obtenidas

Se muestra el n° del grupo de muestra, la cantidad de muestras totales que llegaron para cada uno, el tiempo de ensayo y la cantidad de muestras para cada tipo de tejido.

Grupo de muestras	Cantidad de muestras (totales)	Días de ensayo	Cantidad de muestras por día de ensayo
1	30	2,5,7	5 mp y 5 vi
2	18	10, 15, 20	3 mp y 3 vi
3	30	10, 15, 20	5 mp y 5 vi
4	10	10	5 mp y 5 vi

5.1. Muestras correspondientes a cada grupo de ensayo

A continuación, se presentan las tablas que detallan la disposición de los animales por grupos y los tipos de tejidos empleados en el estudio. En la primera columna se indica el día de ensayo en que se extrajo RNA y proteínas con el uso de Tranzol®. El protocolo se adaptó para permitir la extracción simultánea de ambas moléculas. En la segunda columna se indica el número del animal utilizado y en la tercera columna se especifica la masa de tejido empleada. En un primer momento, se respetó el rango de masa recomendado por el protocolo, que era de 50 a 100 mg, para ello, se efectuaron cortes en los tejidos con bisturí y se procuró dividirlos en dos partes iguales para poder repetir el ensayo en caso de que surgieran dificultades durante el ajuste de la técnica, se pesaba el tejido, se tomaba nota al respecto para tener una noción de lo utilizado y evaluarlo a medida que se avanzaba con el ensayo.

Tabla 2 Grupo 1: músculo pata

Se seleccionó exclusivamente tejido de músculo de pata para llevar a cabo la extracción de proteínas en cuestión.

Días de ensayo	Animal	Masa del tejido utilizado(mg)
7	4	52

Tabla 3 Grupo 1: músculo cardíaco

En este caso, se utilizó un animal de cada día para la extracción.

Días de ensayo	Animal	Masa del tejido utilizado(mg)
2	2	57,6
5	5	72,3
7	4	75,4

Tabla 4 Grupo 2: músculo pata

Uso de tejido únicamente de músculo de pata para la extracción de proteínas

Días de ensayo	Animal	Masa del tejido utilizado(mg)
15	2	87,6

Tabla 5 Grupo 2: músculo cardíaco

Se hizo uso exclusivo de un tejido animal proveniente del músculo cardíaco para la extracción de proteínas.

Días de ensayo	Animal	Masa del tejido utilizado(mg)
15	2	110,8

En la *Tabla 5* correspondiente a una muestra del grupo de animales de la Grupo 2, se realiza el protocolo de extracción por primera vez con una masa superior al rango establecido en el mismo, ya que no se podía volver a cortar el tejido, para no disgregar demasiado la muestra o bien, perder parte de la misma.

Tabla 6 Grupo 3: *músculo pata*

Se optó por el músculo de pata como fuente de extracción de proteínas para todas las muestras en cuestión. En un primer momento, se extrajeron las proteínas utilizando cortes de tejido y, posteriormente, se decidió emplear el tejido completo. El día 10 del estudio marcó un punto de inflexión en este sentido, ya que se abandonó el uso de cortes de tejido y se procedió a la extracción de proteínas a partir del tejido completo.

Días de ensayo	Animal	Masa del tejido utilizado(mg)
10	1	62
10	2	67,2
10	1	30
10	2	70
10	3	200
10	4	240
10	5	270
15	1	98,8
15	1	180
15	2	200
15	3	270
15	4	270
15	5	260
20	2	81,3
20	1	200
20	2	210
20	3	280
20	4	260
20	5	300

Tabla 7 Grupo 3: músculo cardíaco

Se hicieron las extracciones con el músculo completo para todas las muestras.

Días de ensayo	Animal	Masa del tejido utilizado(mg)
10	1	170
10	2	130
10	3	90
10	4	110
10	5	120

Para la realización de la extracción con el tejido completo, se utilizó el mismo protocolo, sólo que se utilizó el equivalente de volumen correspondiente a esa masa pesada, del kit de Tranzol®. Es decir, por ejemplo, en el caso de la Grupo 3 -músculo de pata/día 20-, como se ve en la *Tabla 6*, dónde se había pesado 300 mg de tejido, se usaba el triple del volumen a lo largo de todo el procedimiento para realizar la extracción.

Tabla 8 Grupo 4: músculo pata

Para mejorar la homogeneidad de las muestras, se procedió a realizar extracciones empleando el músculo completo en todos los casos.

Días de ensayo	Animal	Masa del tejido utilizado(mg)
10	1	300
10	2	260
10	3	300
10	4	270
10	5	300

Tabla 9 Grupo 4: músculo cardíaco

Se procedió a realizar la extracción mediante el uso del músculo en su totalidad

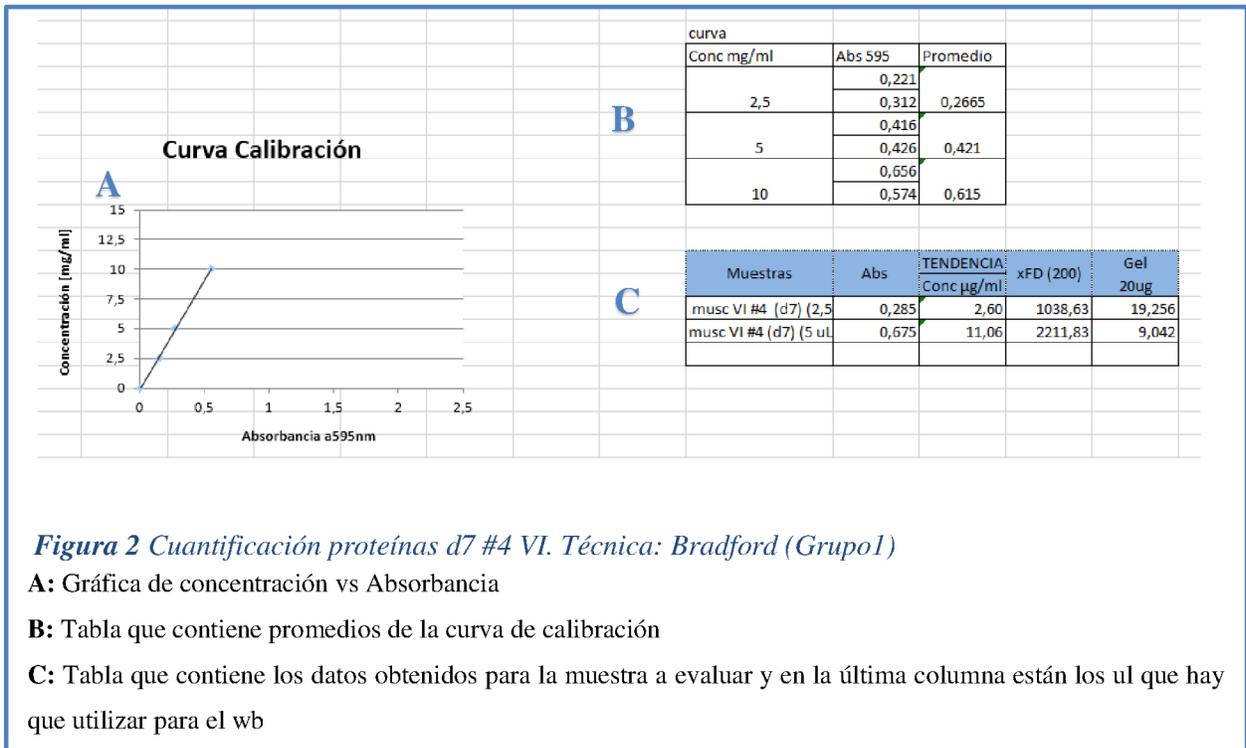
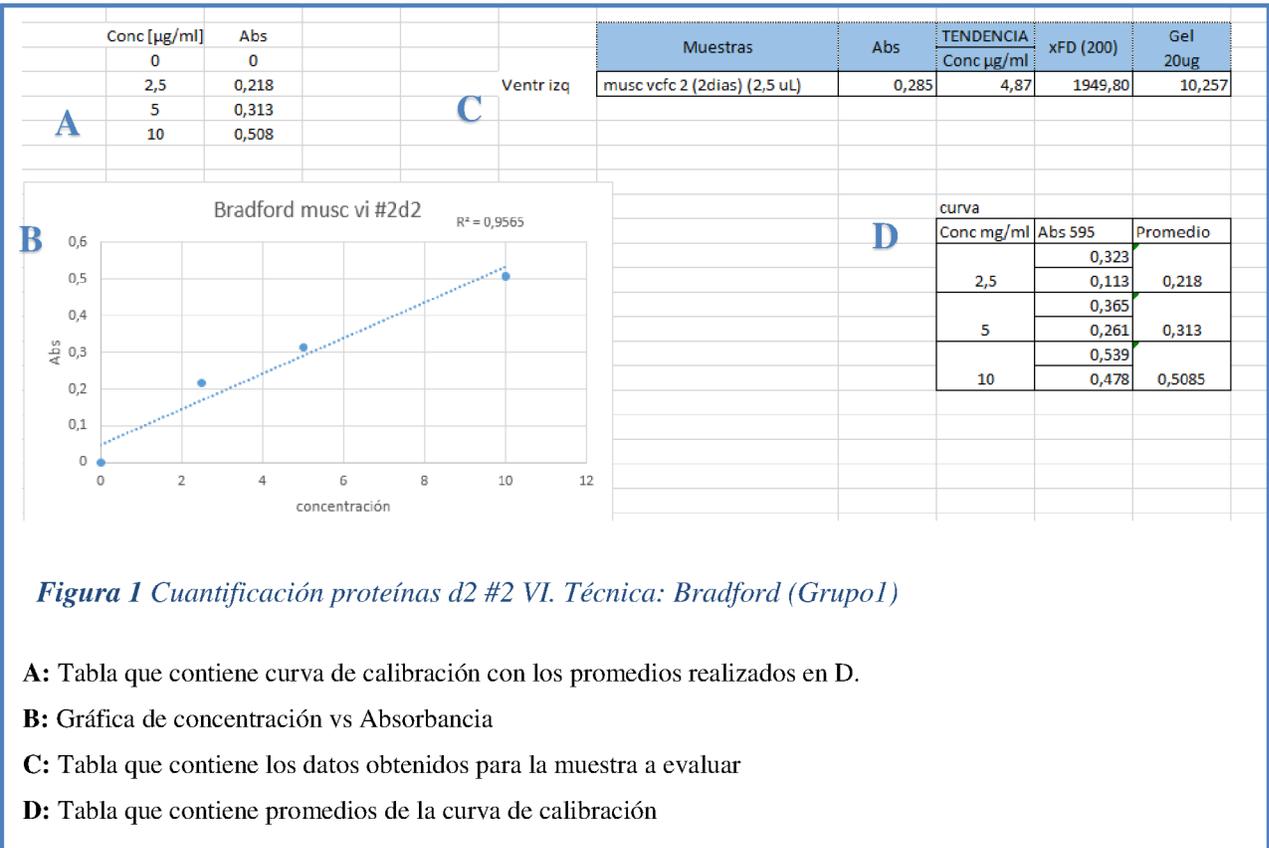
Días de ensayo	Animal	Masa del tejido utilizado(mg)
10	1	120
10	2	110
10	3	130
10	4	140
10	5	170

5.2.Resultados de la cuantificación de proteínas

Como se mencionó previamente, se llevaron a cabo extracciones basadas en diferentes grupos, tejidos y masas pesadas para obtener tanto el ARN como las proteínas totales. Posteriormente, se realizó la cuantificación de π con el objetivo de determinar la cantidad adecuada de muestra para ser sembrada en el gel de poliacrilamida del Western blot, teniendo en cuenta que cada punto de siembra posee una capacidad máxima de 20 μ l para evitar la dispersión a carriles adyacentes. Estas medidas fueron tomadas para garantizar la precisión y la reproducibilidad de los resultados obtenidos en el análisis de proteínas.

En la primera etapa del ensayo, se llevó a cabo la cuantificación utilizando la técnica de Bradford y se empleó el espectrofotómetro SmartSpec™ Plus de Bio-Rad a una longitud de onda de 595 nm, siguiendo el protocolo establecido. Los resultados obtenidos se detallan a lo largo de esta sección. Para aplicar esta técnica, se realizó una curva estándar utilizando concentraciones de 2,5, 5 y 10 mg/ml, midiendo la absorbancia de cada una de ellas antes de proceder a la medición de la muestra en cuestión. Posteriormente, se extrapolaron los valores obtenidos a partir de la gráfica de concentración versus absorbancia, tal como se muestra en la *Figura 1*. Se multiplicó por el factor de dilución y por último para trabajar siempre con 20 μ g de muestra, y poder comparar los resultados, se dividía 20 por el valor obtenido en la columna anterior y se lo multiplicaba por mil, obteniendo así el valor plasmado en la columna cuyo nombre es μ g.

Se siguió el mismo razonamiento para las siguientes cuantificaciones en las que se utilizaron las técnicas de Bradford.



