



**EFFECTOS DE LA GLUCOSAMINA COMO TRATAMIENTO PROTECTOR DE LA
ISQUEMIA CEREBRAL SOBRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN Y
FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU EN UN MODELO ANIMAL DE
ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL**

LINA MARÍA MARMOLEJO POSSO

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2014**

**EFFECTOS DE LA GLUCOSAMINA COMO TRATAMIENTO PROTECTOR DE LA
ISQUEMIA CEREBRAL SOBRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN Y
FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU EN UN MODELO ANIMAL DE
ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL**

LINA MARÍA MARMOLEJO POSSO

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
PREGRADO EN QUÍMICA FARMACÉUTICA**

**DIRECTOR: JULIANA RENGIFO
DOCTORA EN FISIOLÓGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

**CO-DIRECTOR: ALEJANDRO VERA
MAGÍSTER EN ENSEÑANZA DE LAS CIENCIAS
CANDIDATO AL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**SANTIAGO DE CALI
2014**



APROBADO POR:

Andrés Castillo

Andrés Castillo

**Andrés Orlando Castillo Giraldo
Evaluador**

Thaura Ghneim Herrera

**Thaura Ghneim Herrera
Evaluador**

Juliana Rengifo

Juliana Rengifo

**Juliana Rengifo
Director del Proyecto**

Alejandro Vera

Alejandro Vera

**Alejandro Vera
Co- Director del Proyecto**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad ICESI por la formación académica brindada, a mis compañeros por hacer de esta etapa una de las mejores. A mi tutora Juliana Rengifo, cotutor Alejandro Vera y a Elisa Viveros, porque cada uno de ustedes contribuyó al desarrollo de este proyecto, muchas gracias por todas las enseñanzas. Agradezco a mi familia que me ha apoyado y acompañado siempre, especialmente a mi papá, mi mamá y mi hermana.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 12 |
| 2. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO..... | 14 |
| 2.1. Planteamiento y justificación del problema..... | 14 |
| 2.2. Marco teórico y estado del arte | 15 |
| 2.3. Objetivos | 21 |
| 2.3.1 Objetivo general..... | 21 |
| 2.3.2 Objetivos específicos | 21 |
| 2.4. Metodología Utilizada | 22 |
| 2.4.1 Animales experimentales..... | 22 |
| 2.4.2 Procedimiento quirúrgico | 22 |
| 2.4.3 Obtención de las muestras | 23 |
| 2.4.4 Western blot..... | 23 |
| 2.4.5 Anticuerpos..... | 30 |
| 2.4.6 Densitometría y análisis estadístico..... | 31 |
| 2.5. Resultados | 32 |
| 2.6. Discusión..... | 38 |
| 2.7. Conclusiones..... | 42 |
| 2.8. Recomendaciones..... | 43 |
| 3. BIBLIOGRAFÍA | 44 |
| 4. ANEXOS..... | 48 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| <i>Tabla 1.</i> Grupos experimentales de acuerdo con el tiempo de sacrificio después de la isquemia y aplicación de glucosamina..... | 23 |
| <i>Tabla 2.</i> Preparación de las diluciones para la realización de la curva estándar...24 | |
| <i>Tabla 3.</i> Concentraciones de BSA obtenidas por el lector de microplacas para realización de la curva estándar. | 25 |
| <i>Tabla 4.</i> Absorbancias a 595 nm obtenidas por el lector de microplacas para realización de la curva estándar. | 25 |
| <i>Tabla 5.</i> Absorbancias a 595 nm obtenidas por el lector de microplacas y concentración de proteínas de cada grupo experimental calculadas a partir de la curva estándar. | 26 |
| <i>Tabla 6.</i> Composición muestra para servir en los pozos del gel..... | 27 |
| <i>Tabla 7.</i> Siembra de las muestras en el gel de poliacrilamida al 8%. | 28 |
| <i>Tabla 8.</i> Composición gel poliacrilamida al 8% por duplicado. | 28 |
| <i>Tabla 9.</i> Anticuerpos utilizados en el Western Blot..... | 30 |