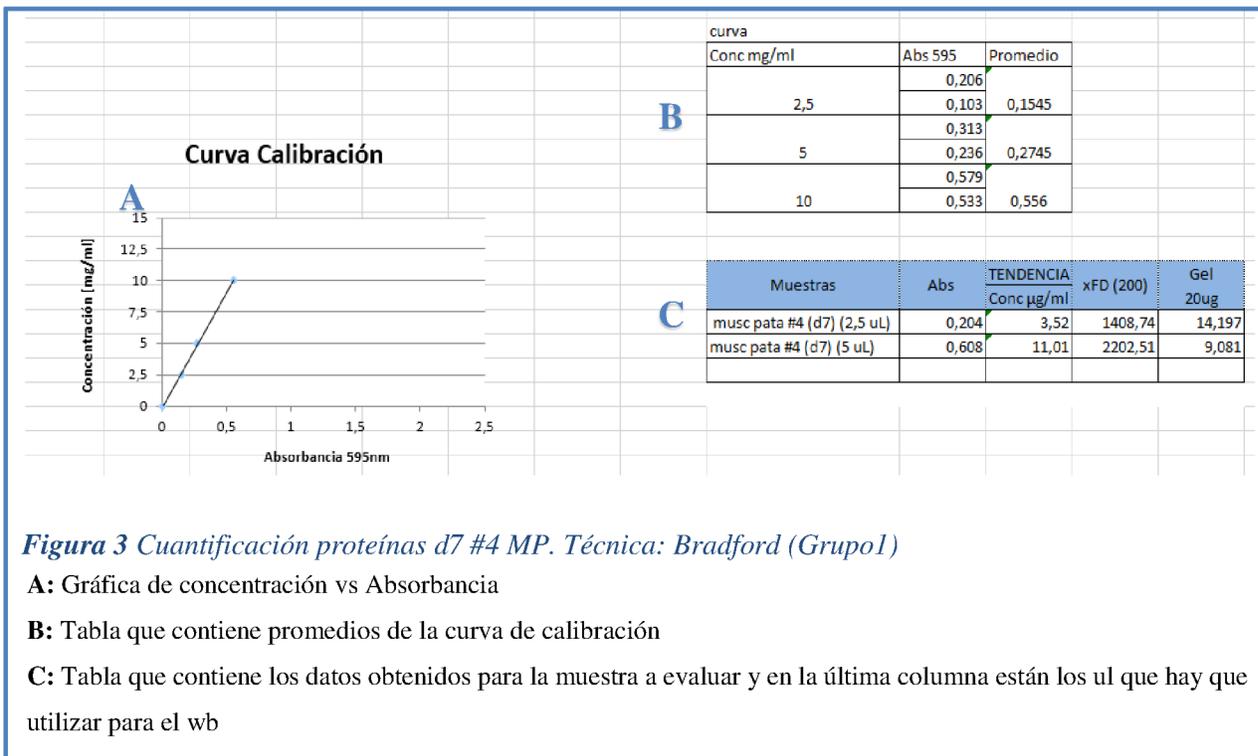


Figura 3 Cuantificación proteínas d7 #4 MP. Técnica: Bradford (Grupo1)

A: Gráfica de concentración vs Absorbancia

B: Tabla que contiene promedios de la curva de calibración

C: Tabla que contiene los datos obtenidos para la muestra a evaluar y en la última columna están los ul que hay que utilizar para el wb

Durante la ejecución de la tesina, se realizaron algunas modificaciones en el protocolo Tranzol®, con el objetivo de mejorar el rendimiento. Durante los dos primeros grupos de trabajo, se llevaron a cabo modificaciones en diferentes etapas del protocolo, como se detalla en cada sección correspondiente.

En una instancia posterior, se modificó el método utilizado para la cuantificación de proteínas debido a un cambio en la parte final de la extracción. El uso de SDS al 1% fue reemplazado por una combinación de SDS al 2% con urea 8M, y esta última interfería con el método de Bradford. En consecuencia, se adoptó la técnica de BCA para las muestras posteriores, en la cual no se presentaban interferencias por el uso de la urea. El primer grupo de estudio fue destinada a optimizar las técnicas a emplear en el resto del trabajo.

		ug BSA	OD1	OD2	promedio	OD prom-bco				
A		0	0,094	0,099	0,0965	0				
		2	0,196	0,206	0,201	0,1045				
		4	0,276	0,291	0,2835	0,187				
		6	0,334	0,358	0,346	0,2495				
		8	0,399	0,429	0,414	0,3175				
		10	0,471	0,503	0,487	0,3905				
		12	0,548	0,599	0,5735	0,477				
	14	0,635	0,654	0,6445	0,548					
					promedio	OD prom-t	ug en dil	ug sol orig	conc (mg/l)	20ug
B	Animal 2 día 15 (VCFC)	MP (1:5)	0,902	0,923	0,9125	0,816	20,50251	102,5126	4,100503	4,877451
		MP (1:10)	0,605	0,58	0,5925	0,3915	9,836683	98,36683	3,934673	5,083014
		VI (1:5)	0,353	0,372	0,3625	0,079	1,984925	9,924623	0,396985	50,37975
		VI (1:10)	0,254	0,267	0,2605	-0,0855	-2,14824			

Figura 4 Cuantificación proteínas dI5 #2 VI y MP. Técnica BCA (Grupo2)

Hay una primera tabla superior A que muestra los mg de BSA que van de 0 a 14 para armar la curva de calibración. Para ello se realizó con dos longitudes de onda diferentes (562nm, 650nm) para eliminar las posibles interferencias, luego se calcula el promedio entre ambas. En la última columna se realizó la diferencia entre desvío promedio y el blanco para todos los puntos de la curva. En la tabla inferior B, en la primera columna está detallado el animal y el día utilizado, siguiendo del tipo de tejido y la dilución utilizada; todo para calcular en una primera instancia, la concentración (mg/ml) de la muestra problema y en la última columna los 20 ug de muestra, para lo cual se fracciona 20 en la concentración obtenida de cada muestra y se obtiene de este modo, cuantos ml tengo que usar de cada muestra, para tener 20 ug.

En la *Figura 5*, es todo muy similar a lo antes mencionado, únicamente que para el grupo 3 de estudio, se procedió con 40ug de muestra ya que no se estaba obteniendo el resultado esperado en los anteriores WB realizados, con lo cual se decidió hacer esa modificación a partir de este grupo de ensayo, para aumentar la probabilidad de tener una mejor visualización de los resultados posteriores.

ug BSA	OD1	OD2	promedio	OD prom-bco				OD - blanco	ug en dil	ug sol orig	conc (mg/ml)	40			
0	0,121	0,117	0,119	0			0,144	0,149	0,1465	0,0275	0,98566308	9,85663082	0,39426523	101,454545	#1d20 mp t3
2	0,161	0,171	0,166	0,047			0,13	0,128	0,129	0,01	0,35842293	3,58422939	0,14336917	279	#2d20 mp t3
4	0,189	0,201	0,195	0,076			0,13	0,126	0,128	0,009	0,32258064	3,22580645	0,12903225	310	#3d20 mp t3
6	0,216	0,229	0,2225	0,1035			0,125	0,124	0,1245	0,0055	0,19713261	1,97132616	0,07885304	507,272727	#4d20 mp t3
8	0,255	0,256	0,2555	0,1365			0,165	0,171	0,168	0,049	1,75627240	17,5627240	0,70250896	56,9387755	#5d20 mp t3
10	0,264	0,272	0,268	0,149			0,243	0,227	0,235	0,116	4,15770609	41,5770609	1,66308243	24,0517241	#1d10 mp t4
12	0,53	0,546	0,538	0,419			0,315	0,319	0,317	0,198	7,09677419	70,9677419	2,83870967	14,0909090	#2d10 mp t4
14	0,628	0,61	0,619	0,5			0,284	0,285	0,2845	0,1655	5,93189964	59,3189964	2,37275965	16,8590060	#3d10 mp t4
							0,277	0,287	0,282	0,163	5,84229390	58,4229390	2,33691756	17,1165644	#4d10 mp t4
							0,172	0,175	0,1735	0,0545	1,95340501	19,5340501	0,78136200	51,1926605	#1d10 vi t4
							0,118	0,127	0,1225	0,0035	0,12544802	1,25448028	0,05017921	797,142857	#2d10 vi t4
							0,31	0,284	0,297	0,178	6,37992831	63,7992831	2,55197132	15,6741573	#3d10 vi t4
							0,121	0,13	0,1255	0,0065	0,23297491	2,32974910	0,09318996	429,230769	#4d10 vi t4
							0,134	0,14	0,137	0,018	0,64516129	6,45161290	0,25808451	155	#5d10 vi t4
							0,128	0,128	0,128	0,009	0,32258064	3,22580645	0,12903225	310	
							0,222	0,236	0,229	0,11	3,94265233	39,4265233	1,57706093	25,3636363	#1d10 vi t3
							0,197	0,211	0,204	0,085	3,04669498	30,4669498	1,21863799	32,8235294	#2d10 vi t3
							0,223	0,235	0,229	0,11	3,94265233	39,4265233	1,57706093	25,3636363	#3d10 vi t3
							0,206	0,216	0,211	0,092	3,29749103	32,9749103	1,31899641	30,3260869	#4d10 vi t3
							0,252	0,27	0,261	0,142	5,08960573	50,8960573	2,03584229	19,6478673	#5d10 vi t3

Figura 7 Cuantificación proteínas d10 animales #1 a #5 VI (Grupo3), d20 animales #1 a #5 MP (Grupo3), d10 animales #1a #5 VI y MP (Grupo4). Técnica BCA

La tabla A y B dentro de la Figura respetan el mismo sentido antes mencionado, la diferencia radica en las muestras que se cuantificaron.

6. RESULTADOS DEL WESTERN BLOT

Una vez obtenidas las cuantificaciones, se procedió con el Western blot (WB), cuyos resultados se muestran debajo. Se realizó el procedimiento siguiendo el protocolo mencionado en el apartado *Metodología* subsección 3.2.4 *Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot*.

Para realizar este procedimiento se utilizaron dos geles de poliacrilamida, uno con GADPH como control de carga y el otro con un anticuerpo monoclonal (Ac Mo) específico Anti-Mouse IgG HRP (anticuerpo específico para detectar la proteína de interés).

Ambos geles se sembraron, de izquierda a derecha de la siguiente manera, primero un marcador de peso molecular como referencia para comparar los resultados de las muestras, la siguiente calle contenía la muestra reducida gracias a una combinación de beta-mercaptoetanol y loading; y otra calle que incluía la muestra no reducida, sólo con loading. En el caso del gel en donde se usaba el Ac Mo se hacía un control extra con Brecept también oxidado y reducido; para comparar las bandas que tendríamos que ver provenientes de las muestras respecto de las del Brecept, que es la proteína que estamos esperando encontrar.

Las bandas correspondientes a Brecept tienen diferentes pesos moleculares: para el caso de reducido es entre los 40 y 55 kDa y el no reducido involucra dos bandas, una entre los 35 y 40 kDa y la otra entre los 40 y 55 kDa.

6.1. Grupo 1 WB

Tabla 10 Muestras WB: Grupo 1

Se detallan las muestras que fueron procesadas en el WB.

Día de ensayo	Animal	Tejido
2	2	VI
7	4	MP
7	4	VI

El tiempo de revelado no es siempre el mismo, ni en el mismo ensayo, para las dos membranas incluso, es diferente. Para llegar a hacer esta presentación de los resultados, se tuvo que ir probando el período de exposición a diferentes tiempos, y fueron mostrados aquellos resultados en dónde estaba más visible el bandeo, en el caso de que lo hubiera.

Para analizar adecuadamente las membranas de cada WB se debieron contemplar varias situaciones, entre ellas, que fuese visible el patrón de peso molecular en ambas membranas; en el caso de la membrana de GAPDH, se debían ver bandeos de proteínas totales, para ver que habían sido correctamente cargadas las muestras. En base a ese resultado, se podía contemplar el análisis de la membrana de AcMo. En ella se debían visualizar las bandas

correspondientes a Brecept que era lo que se estaba buscando encontrar en las muestras de los ratones. En caso de no ser visibles, no se podía creer en el resultado del bandeo de muestras, pero si se lo tenía en cuenta para un posterior ensayo al resultado obtenido. Caso contrario, siendo visibles las bandas de

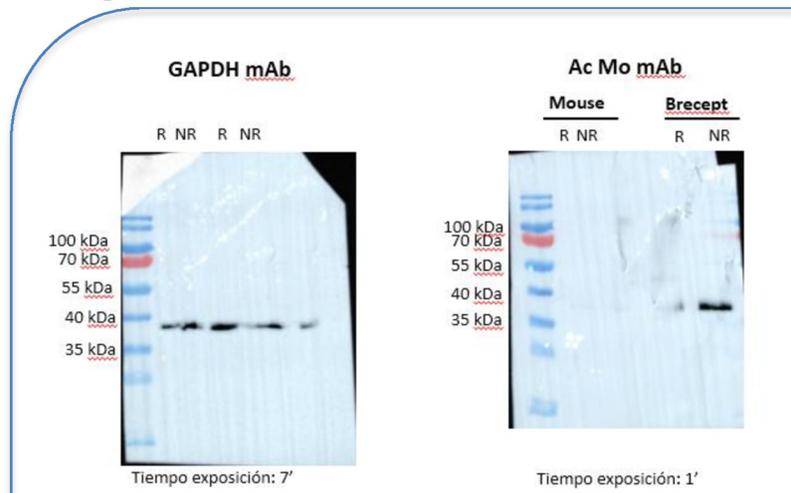


Figura 8 Día 2 #2 VI (Grupo 1)

Se ven los resultados del bandeo para cada uno de los geles y el tiempo de exposición hace referencia al tiempo en que fue expuesta la membrana a la quimioluminiscencia, en el equipo de revelado.

Brecept, se podían analizar de este modo, de forma correcta las muestras de ese ensayo.

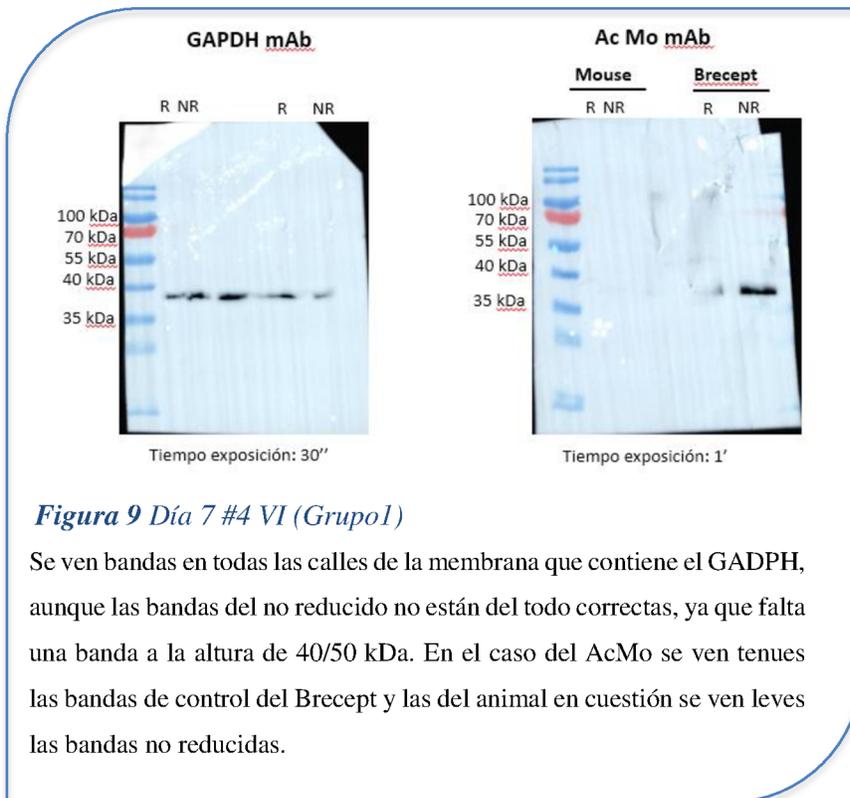


Figura 9 Día 7 #4 VI (Grupo1)

Se ven bandas en todas las calles de la membrana que contiene el GAPDH, aunque las bandas del no reducido no están del todo correctas, ya que falta una banda a la altura de 40/50 kDa. En el caso del AcMo se ven tenues las bandas de control del Brecept y las del animal en cuestión se ven leves las bandas no reducidas.

Dicho análisis mencionado, se debió realizar en cada uno de los WB. Se debía tener en cuenta además cuando se descongelaba la alícuota del GAPDH y del AcMo de no tenerlo en heladera por más de tres semanas, ya que ese fue el causante de generar repeticiones de ensayos, debido a que la actividad de los mismos va decayendo con el paso de los días. Otra cuestión a tener en cuenta era el uso de los buffers de transferencia y de lavado, los cuales eran rotulados con la fecha de preparación y asimismo se lo colocaba una marca para saber cuántos usos tenía el mismo, porque sólo se los usaban cuatro veces, se descartaban y se preparaban de nuevo. Con respecto al buffer de lavado, se utilizó PBS tween, el cual no duraba más de dos o tres procedimientos, con lo que no generaba mayores problemas, se lo preparaba de nuevo.

De no tenerse en cuenta todos estos detalles, hubiese habido más inconvenientes en los ensayos, pérdidas de muestras y aumento de gastos de recursos económicos y de reactivos en forma innecesaria al laboratorio.

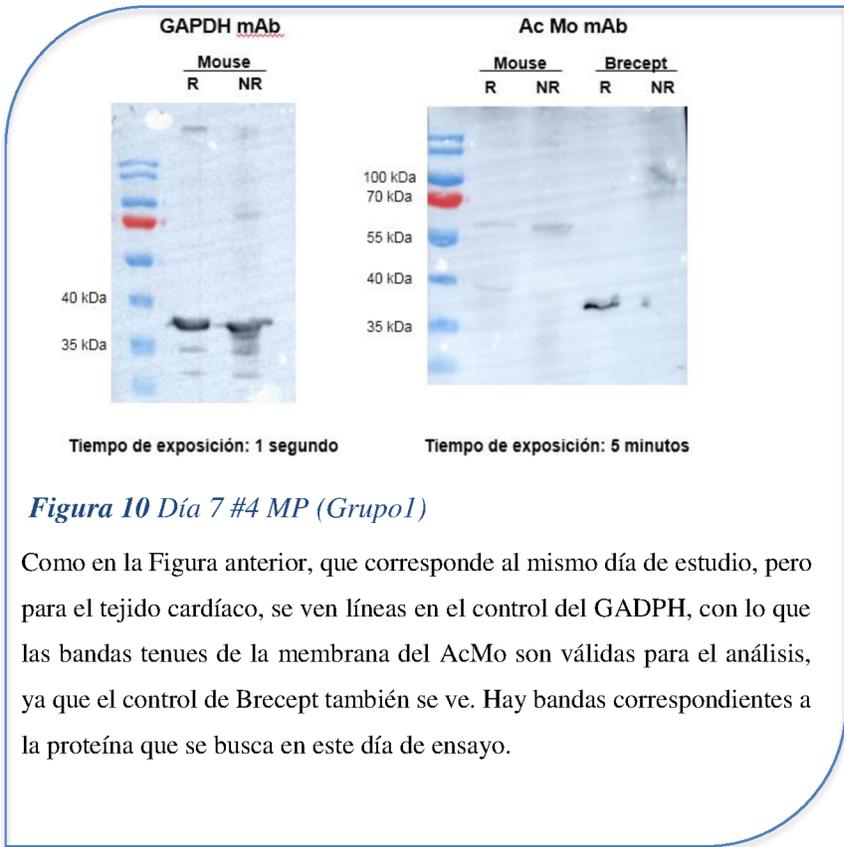


Figura 10 Día 7 #4 MP (Grupo1)

Como en la Figura anterior, que corresponde al mismo día de estudio, pero para el tejido cardíaco, se ven líneas en el control del GAPDH, con lo que las bandas tenues de la membrana del AcMo son válidas para el análisis, ya que el control de Brecept también se ve. Hay bandas correspondientes a la proteína que se busca en este día de ensayo.

El grupo 1 sirvió para optimizar y poner a punto los métodos, como ya se mencionó anteriormente. Sirvió para evaluar cuestiones que iban surgiendo al realizar los ensayos, que fueron encaminando el curso del trabajo. Esas incógnitas, dudas que surgían, sirvieron para mejorar en los próximos grupos de muestras.

6.2. Grupo 2 WB

Cómo puede verse en la *Tabla 11* sólo se utilizó el día 15 de ensayo, porque en simultáneo se realizó el cultivo celular, de células transfectables 293T, desarrollado el método en el apartado *Anexo, (9.2.1: Recuento celular)* y la posterior transfección, también explicada dentro del *Anexo, (9.2.2: Transfección)*, en dónde se buscó mejorar el título del vector lentiviral que iba a ser inyectado en los nuevos animales de estudio.

Tabla 11 Muestras WB: Grupo 2

Muestra el animal utilizado y el tejido.

Día de ensayo	Animal	Tejido
15	2	VI
15	2	MP

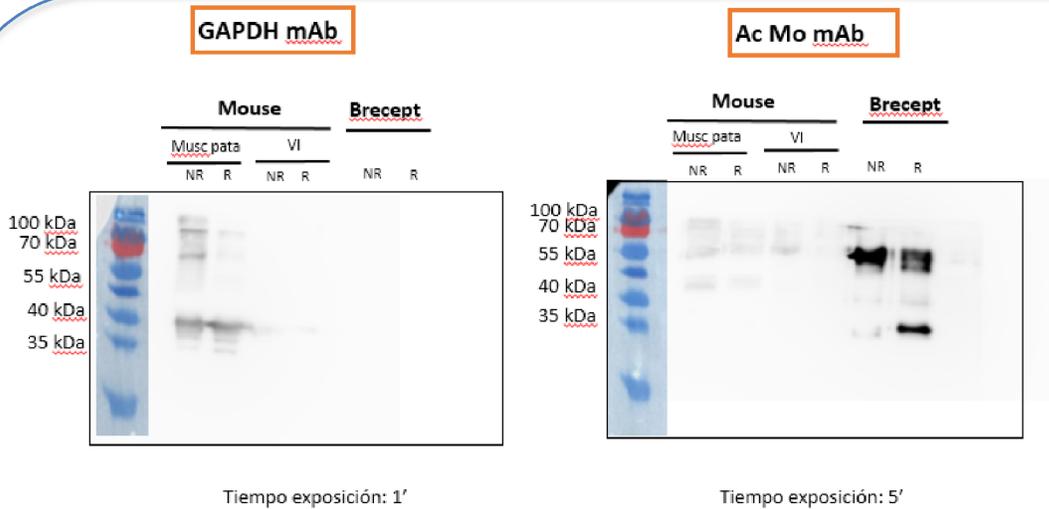


Figura 11 Día 15 #2 VI y MP (Grupo2)

Se presentan los resultados para el animal 2 del día 15, para ambos tejidos. En dónde se puede decir que dicho animal pudo generar la proteína Brecept en el tejido de la pata, ya que se visualizan bandas acordes a las del Brecept. Además, ambos controles dieron correctos (el GAPDH y el Brecept).

6.3. Grupo 3 WB

Tabla 12 Muestras WB: Grupo 3

Se detallan las muestras utilizadas del grupo 3 y el tejido utilizado. A continuación, se exponen los resultados de los WB correspondientes.

Día de ensayo	Animal	Tejido
10	1 y 2	MP
15	1	MP
20	1	MP
10	3 y 4	MP
15	2	MP
10	1, 2, 3, 4, 5	MP
15	1, 2, 3, 4, 5	MP
10 (repetición)	1, 2, 3, 4, 5	MP
20	1, 2 y 3	MP
20	3, 4	MP

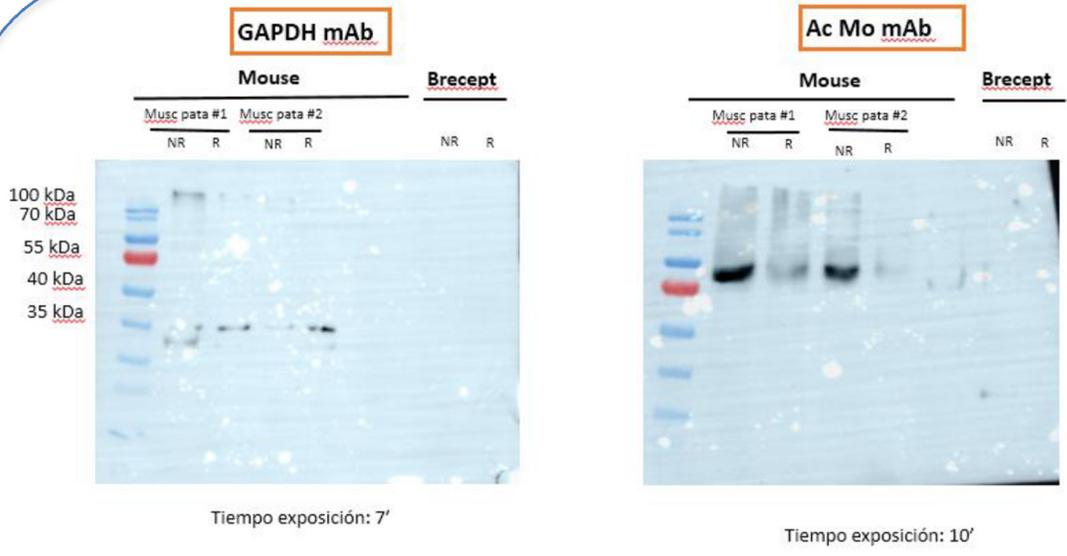


Figura 12 Día 10 #1 y #2 MP

Se ven bandas intensas en el día 10 de estudio, para los animales #1 y #2. En este caso se utilizaron cortes del tejido del músculo de la pata, es decir, no se utilizó el tejido completo como si se hizo más adelante. El control de carga, del GAPDH dio con bandas visibles, pero el Brecept no se visualiza, con lo que se tuvo que repetir el ensayo.

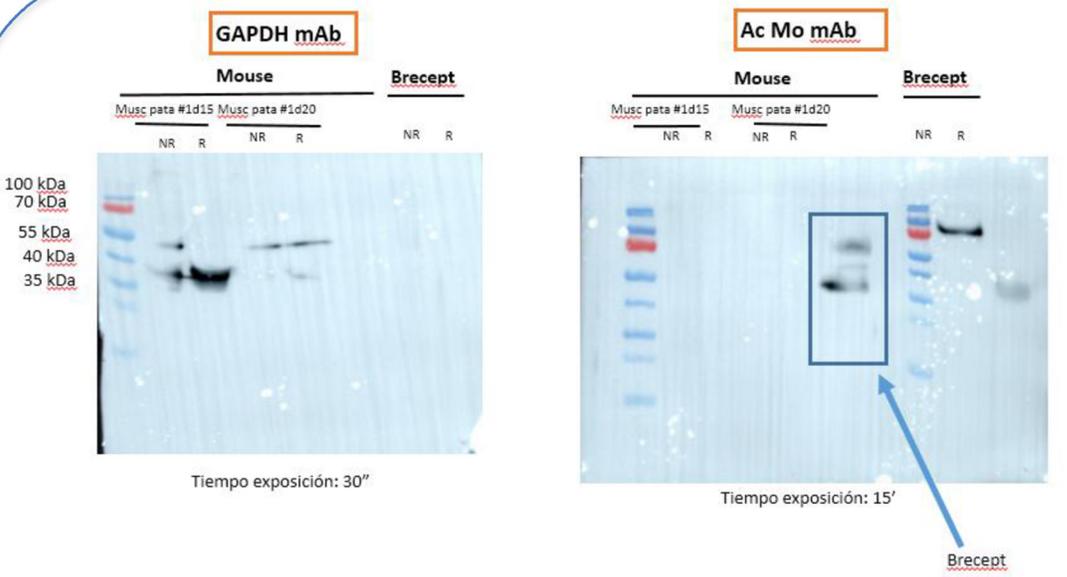


Figura 13 Día 15 #1 y día 20 #1 MP

Se muestran los resultados del WB correspondiente al #1 tanto del día 15 como del 20, en la membrana del AcMo se señala con una flecha el Brecept casi en el medio de la placa ya que hubo que hacer un injerto de dos geles por un error de procesamiento inicial. En este caso, si bien se ven las bandas de ambos controles, no hay bandas en los días de estudio empleados.

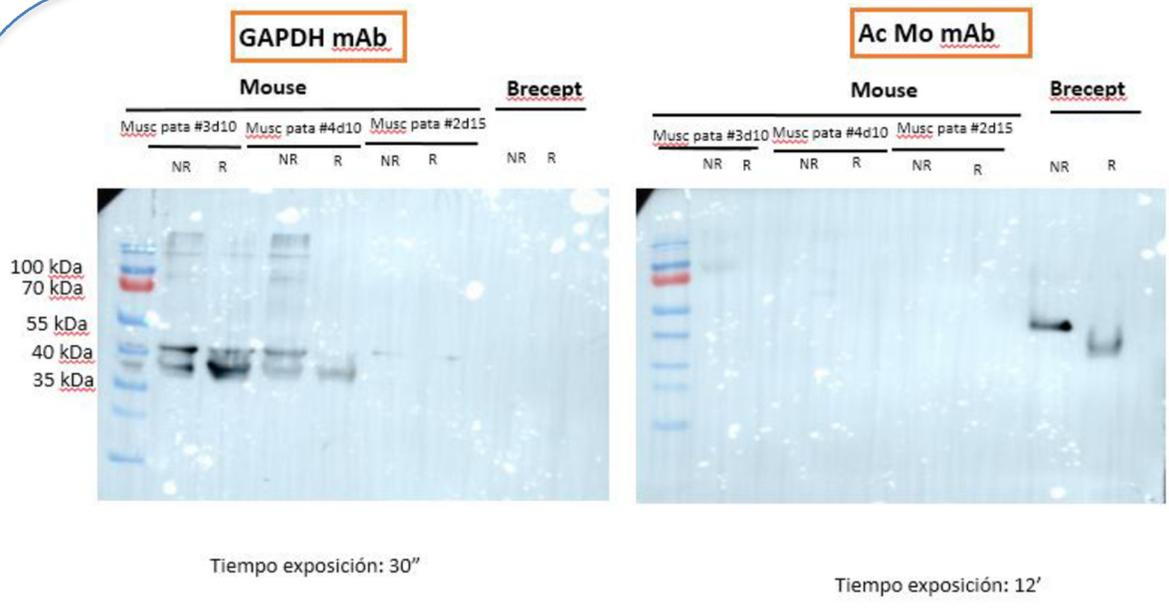


Figura 14 Día 10 #3 y #4 MP y día 15 #2 MP

Se puede observar un buen control de carga de muestras en la membrana del GAPDH, pero no así en la del AcMo, ya que no se visualiza la proteína que se está buscando para esos animales y días de estudio. El control de Brecept dio correcto.

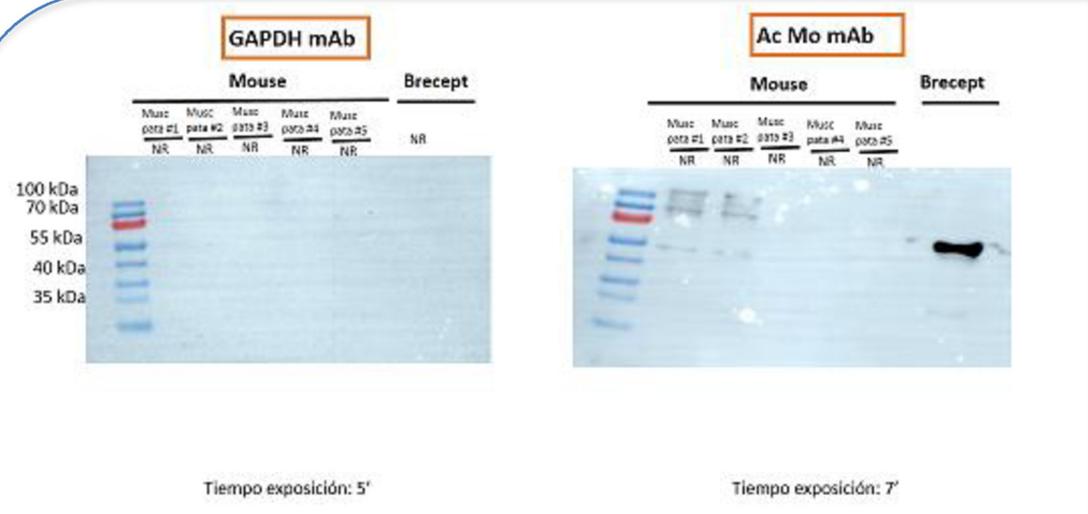


Figura 15 Día 10 animales #1, #2, #3, #4 y #5 (Grupo 3)

Analizando este caso, el control de carga dio negativo, entonces el resultado que se obtuvo en la membrana de AcMo, aun obteniéndose correctamente el Brecept, y bandas en algunos animales, no se puede tener en cuenta este resultado para seguir el ensayo, con lo cual se debió repetir el mismo.

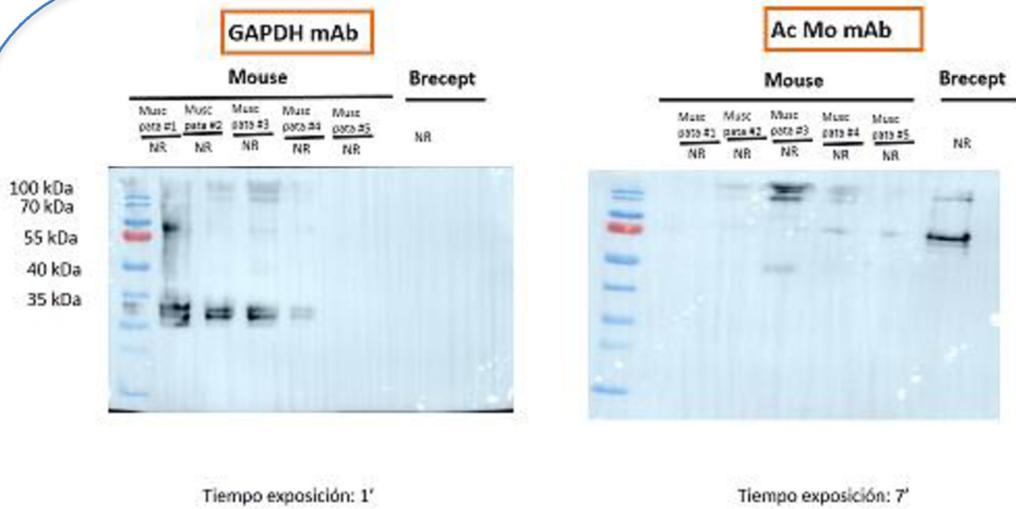


Figura 16 Día 15 animales #1, #2, #3, #4 y #5 (Grupo 3)

En este ensayo hay un buen control de carga por parte del GAPDH, dando bandas en la mayor parte de los animales, al igual que el Brecept en la membrana del AcMo. Con lo cual las bandas que se obtuvieron en los animales 2, 3, 4 y 5 son válidas. Brindan información importante para continuar el ensayo.

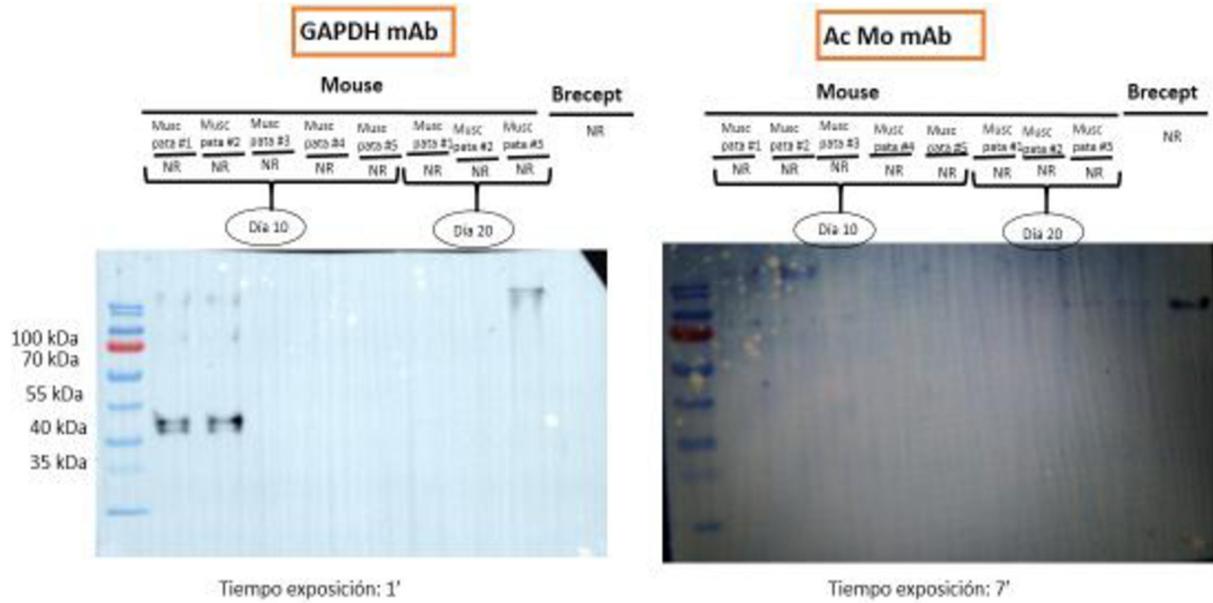


Figura 17 Día 10 animales #1, #2, #3, #4 y #5 (repetición del ensayo) y día 20 animales #1, #2 y #3 (Grupo 3)

Se hizo una repetición para todos los animales del día 10 provenientes del Grupo 3, debido a que cuando se efectuó por primera vez no hubo señal en el GAPDH con lo que los resultados de la membrana con el AcMo no eran confiables, ya que la membrana del GAPDH es un control de carga que se debe tener en cuenta para hacer la comparativa entre las membranas. Entonces lo que se hizo fue sacar una nueva alícuota de GAPDH del freezer para realizar este ensayo. Se ven algunas bandas en el día 10 de estudio, para los animales 1 y 2, como el control de Brecept está correcto, se tienen en cuenta estos animales para continuar con el estudio.

6.4. Grupo 4 WB

Tabla 13 Muestras WB: Grupo 4

Día de ensayo	Animal	Tejido
10	1,2,3,4,5	MP

7. CONCLUSIONES

Este proyecto representa una iniciativa ambiciosa y multidisciplinaria que involucra a un equipo de expertos de diversas áreas, el cual tiene como objetivo el desarrollo de un nuevo fármaco capaz de prevenir la formación de fibrosis en el tejido cardíaco. Este logro no solo supondrá una revolución en el campo de la farmacología, sino que también contribuirá a evitar las complicaciones post-infarto y, en muchos casos, la muerte.

Al haber leído trabajos de investigación, tesis, artículos de revistas de investigación se puede concluir que como la fibrosis cardíaca es uno de los principales problemas en pacientes que han sufrido un infarto de miocardio, y actualmente no hay tratamientos efectivos disponibles para prevenir su desarrollo, el estudio de investigación realizado en el laboratorio, enfocado en el desarrollo de un nuevo biofármaco para evitar la fibrosis cardíaca, es de gran relevancia ya que podría representar una nueva opción terapéutica para pacientes con enfermedades cardiovasculares. Como se mencionó anteriormente, la enfermedad cardiovascular es la principal causa de mortalidad en todo el mundo, por lo que la importancia de desarrollar terapias mejoradas en este campo es evidente. A través de la investigación de nuevos tratamientos, como este biofármaco que tiene como diana el TGF- β , una citoquina encargada de la acumulación de la matriz extracelular y de inducir el proceso fibrótico en el tejido cardíaco. Se logró poder modular esta diana *in vivo* al haber creado un vector lentiviral específico para la proteína recombinante T β RII-SE que se une a las tres isoformas de TGF- β . T β RII- SE se fusionó con el dominio Fc de la IgG1 humana, Brecept, como se mencionó en la introducción abre la posibilidad de mejorar la calidad de vida de los pacientes con enfermedades cardiovasculares y reducir los costos económicos y de salud asociados con estas enfermedades, ya que está demostrada su capacidad anti- fibrótica en tejido hepático.

Este trabajo tiene dos objetivos específicos, uno de ellos es sobre la evaluación de la cinética del fármaco Brecept a distintos tiempos post inyección intramuscular del vector lentiviral mediante las técnicas realizadas a lo largo de la investigación plasmada en este trabajo de campo cuya finalidad era determinar el máximo de expresión de Brecept *in vivo*, para los tejidos animales tratados en la tesina. Además de mencionar los cambios que se hicieron en los protocolos originales para mejorar los rendimientos, las puestas a punto de las técnicas, se fue evaluando también que días de ensayo eran los más óptimos para indagar y profundizar al respecto. Para ello, se inició con muestras de los días 2, 5 y 7, correspondientes al grupo 1 de muestras. En ellos se obtuvieron señales bajas en el cuádriceps de los ratones, excepto en el

día 7, con lo cual se siguieron evaluando condiciones adicionales que permitieran brindar mejores resultados. Luego se prosiguió con los días 10, 15 y 20, en una primera instancia se hicieron las extracciones con cortes de los tejidos; y en una segunda con los tejidos completos, viendo en este último caso un pico de señal en el día 10, y algo de señal en los otros días. Se repitió este último ensayo aumentando la carga del vector en conjunto con polybreno, y se vio nuevamente un pico en el día 10, aunque mostraban señal algunos animales de los otros dos días. En el último ensayo que abarcó este trabajo, se hizo una inyección durante tres días consecutivos, pero con el mismo título del vector que los animales del grupo 3, aunque esta vez, únicamente para el día 10, dando nuevamente señal intensa en algunos animales. Todo lo mencionado en este párrafo corresponde al músculo de la pata, ya que, al no haber proteína en suero, no se procedió a hacer la investigación sobre el tejido cardíaco. Es decir, que el tejido animal en donde fue aplicado el vector, pudo generar la proteína de interés, pero no así en el músculo cardíaco, ya que en los ensayos de ELISA, no se pudo comprobar presencia de Brecept y, por lo tanto, no se la espera encontrar en el tejido diana que es el tejido cardíaco. Por dicho motivo no se realizaron los WB de todas las muestras de ventrículo hasta no optimizar esa parte del ensayo y verificar que efectivamente Brecept se secrete al plasma y finalmente llegar así al corazón. Para seguir con la investigación y verificar la presencia de la proteína en el ventrículo izquierdo, es necesario realizar algunas modificaciones en cuanto a la inyección o a las concentraciones del vector.

Si bien, con los resultados obtenidos hasta la fecha, no se puede avanzar a la siguiente etapa del desarrollo del fármaco, queda abierta la posibilidad de continuar con la investigación, ya que se obtuvieron resultados muy positivos de casi todos los animales del día 10 del grupo 3, como los del día 10 del grupo 4, ya que se obtuvieron bandas correspondientes al Brecept, que se pudieron visualizar en el revelado por la técnica de quimioluminiscencia para las membranas del western blot, con lo cual el músculo de la pata, en donde fueron inyectados, pudo transcribir la información genética del vector y traducirlo a la proteína Brecept. Esos resultados en conjunto con los obtenidos por medio de la técnica de ELISA del suero, brindaron información y abrieron el panorama para modificar el enfoque de cómo continuar mediante las modificaciones pertinentes en los siguientes grupos de estudio.

A lo largo del desarrollo se fueron haciendo diferentes modificaciones en las técnicas o en las consideraciones que se tenían para llevar a cabo las mismas, como por ejemplo, el aumento de la cantidad de masa de tejido utilizada para hacer las extracciones de proteínas, o bien cambiar el método de cuantificación de Bradford a BCA, si bien hubo varios ensayos fallidos

que desencadenaron en la búsqueda del o de los errores posibles para, de este modo, poder evitarlos o remediarlos en la siguiente Grupo de ensayo y buscar de esta forma acercarnos un poco más al objetivo principal.

En resumen, el presente trabajo representa los pasos iniciales para establecer un método de delivery intramuscular de un vector lentiviral que codifica Brecept y brinda las bases para continuar evaluando y desarrollando esta técnica para el desarrollo de terapias más efectivas para prevenir la fibrosis cardíaca.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SAVALnet (2007, 3 de diciembre) *Cicatrización cardíaca ¿proceso reversible?* <https://www.savalnet.cl/cienciaymedicina/progresosmedicos/11129.html>
2. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling -concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an InternationalForum on Cardiac Remodeling. J Am Coll Cardiol. 2000; 35:569-82.
3. Pearlman ES, Weber KT, Janicki JS, Pietra GG, Fishman AP. Muscle fiber orientation and connective tissue content in the hypertrophied human heart. Lab Invest. 1986; 46:158-64.
4. López B, Querejeta R, Varo N, González A, Larman M, Martínez Ubago JL, et al. Usefulness of serum carboxy-terminal propeptide of procollagen type I in assessment of the cardioreparative ability of antihypertensive treatment in hypertensive patients. Circulation. 2001; 104:286-91.
5. Krayenbuehl HP, Hess OM, Monrad ES, Schneider J, Mall G, Turina M. Left ventricular myocardial structure in aortic valve disease before, intermediate, and late after aortic valve replacement. Circulation. 1989; 79:744-55.
6. Fielitz J, Hein S, Mitrovic V, Pregla R, Zurbrugg HR, Warnecke C, et al. Activation of the cardiac renin-angiotensin system and increased myocardial collagen expression in human aortic valve disease. J Am Coll Cardiol. 2001; 37:1443-9.
7. Janicki JS, Brower GL. The role of myocardial fibrillar collagen in ventricular remodeling and function. J Cardiac Fail. 2002;8 Suppl 6: S319-25.
8. Rossi MA. Pathologic fibrosis and connective tissue matrix in left ventricular hypertrophy due to chronic arterial hypertension in humans. J Hypertens. 1998; 16:1031-41.
9. Creemers EE, Pinto YM. Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart. Cardiovasc Res. 2011; 89:265-72.
10. Janeway CA, Travers P, Mark W, Mark S: Parte IV. Cap. *The adaptative immune response*. En: *Immunobiology*. 5a. Edición. New York & London. Garland Science, 2001.
11. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P: *Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling*. Circ Res 2004; 94(12): 1543–1553.
12. Sirera R, Salvador A, Roldan I, Talens R, González–Molina A, Rivera M: *Quantification of pro inflammatory cytokines in the urine of congestive Heart failure patients. Its relationship with plasma levels*. Eur J Heart Fail 2003; 5: 27–31.
13. Ono K, Matsumori A, Shio T, Furukawa Y, Sasayama S: *Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular*

remodeling. *Circulation*, 1998; 98: 149–156.

14. Mann D: *Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation*. *Ann Rev Physiol* 2003; 65: 81–101.
15. Budi, E. H., Duan, D., and Derynck, R. (2017). Transforming growth factor- β Receptors and Smads: regulatory complexity and functional versatility. *Trends Cell Biol.* 27, 658–672. doi: 0.1016/j.tcb.2017.04.005
16. Moses, H. L., Roberts, A. B., and Derynck, R. (2016). The discovery and early days of TGF- β : a historical perspective. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8: a021865. doi: 10.1101/cshperspect.a021865
17. Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci.* 2014; 71:549–74.
18. Frieler RA, Mortensen RM. Immune cell and other noncardiomyocyte regulation of cardiac hypertrophy and remodeling. *Circulation.* 2015; 131:1019–30.
19. Heldin, C. H., and Moustakas, A. (2016). Signaling receptors for TGF- β family members. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8: a022053. doi: 10.1101/cshperspect.a022053
20. Bertolio, M. S., La Colla A., Carrea A., Romo A., Canziani G., Echarte S. M., Campisano S., Barletta G.P., Monzon A. M., Rodríguez T.M., Chisari A.N., Dewey R.A. (2021) A Novel Splice Variant of Human TGF- β Type II Receptor Encodes a Soluble Protein and Its Fc-Tagged Version Prevents Liver Fibrosis in vivo. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*.
21. Lukashev, A. N., Zamyatnin, A. A., Jr. (2016) Viral vectors for gene therapy: Current state and clinical perspectives. *Biochemistry (Moscow)*, 81(7), 700-708. <https://doi.org/10.1134/S0006297916070063>
22. Weintraub K. The STAT guide to viral vectors, the linchpin of gene therapy. *STAT Reports*. 2019. Available from: <https://reports.statnews.com/products/stat-guide-to-viral-vectors-the-linchpin-of-gene-therapy?variant=31609491882087>.
23. J.N. Warnock, C. Daigre, M. Al-Rubeai Introduction to viral vectors *Methods Mol Biol.*, 737 (2011), pp. 1-25 doi: 10.1007/978-1-61779-095-9_1.
24. S. Durand, A. Cimarelli The inside out of lentiviral vectors *Viruses.*, 3 (2) (2011), pp. 132-159 doi: 10.3390/v.3020132.
25. Friedman, S. L., Sheppard, D., Duffield, J. S., and Violette, S. (2013). Therapy for fibrotic diseases: nearing the starting line. *Sci. Transl. Med.* 5:167sr1. doi:10.1126/scitranslmed.3004700
26. Walton, K. L., Johnson, K. E., and Harrison, C. A. (2017). Targeting TGF- β mediated SMAD signaling for the prevention of fibrosis. *Front. Pharmacol.* 8:461. doi:

27. Derynck, R., and Budi, E. H. (2019). Specificity, versatility, and control of TGF- β family signaling. *Sci. Signal.* 12: eaav5183.
28. Hinderer S., Schenke-Layland K. (2019) Cardiac fibrosis – A short review of causes and therapeutic strategies.
29. Roth GA, Abate D, Abate KH, Abay SM, et al. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2018; 392:1736–1788.
30. Meretta, A. (2022, 29 de septiembre) *Las 3 herramientas al alcance de todos que permiten reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares.* <https://www.infobae.com/salud/2022/09/29/las-3-herramientas-al-alcance-de-todos-que-permiten-reducir-el-riesgo-de-enfermedades-cardiovasculares/>
31. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications. *Circulation.* 1990; 81:1161–1172.
32. Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, Boucek MM, Novick RJ. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: seventeenth official report: 2000. *J Heart Lung Transplant.* 2000;19: 909–931.
33. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am J Physiol.* 1991; 260:H1406–H1414.
34. Cheng W, Kajstura J, Nitahara JA, Li B, Reiss K, Liu Y, Clark WA, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P. Programmed myocyte cell death affects the viable myocardium after infarction in rats. *Exp Cell Res.* 1996; 226:316 – 327.
35. Weisman HF, Bush DE, Mannisi JA, Weisfeldt ML, Healy B. Cellular mechanisms of myocardial infarct expansion. *Circulation.* 1988;78: 186– 201.
36. Burlew BS, Weber KT. Connective tissue and the heart: functional significance and regulatory mechanisms. *Cardiol Clin.* 2000; 18:435– 442. Jalil JE, Doering CW, Janicki JS, Pick R, Shroff SG, Weber KT. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat leftventricle. *Circ Res.* 1989; 64:1041–1050.
37. Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor- β 1. *Mol Genet Metab.* 2000; 71:418–435. Hao J, Ju H, Zhao S, Junaid A, Scammell-La Fleur T, Dixon IM. Elevation of expression of Smad2, 3, and 4, decorin and TGF- β in the chronic phase of myocardial infarct scar healing. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31:667– 678.
38. Deten A, Holzl A, Leicht M, Barth W, Zimmer HG. Changes in extracellular matrix and

- in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats. *J Mol Cell Cardiol.* 2001; 33:1191–1207.
39. Schieffer B, Wirger A, Meybrunn M, Seitz S, Holtz J, Riede UN, Drexler H. Comparative effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade on cardiac remodeling after myocardial infarction in the rat. *Circulation.* 1994; 89:2273–2282.
40. Yu CM, Tipoe GL, Wing-Hon Lai K, Lau CP. Effects of combination of angiotensin-converting enzyme inhibitor and angiotensin receptor antagonist on inflammatory cellular infiltration and myocardial interstitial fibrosis after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38: 1207–1215.
41. L.A. Murtha, M.J. Schuliga, N.S. Mabotuwana, S.A. Hardy, D.W. Waters, J.K. Burgess, D.A. Knight, A.J. Boyle, The processes and mechanisms of cardiac and pulmonary fibrosis, *Front. Physiol.* 8 (2017).
42. D. Mozaffarian, E.J. Benjamin, A.S. Go, D.K. Arnett, M.J. Blaha, M. Cushman, S.R. Das, S. de Ferranti, J.-P. Després, H.J. Fullerton, V.J. Howard, M.D. Huffman, C.R. Isasi, M.C. Jiménez, S.E. Judd, B.M. Kissela, J.H. Lichtman, L.D. Lisabeth, S. Liu, R.H. Mackey, D.J. Magid, D.K. McGuire, E.R. Mohler, C.S. Moy, P. Muntner, M.E. Mussolino, K. Nasir, R.W. Neumar, G. Nichol, L. Palaniappan, D.K. Pandey, M.J. Reeves, C.J. Rodriguez, W. Rosamond, P.D. Sorlie, J. Stein, A. Towfighi, T.N. Turan, S.S. Virani, D. Woo, R.W. Yeh, M.B. Turner, Heart disease and stroke statistics— 2016 update, *Rep. Am. Heart Assoc.* 133 (2016) e38–e360.
43. E. Wilkins, L. Wilson, K. Wickramasinghe, P. Bhatnagar, J. Leal, R. Luengo Fernandez, R. Burns, M. Rayner, N. Townsend, *European Cardiovascular Disease Statistics 2017*, European Heart Network, 2017.
44. Noyan, F., Díez, I. A., Hapke, M., Klein, C., Dewey, R. A. (2012). Induced transgene expression for the treatment of solid tumors by hematopoietic stem cell-based gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 19, 352–357.
45. Li Y, Takemura G, Kosai K, Yuge K, Nagano S, Esaki M, Goto K, Takahashi T, Hayakawa K, Koda M, Kawase Y, Maruyama R, Okada H, Minatoguchi S, Mizuguchi H, Fujiwara T, Fujiwara H. Postinfarction treatment with an adenoviral vector expressing hepatocyte growth factor relieves chronic left ventricular remodeling and dysfunction in mice. *Circulation.* 2003; 107:2499 –2506.
46. Chial, H.J., Thompson, H.B., and Splittgerber, A.G. (1993) A spectral study of the charge forms of Coomassie Blue G. *Anal. Biochem.* 209, 258–266.
47. Kruger, N. (2009) *The Bradford Method For Protein Quantitation.*

- https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-59745-198-7_4
48. ThermofisherSCIENTIFIC. *Kit de ensayo de proteínas BCA Pierce™*.
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ar/es/23225>
49. ThermofisherSCIENTIFIC. *Basic Principles of RT-qPCR*.
<https://www.thermofisher.com/ar/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/basic-principles-rt-qpcr.html>
50. Mancera, P. (2020, 01 de abril) *CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE DIFERENTES TÉCNICAS*.
<https://vhir.vallhebron.com/sites/default/files/2022-06/UAT-quantificacio-fluorometrica-acids-nucleics.pdf>
51. Gonzáles Mañas, JM (2015, 29 de octubre) *Introducción al cultivo celular*.
https://www.ehu.eus/biofisica/juanma/mbb/pdf/cultivo_celular.pdf

9. ANEXO

9.1. RT-qPCR

La PCR de transcripción inversa cuantitativa (RT-qPCR) se usa cuando el material de partida es ARN. En este método, el ARN se transcribe primero en ADN complementario (ADNc) mediante transcriptasa inversa a partir de ARN total o ARN mensajero (ARNm). Luego, el ADNc se usa como molde para la reacción de qPCR.⁴⁹

41

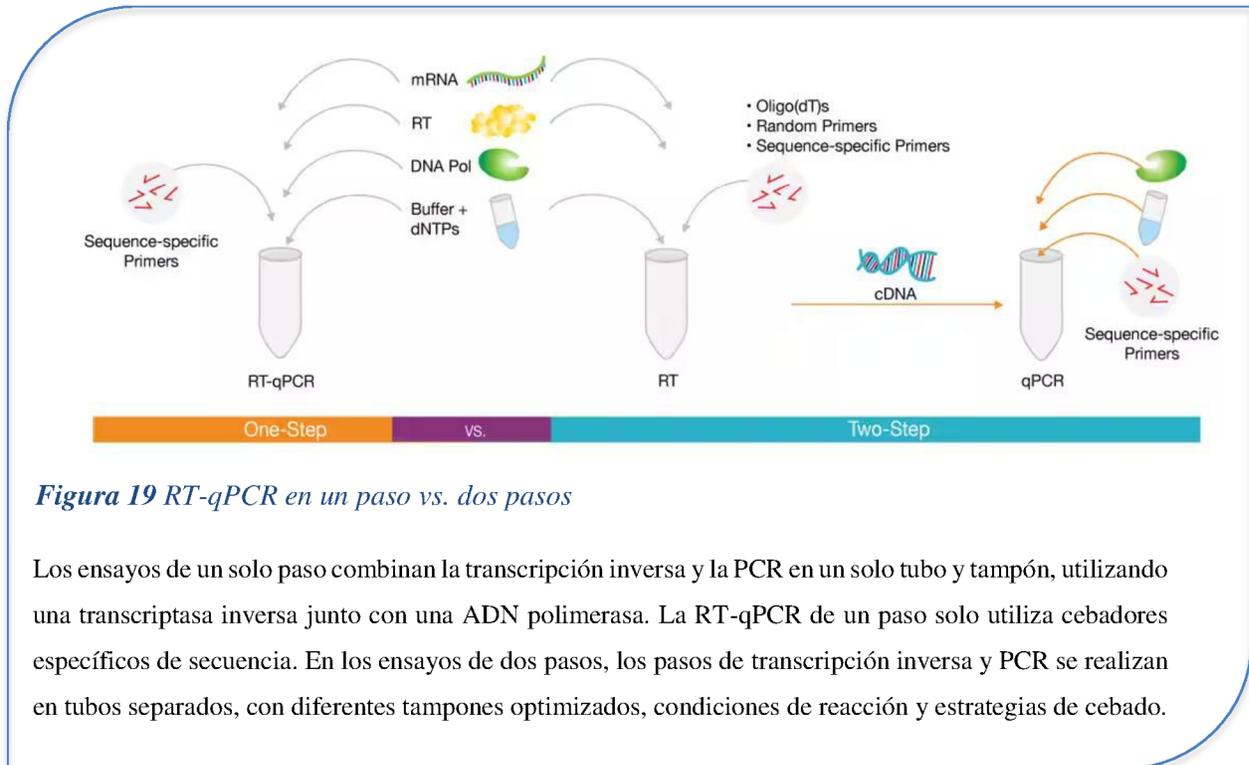


Figura 19 RT-qPCR en un paso vs. dos pasos

Los ensayos de un solo paso combinan la transcripción inversa y la PCR en un solo tubo y tampón, utilizando una transcriptasa inversa junto con una ADN polimerasa. La RT-qPCR de un paso solo utiliza cebadores específicos de secuencia. En los ensayos de dos pasos, los pasos de transcripción inversa y PCR se realizan en tubos separados, con diferentes tampones optimizados, condiciones de reacción y estrategias de cebado.

Los termocicladores miden la acumulación de producto de ADN después de cada ronda de amplificación por PCR utilizando reporteros fluorescentes. Hay dos tipos de composiciones químicas para detectar productos de PCR, el SYBR® green o sondas TaqMan®.

Los datos primarios de un experimento de PCR en tiempo real son una curva de amplificación, que muestra la señal fluorescente en unidades fluorescentes relativas (RFU) frente al número de ciclo y registra la acumulación del producto amplificado. La línea de base se mide de forma temprana en el proceso de amplificación antes de que el instrumento pueda detectar la formación del producto. A medida que el producto se acumula, llega a un punto en el que el instrumento puede detectar el cambio en la señal por encima del nivel de fondo: esta es la porción exponencial de la curva. El umbral de detección es el nivel de fluorescencia donde la acumulación de producto se puede distinguir del fondo. Este umbral se establece automáticamente por encima de la línea de base, dentro de la región exponencial de la curva

de amplificación. El número de ciclo donde el producto de amplificación cruza ese umbral de detección es el ciclo de cuantificación (Ct o Cq).⁵⁰

Para la realización como complemento de este trabajo, se cuantificaron por RT-qPCR los niveles de ARNm de Brecept utilizando primers específicos. El ARN total se purificó utilizando PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen). El ARN total se cuantificó mediante el empleo de RiboGreen RNA quantification Assay (Invitrogen). La presencia de inhibidores presentes en las muestras de ARN se certificó utilizando la cuantificación por qPCR de la amplificación del amplicón SPUD. El cDNA se generó utilizando 0,6 ug de ARN, empleando Superscript IV Reverse Transcriptase, and oligo dT (20) primers, ambos Invitrogen. La integridad del ARNm se estimó mediante el ensayo 3':5' by RT qPCR utilizando primers GAPDH. La determinación de los niveles de ARNm de los diferentes genes por RT-qPCR se realizó utilizando el ciclado térmico de qPCR StepOne real-time PCR System (Applied Biosystems). Las reacciones de 10 μ l se realizaron por triplicado conteniendo 2 μ l de cDNA (dilución 1/15), 400 nM de los primers específicos correspondientes y Power SYBR Green Máster Mix (Applied Biosystems). Para la evaluación relativa de los niveles a ARNm de los distintos genes se amplificaron también por RT-qPCR, el gen de referencia utilizado fue el GAPDH, también en triplicado. Todos los procedimientos realizados fueron los recomendados en las guías MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments). La cuantificación relativa de la expresión génica se determinará mediante el método CT comparativo.

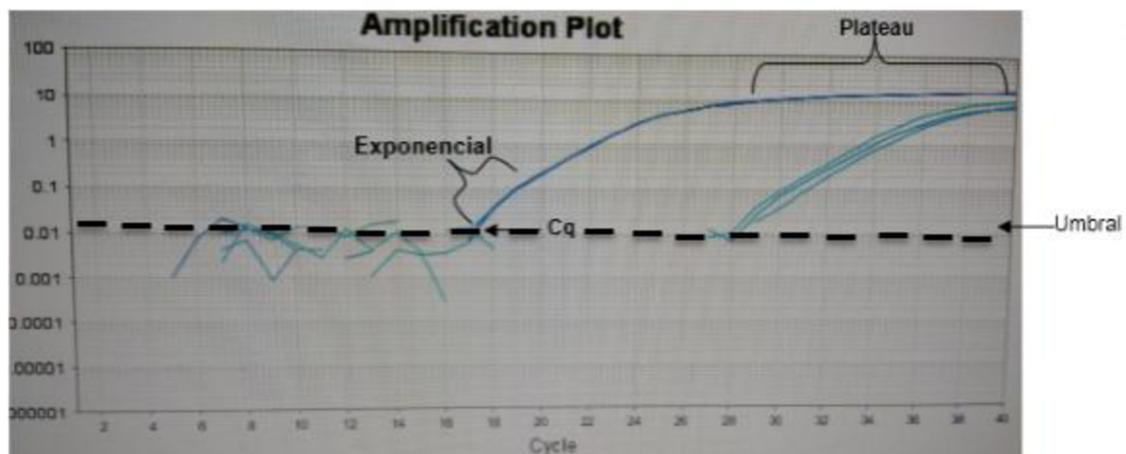


Figura 20 Gráfico de amplificación de una PCR a tiempo real

Se muestra la relación entre la línea base, umbral de detección y ciclo de cuantificación (Cq)

9.2. Resultados obtenidos en la RT-qPCR para las muestras utilizadas

A continuación, se presentan las imágenes que contienen los resultados de las cuantificaciones realizadas a través de RT-qPCR para las muestras de RNA y de este modo corroborar si las muestras de ambos tejidos de estudio tenían el RNA que codifica para la proteína buscada, Brecept.

La *Figura 21* y la *Figura 22* muestran los resultados de la cuantificación de RNA para un mismo animal, la primera es sobre tejido cardíaco y la segunda es sobre el músculo de la pata. En ambas se ve en el final de cada una de las tablas la cantidad de RNA que contenían las muestras, por ende, se procedió a procesar las proteínas con el WB. Y así sucesivamente ocurrió con las demás muestras, pudiendo seguir con el ensayo de la cuantificación de proteínas en ambos tejidos.

9.2.1. Muestra #4d7 VI (Grupo 1)

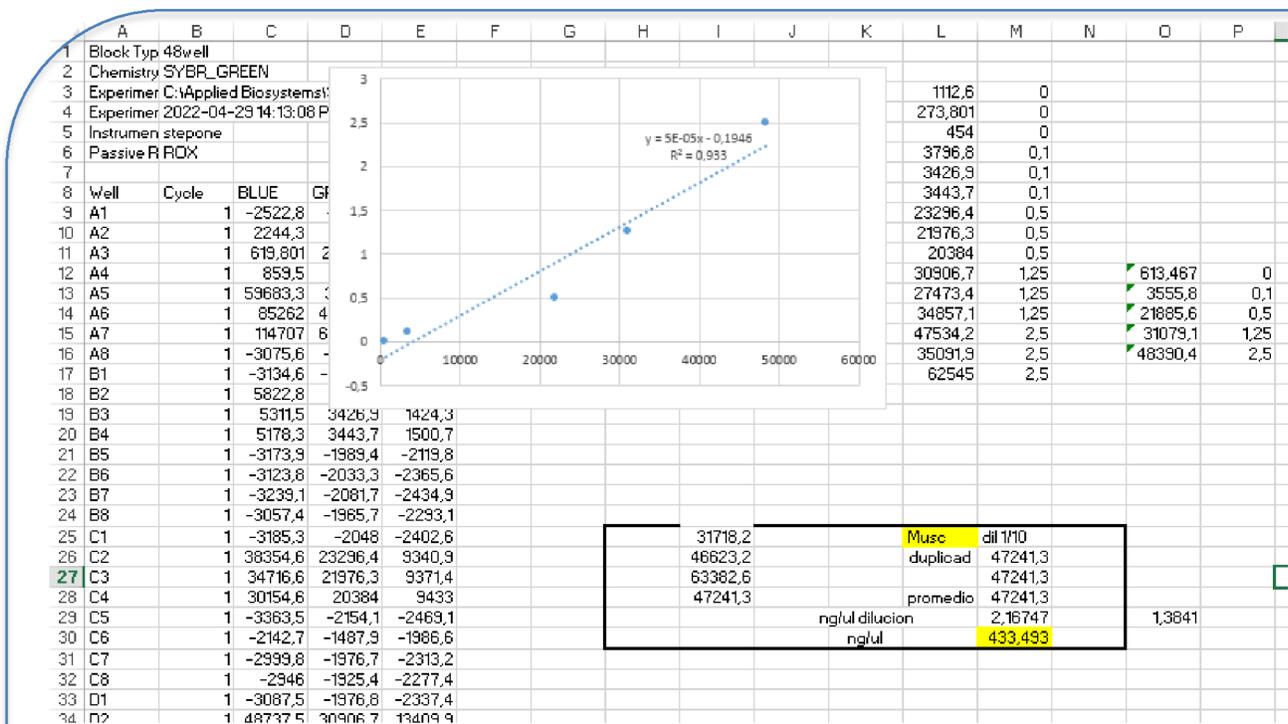


Figura 21 RT-qPCR #4d7 VI t1

Ensayo de RT-qPCR para una muestra del grupo 1 de ensayo. Se ve la gráfica de la curva estándar para poder extrapolar la muestra incógnita y saber la concentración de RNA que presenta la muestra, para ello se realizaron los cálculos necesarios que se muestran en la tabla con bordes negros.

9.2.2. Muestra #4d7 MP (Grupo1)

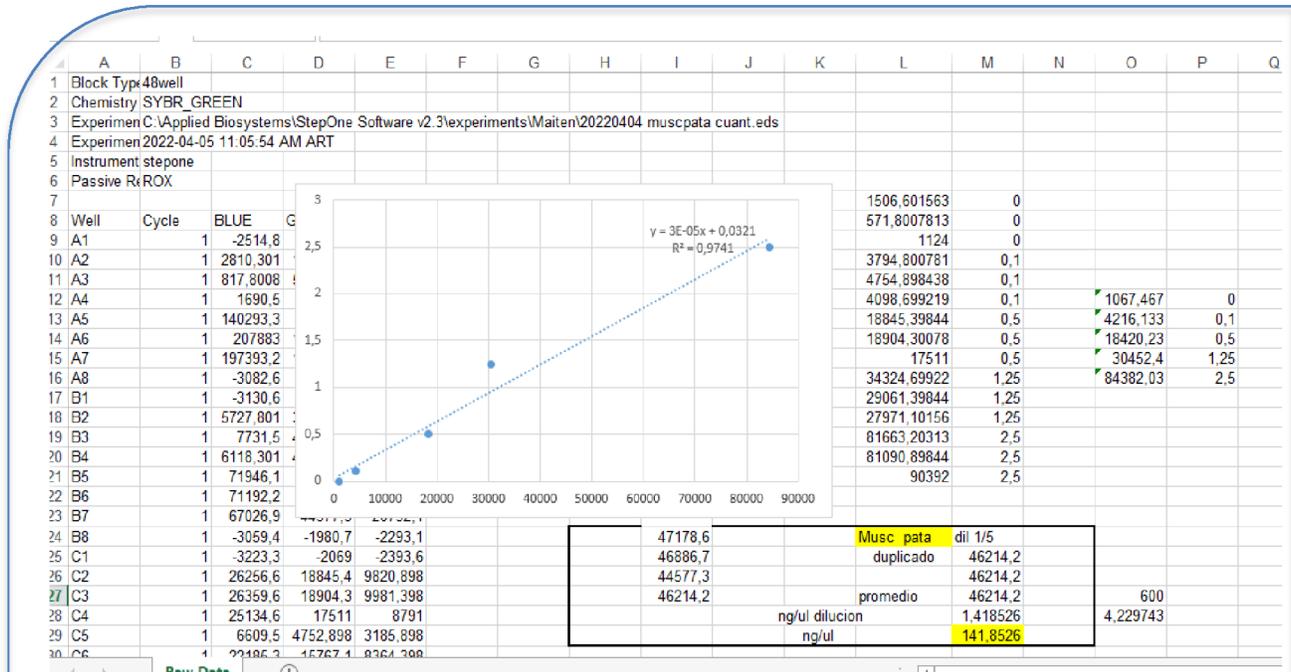


Figura 22 RT-qPCR #4d7 MP t1

Se representan los resultados correspondientes al mismo animal anterior, sólo que en este caso corresponde al músculo de la pata.

9.2.3. Muestra #2d15 MP y VI (Grupo2)

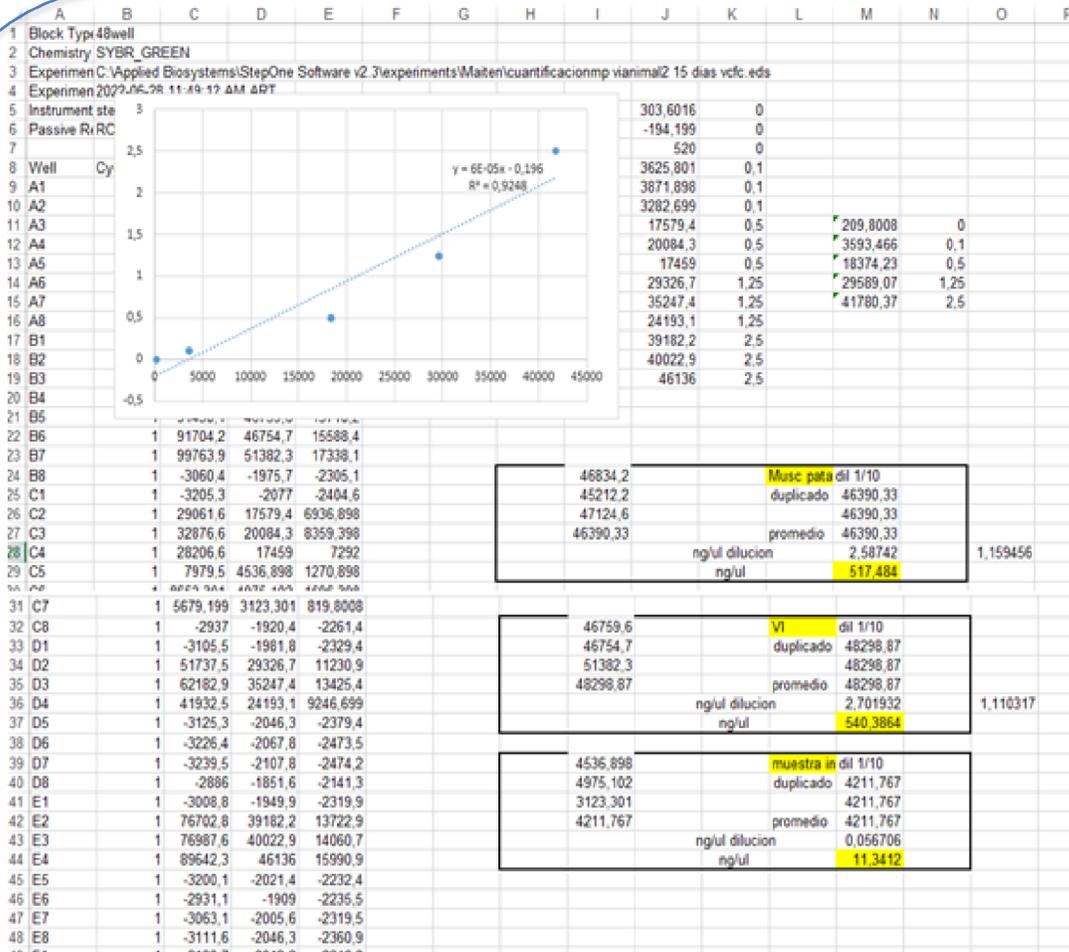


Figura 23 RT-qPCR #2d15 MP y VI t2

Se plasman los resultados correspondientes al grupo 2 de ensayo, para ambos músculos de un mismo animal. Se muestra la gráfica de la curva estándar y las tablas con los valores calculados de las concentraciones de RNA para esas muestras.

9.2.4. Muestras #1d10 MP, #1d15 MP, #1d20 MP y #2d20 MP (Grupo 3)

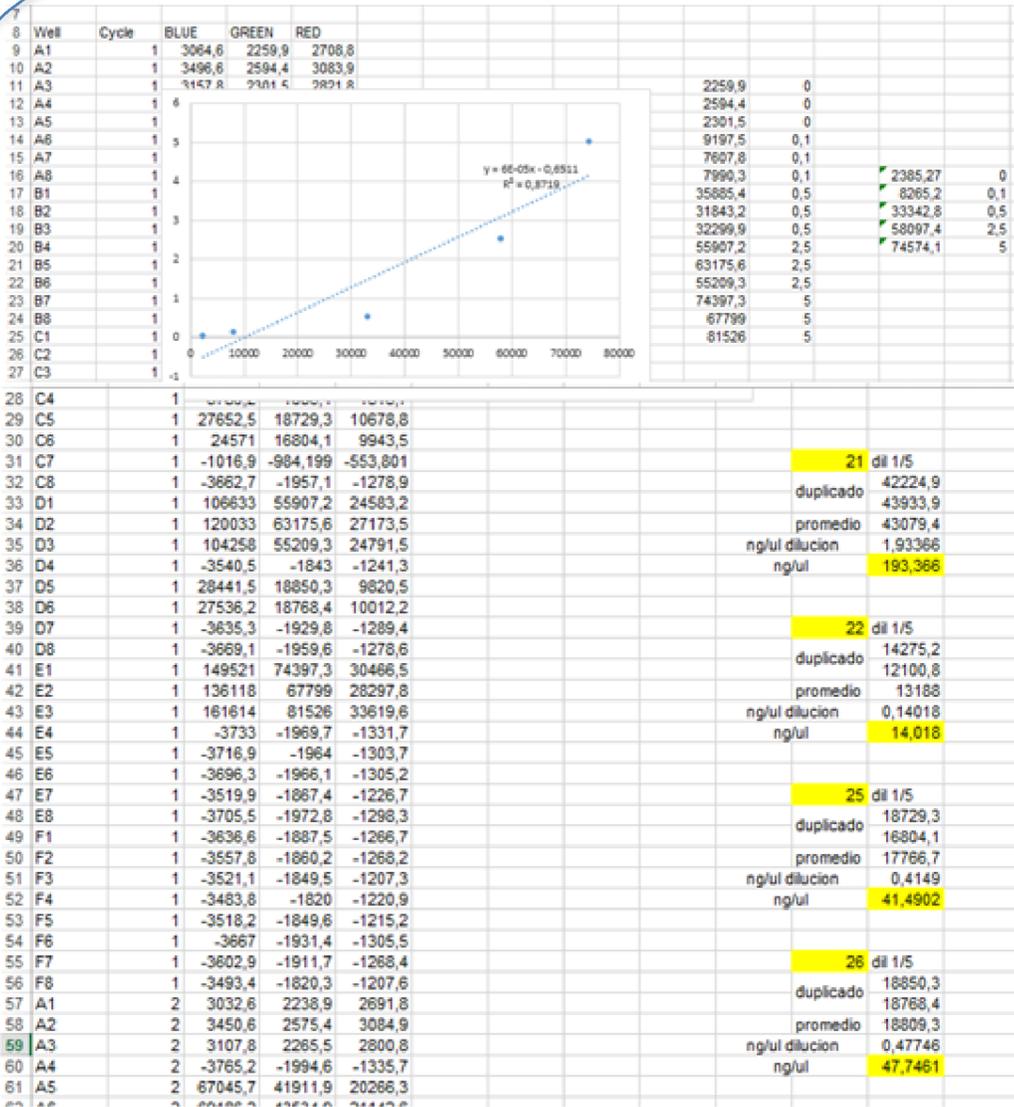


Figura 24 RT-qPCR #1d10 MP, #1d15 MP, #1d20 MP y #2d20 MP (t3)

Se muestran los resultados de la cuantificación de RNA para las muestras del grupo 3 del ensayo.

9.2.5. Muestras #2d10, #2d15 y #2d20 (Grupo 3) MP; #1d10 (Grupo4) MP

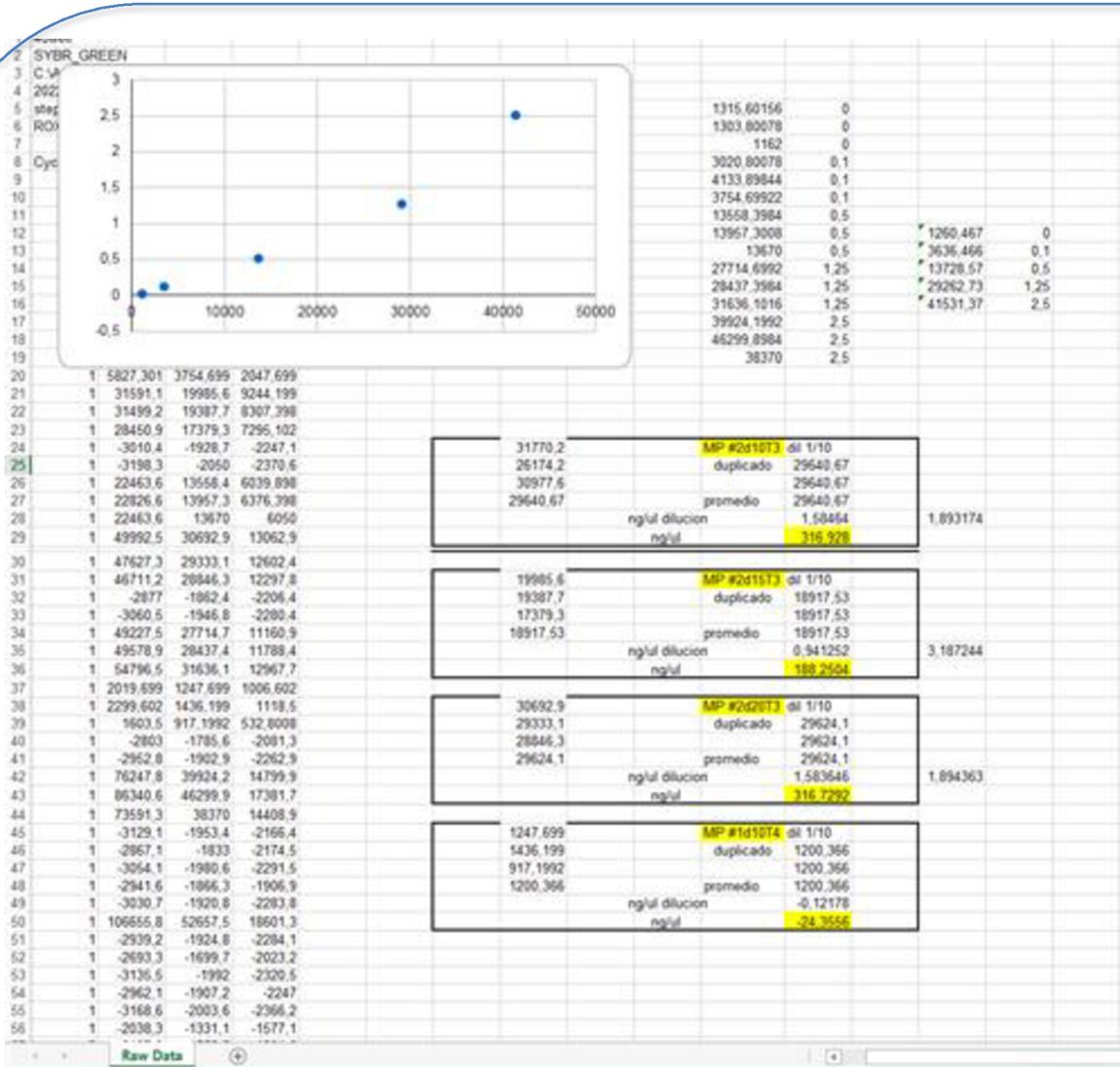


Figura 25 RT-qPCR #2d10 t3, #2d15 t3, #2d20 t3; #1d10 t4. Todas las muestras corresponden a músculo de la pata.

9.3. Cultivo celular eucariota

Primero se realizó un cultivo celular primario el cual se puede obtener a partir de explantes primarios o de suspensiones de células disgregadas. La disgregación celular se realiza por métodos enzimáticos o mecánicos. En estos cultivos se pierden las interacciones célula-célula y las interacciones de la célula con la matriz extracelular. Sin embargo, las células son capaces de proliferar y la población celular crece notablemente. Cuando las células ocupan toda la superficie disponible se dice que han alcanzado la confluencia. En esta etapa, las células

establecen contactos entre ellas que inhiben su proliferación y el crecimiento se detiene. Por eso, al cabo de un tiempo hay que transplantar las células a un nuevo soporte. Esta operación se denomina subcultivo o pase.⁵¹El tipo de cultivo utilizado fue del tipo cultivo en suspensión en el cual las células se encuentran dispersas en el medio de cultivo. Su crecimiento no depende del anclaje. Este tipo de cultivo se restringe a las células hematopoyéticas, células madre, líneas celulares transformadas y células tumorales. Alcanzan la confluencia cuando el número de células es grande y los nutrientes son insuficientes. El tipo de célula utilizada fue 293T son células de tipo epitelial aisladas del riñón de fetos humanos, elegidas por su alta transfectibilidad.

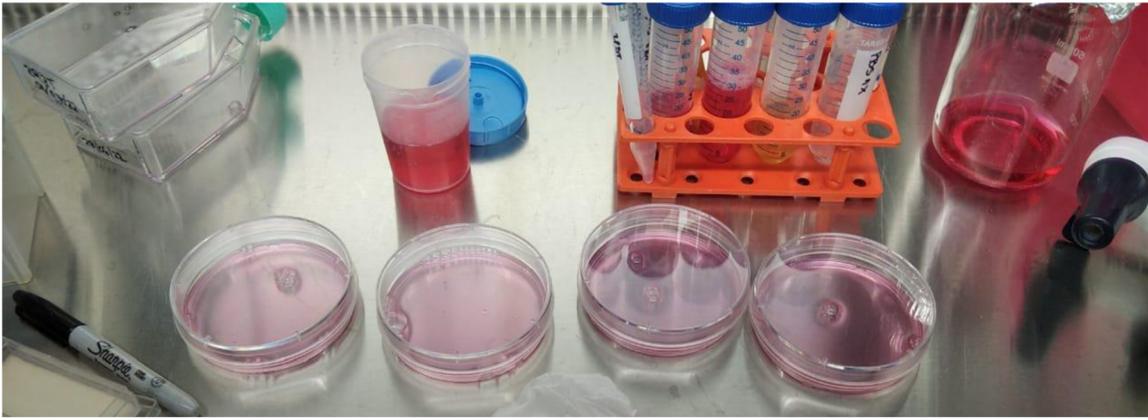


Figura 26 Preparación de cultivo celular

En la imagen se muestran las botellas de cultivo rotuladas, las placas de Petri con el medio de cultivo, la gradilla con los tubos falcon que contenían los medios de cultivo que se utilizaban, la pipeta automática y la botella con más medio de cultivo. En el centro de la imagen un tubo de boca ancha como descartador.

9.3.1. Recuento celular

Se pusieron en la placa 10 ul de Trypan blue+ 10 ul de medio que contiene las células en un tubo, se mezcló con pipeta automática y se colocaron 10 ul de la combinación recién mencionada en la cámara de Neubauer como la que se ve en la *Figura 27*.

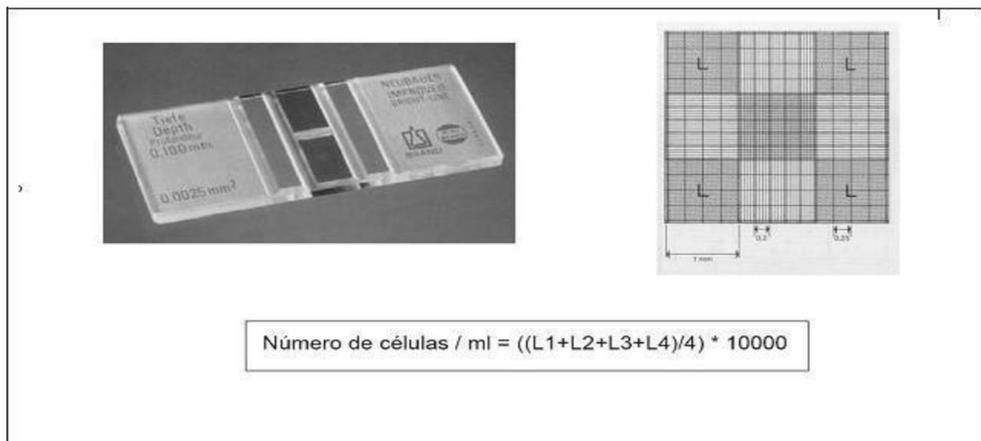


Figura 27 Cámara de Neubauer

[Fotografía] Figura13, Navarro O. (2012) ResearchGate, https://www.researchgate.net/figure/Figura-13-Camara-de-Neubauer-izq-Camara-de-Neubauer-der-Dibujo-representativo-de-los_fig2_274392274

9.3.2. Generación de vectores lentivirales mediante co- transfección

Este proceso llevó un despliegue de cinco días de trabajo consecutivos. El día 1 consistió en seguir el protocolo de cultivo de células embrionarias de riñón humano 293T (también denominadas células HEK293T o células 293T) y finalmente hacer el recuento de estas como se mencionó en el apartado 9.2.1. Se hizo el recuento de células para cada una de las placas utilizadas, se hicieron cuatro placas, ya que se iba a estudiar una con VCFC y otra con VAFC, y para aumentar el rendimiento se hicieron por duplicado ambas. En el día 2 se hizo el cambio de medio de DHEM (medio de cultivo) por un medio complejo (DHEM + cloroquina). Tanto el día 3 como el 4 consistió en un cambio de medio de cultivo a la mañana y a la tarde, luego se lo dejó incubar 12- 16 horas. Finalmente, el quinto día se realizó la titulación, para ver qué cantidad de vector había. Como se ve en la *Figura 28*, es una foto obtenida de la pantalla del microscopio de fluorescencia en donde se ven las células que expresan una proteína fluorescente verde (GFP), en este caso hubo un bajo título de vector viral. Se repitió el procedimiento, como se observa en la *Figura 29*, hay un mayor número de células expresando GFP, con lo cual se obtuvo un título adecuado para ser utilizado en los ensayos correspondientes a los grupo 3 y 4 de esta investigación, habiéndose obtenido un vector lentiviral con más concentración que en los casos anteriores.



Figura 28 Transfección no utilizada (VAFC)



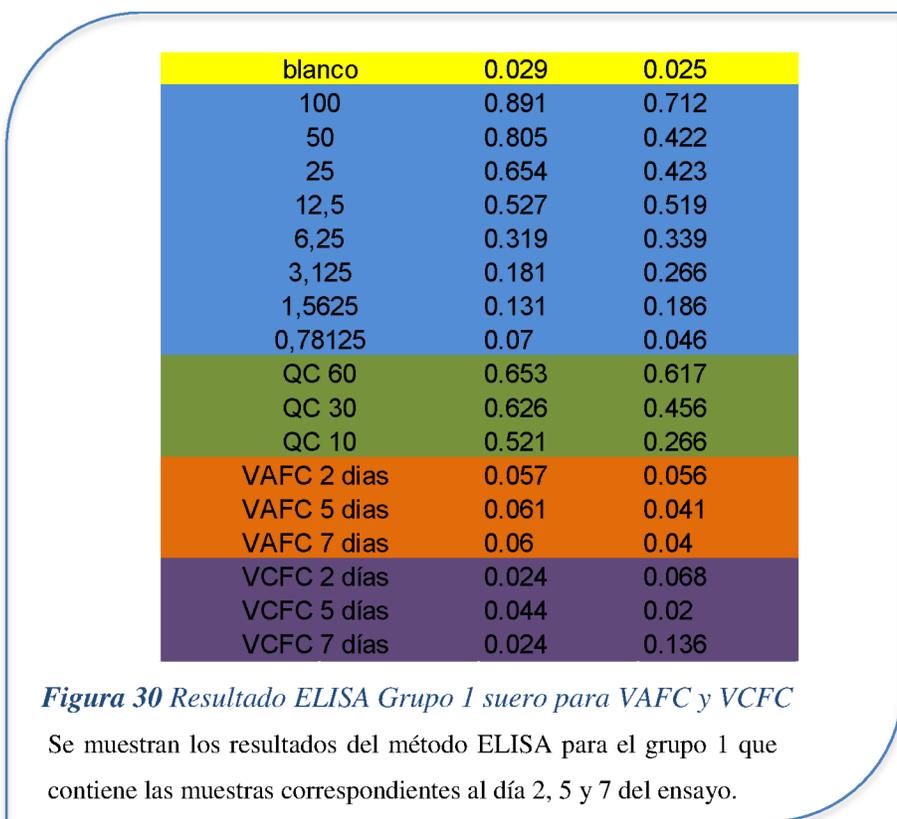
Figura 29 Transfección utilizada en Grupo 3 y Grupo 4 (VCFC)

9.4. ELISA

Este procedimiento fue realizado por Pamela Vázquez, técnica de laboratorio, que forma parte de esta investigación. Para ello, siguió el protocolo de RADBIO: ELISA method for Fc-protein quantification in mouse serum, para todas las muestras de suero de todos los animales utilizados en este proyecto.

Los resultados de esta técnica se expresan a continuación en forma de tablas, ya que se tuvieron en cuenta para la toma de decisiones a lo largo del trabajo. Gracias a ellos, es que no se procedió con los western blot de los ventrículos, ya que no se observaban proteínas en el suero, en algunos grupos de trabajo, con lo cual tampoco iban a encontrarse en el corazón.

9.4.1. Resultados de la Grupo 1 de muestras de suero



En esta tabla al igual que en las siguientes, para el procedimiento mencionado, se presentan los resultados separados en bloques de color para facilitar su visualización. En la primera fila se encuentra el blanco, el cual se realizó por duplicado, el primer bloque de color celeste se corresponde a la curva de calibración, también por duplicado; el siguiente bloque de color corresponde a los QC (control de calidad) los cuales se incluyen en cada corrida del ensayo, el primero es un control de alto nivel de calidad, el siguiente es mediano y por último es bajo

nivel de calidad. Por debajo de este se encuentran las diferentes muestras a evaluar, también se realizaron por duplicado.

blanco	0.028	0.031
100	0.859	1.123
50	0.777	1.05
25	0.708	0.916
12,5	0.482	0.581
6,25	0.294	0.349
3,125	0.159	0.184
1,5625	0.115	0.111
0,78125	0.079	0.088
QC 60	0.014	1.205
QC 30	1.019	0.96
QC 10	0.597	0.519
#1 VAFC 2 días	0.035	0.041
#1 VAFC 5 días	0.032	0.028
#1 VAFC 7 días	0.042	0.05
#2 VAFC 2 días	0.051	0.059
#2 VAFC 5 días	0.037	0.034
#2 VAFC 7 días	0.035	0.049
#3 VAFC 2 días	0.116	0.118
#3 VAFC 5 días	0.037	0.031
#3 VAFC 7 días	0.054	0.039
#4 VAFC 2 días	0.973	0.879
#4 VAFC 5 días	0.057	0.153
#4 VAFC 7 días	0.05	0.05
#5 VAFC 2 días	0.051	0.039
#5 VAFC 7 días	0.037	0.033
#1 VCFC 2 días	0.042	0.053
#1 VCFC 5 días	0.035	0.032
#1 VCFC 7 días	0.079	0.039
#2 VCFC 2 días	0.039	0.039
#2 VCFC 5 días	0.036	0.035
#2 VCFC 7 días	0.049	0.042
#3 VCFC 2 días	0.067	0.05
#3 VCFC 5 días	0.033	0.03
#3 VCFC 7 días	0.045	0.034
#4 VCFC 2 días	0.054	0.041
#4 VCFC 5 días	0.04	0.042
#4 VCFC 7 días	0.045	0.046
#5 VCFC 2 días	0.112	0.106
#5 VCFC 5 días	0.06	0.058
#5 VCFC 7 días	0.044	0.04

Figura 31 Repetición de ELISA para Grupo 1 con nuevos anticuerpos

Se presentan los resultados de la repetición del ensayo del grupo 1, para las muestras de suero, de todos los animales del experimento que la componen. Se obtuvieron concentraciones de la proteína de interés en el suero de este grupo de muestras.

Blanco	0.038	0.023	
100	100	1.049	1.099
50	50	0.827	0.961
25	25	0.741	0.761
12,5	12,5	0.484	0.504
6,25	6,25	0.293	0.356
3,125	3,125	0.176	0.208
1,5625	1,5625	0.142	0.117
0,78125	0,78125	0.077	0.075
QC 60	QC 60	1.01	1.02
QC 30	QC 30	1.045	0.844
QC 10	QC 10	0.437	0.452
#1 VAFC 2 días		0.039	0.035
#1 VAFC 5 días		0.037	0.035
#1 VAFC 7 días		0.043	0.041
#2 VAFC 2 días		0.034	0.034
#2 VAFC 5 días		0.026	0.028
#2 VAFC 7 días		0.027	0.028
#3 VAFC 2 días		0.037	0.033
#3 VAFC 5 días		0.042	0.034
#3 VAFC 7 días		0.029	0.03
#4 VAFC 2 días		0.824	0.832
#4 VAFC 5 días		0.027	0.035
#4 VAFC 7 días		0.043	0.042
#5 VAFC 2 días		0.033	0.034
#5 VAFC 5 días		0.021	0.022
#5 VAFC 7 días		0.032	0.03
#1 VCFC 2 días		0.032	0.038
#1 VCFC 5 días		0.029	0.025
#1 VCFC 7 días		0.026	0.028
#2 VCFC 2 días		0.031	0.034
#2 VCFC 5 días		0.022	0.022
#2 VCFC 7 días		0.032	0.035
#3 VCFC 2 días		0.046	0.039
#3 VCFC 5 días		0.025	0.024
#3 VCFC 7 días		0.03	0.032
#4 VCFC 2 días		0.043	0.038
#4 VCFC 5 días		0.041	0.039
#4 VCFC 7 días		0.038	0.035
#5 VCFC 2 días		0.034	0.033
#5 VCFC 5 días		0.049	0.063
#5 VCFC 7 días		0.031	0.032

Figura 32 ELISA Grupo 1 concentraciones

En la última columna se presentan las concentraciones de cada muestra del grupo 1, en ng/ml. Las muestras que dicen “Out of range”, son aquellas cuyas concentraciones se encuentran fuera del rango de la curva, por lo tanto, no se las puede tener en cuenta para el ensayo en el músculo cardíaco, ya que, si no se encuentra la proteína en el suero, ésta, por ende, no llegó al corazón, que es el tejido diana de la proteína que se está estudiando.

9.4.2. Resultados de la Grupo 2 de sueros

blanco	0.031	0.022	
100	0.908	0.893	
50	0.706	0.66	
25	0.55	0.528	
12,5	0.384	0.351	
6,25	0.214	0.25	
3,125	0.133	0.119	
1,5625	0.103	0.077	
0,78125	0.077	0.048	
QC 60	0.847	0.801	76 ng/mL
QC 30	0.722	0.678	48 ng/mL
QC 10	0.332	0.324	10 ng/mL
#1 VAFC 10 días	0.033	0.021	0,317 ng/mL
#2 VAFC 10 días	0.044	0.035	0,537 ng/mL
#3 VAFC 10 días	0.084	0.056	1,137 ng/mL
#1 VAFC 15 días	0.037	0.039	0,501 ng/mL
#2 VAFC 15 días	0.028	0.03	0,349 ng/mL
#1 VCFC 10 días	0.038	0.035	0,484 ng/mL
#2 VCFC 10 días	0.032	0.037	0,449 ng/mL
#1 VCFC 15 días	0.06	0.035	0,685 ng/mL
#2 VCFC 15 días	0.089	0.04	1,029 ng/mL
#3 VCFC 15 días	0.028	0.035	0,398 ng/mL

Figura 33 Resultado ELISA Grupo 2 suero día 10 y 15 para VAFC y VCFC

En esta imagen se presentan los resultados de VAFC y VCFC para los animales empleados para los días 10 y 15 del Grupo 2 del ensayo. Las muestras dan concentraciones en suero dentro del rango de la curva.

Blanco	0.086	0.085
100	1.058	1.308
50	0.977	1.094
25	0.927	0.880
12,5	0.648	0.642
6,25	0.290	0.486
3,125	0.270	0.350
1,5625	0.279	0.280
0,78125	0.177	0.173
QC 60	1.204	1.069
QC 30	1.035	1.002
QC 10	0.605	0.581
#1 VAFC 20 días	0.100	0.090
#2 VAFC 20 días	0.083	0.080
#1 VCFC 20 días	0.079	0.075
#2 VCFC 20 días	0.092	0.091

Figura 34 Resultados ELISA Grupo 2 suero día 20

Corresponde a la curva, QC y ensayo del día 20, para VAFC y VCFC.

9.4.3. Resultados de la Grupo 3 de sueros

Blanco	0.099	0.077	
100	2.626	2.645	
50	2.391	2.525	
25	2.125	1.917	
12,5	1.406	1.466	
6,25	0.929	0.883	
3,125	0.59	0.6	
1,5625	0.388	0.363	
0,78125	0.193	0.188	
QC 60	2.455	2.503	56,98 ng/mL
QC 30	2.363	2.336	43,15 ng/mL
QC 10	1.393	1.407	11,59 ng/mL
#1 VCFC 10 días	0.066	0.069	Out of range
#2 VCFC 10 días	0.094	0.088	Out of range
#3 VCFC 10 días	0.207	0.103	0.078
#4 VCFC 10 días	0.094	0.121	Out of range
#5 VCFC 10 días	0.063	0.068	Out of range
#1 VCFC 15 días	0.078	0.081	Out of range
#2 VCFC 15 días	0.082	0.07	Out of range
#3 VCFC 15 días	0.068	0.102	Out of range
#4 VCFC 15 días	0.062	0.068	Out of range
#5 VCFC 15 días	0.078	0.081	Out of range
#1 VCFC 20 días	0.067	0.072	Out of range
#2 VCFC 20 días	0.114	0.116	Out of range
#3 VCFC 20 días	0.065	0.079	Out of range
#4 VCFC 20 días	0.092	0.102	Out of range
#5 VCFC 20 días	0.08	0.07	Out of range

Figura 35 Resultados ELISA Grupo 3 sueros del día 10, 15 y 20 para VCFC

En esta imagen se presenta una tabla que contiene todos los días del ensayo correspondientes al grupo 3 y se ve como todas las muestras excepto la del día 10 animal 3, se encuentran fuera del rango de la curva.

9.4.4. Resultados de la Grupo 4 de sueros

Blanco	0.068	0.067	
100	2.607	2.582	
50	2.199	2.056	
25	2.092	1.85	
12,5	1.557	1.521	
6,25	1.119	1.165	
3,125	0.808	0.76	
1,5625	0.545	0.498	
0,78125	0.266	0.282	
QC 60	2.756	2.816	
QC 30	2.307	2.366	
QC 10	1.376	1.355	
#1 VCFC 10 días	0.06	0.061	Out of range
#2 VCFC 10 días	0.08	0.07	Out of range
#3 VCFC 10 días	0.111	0.096	Out of range
#4 VCFC 10 días	0.082	0.077	Out of range
#5 VCFC 10 días	0.088	0.095	Out of range

Figura 36 Resultado ELISA para sueros Grupo 4 del día 10 para VCFC

En la presente se muestran los resultados para el último grupo de muestras que abarca este trabajo. Todas dan fuera del rango de la curva estándar por ende la proteína no se encuentra en el suero de estos animales. Por lo tanto, no se prosigió con las cuantificaciones de proteínas en el tejido cardíaco.

10. APÉNDICE

Abreviaturas

#: animal n°

π : Proteínas

Ac Mo: Anticuerpo monoclonal

BCA: ácido bicinconínico

CF: Fibroblastos cardíacos

ECV: Enfermedad cardiovascular

HRP: Horseradish Peroxidase

IC: insuficiencia cardíaca

IM: infarto de miocardio

IgG1: Inmunoglobulina 1 humana

IL-1 β : Interleucina-1 beta

IL-6: Interleucina-6

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos

MEC: matriz extracelular

MMP: metaloproteinasas de matriz

MP: Músculo de pata

NF- κ B: factor nuclear kappa B

PKB: proteína quinasa B

TIMP: inhibidores tisulares de metaloproteinasas

TFG- β 1: Factor de crecimiento transformante-beta

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

VI: ventrículo izquierdo

WB: Western blot

Coquedo Vautier