LISTA DE GRÁFICAS

| | |
|---|----|
| <i>Gráfica 1.</i> Curva estándar para la determinación de la concentración de proteínas. | 26 |
| <i>Gráfica 2.</i> Prueba de varianzas iguales para datos de Tau total..... | 53 |
| <i>Gráfica 3.</i> Prueba de normalidad para datos de Tau total. | 54 |
| <i>Gráfica 4.</i> Interacción entre tiempos y tratamientos para Tau total..... | 56 |
| <i>Gráfica 5.</i> Interacción entre tratamientos y tiempos para Tau total. | 56 |
| <i>Gráfica 6.</i> Prueba de varianzas iguales para datos de p-Tau ser 214. | 57 |
| <i>Gráfica 7.</i> Prueba de normalidad para datos de p-Tau ser 214. | 57 |
| <i>Gráfica 8.</i> Interacción entre tiempos y tratamientos para p-Tau ser 214. | 58 |
| <i>Gráfica 9.</i> Interacción entre tratamientos y tiempos para p-Tau ser 214. | 59 |
| <i>Gráfica 10.</i> Prueba de varianzas iguales para datos de p-Tau ser 396. | 59 |
| <i>Gráfica 11.</i> Prueba de normalidad para datos de p-Tau ser 396. | 60 |
| <i>Gráfica 12.</i> Interacción entre tiempos y tratamientos para p-Tau ser 396. | 61 |
| <i>Gráfica 13.</i> Interacción entre tratamientos y tiempos para p-Tau ser 396. | 61 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Niveles de expresión de la proteína Tau en la corteza frontoparietal de la rata Wistar durante la isquemia cerebral focal a través del tiempo, con y sin tratamiento con glucosamina.....33
- Figura 2.** Niveles de expresión de la proteína p-Tau ser 214 en la corteza frontoparietal de la rata Wistar durante la isquemia cerebral focal a través del tiempo, con y sin tratamiento con glucosamina.....35
- Figura 3.** Niveles de expresión de la proteína p-Tau ser 396 en la corteza frontoparietal de la rata Wistar durante la isquemia cerebral focal a través del tiempo, con y sin tratamiento con glucosamina.....37
- Figura 4.** Tamaño del infarto evaluado con TTC, reactivo con el que se destaca en blanco el tejido muerto que no se tiñe de rojo, a las 24 horas de inducida la isquemia en el modelo de isquemia cerebral focal en ratas Wistar MCAO (Middle cerebral artery occlusion).....48

LISTA DE ANEXOS

| | |
|--|-----------|
| <i>Anexo 1. Tamaño del infarto en el modelo de isquemia cerebral focal en ratas Wistar.....</i> | <i>48</i> |
| <i>Anexo 2. Vía biosintética de las hexosaminas.....</i> | <i>49</i> |
| <i>Anexo 3. Cálculo realizado para determinar la concentración de proteínas a partir de la ecuación de la recta obtenida en la curva estándar.....</i> | <i>50</i> |
| <i>Anexo 4. Cálculo realizado para determinar el volumen de cada componente a servir en los pozos.....</i> | <i>50</i> |
| <i>Anexo 5. Matriz de marco lógico.....</i> | <i>51</i> |
| <i>Anexo 6. Resultados análisis estadístico para Tau total.....</i> | <i>53</i> |
| <i>Anexo 7. Resultados análisis estadístico para p-Tau ser 214.</i> | <i>57</i> |
| <i>Anexo 8. Resultados análisis estadístico para p-Tau ser 396.</i> | <i>59</i> |

RESUMEN DEL PROYECTO

Se ha reportado que la isquemia cerebral induce a la hiperfosforilación de la proteína Tau y que la glucosamina ejerce un efecto neuroprotector en cerebros postisquémicos de ratas. Sin embargo, el mecanismo celular a través del cual actúa la glucosamina aún no se conoce del todo. Por esta razón se planteó como objetivo general evaluar si el tratamiento de la isquemia cerebral focal con glucosamina en el modelo animal rata Wistar, altera los niveles de expresión y fosforilación de la proteína Tau. Para ello se compararon los niveles de expresión y fosforilación (residuos ser 214 y 396) de Tau en ratas Wistar a diferentes tiempos después de ocurrida la isquemia cerebral focal, con y sin tratamiento con glucosamina.

Es importante mencionar que hasta el momento sólo existe una terapia farmacológica aprobada para el tratamiento del accidente cerebrovascular isquémico agudo. Por lo que se hace necesario la identificación de nuevos agentes como los neuroprotectores, que sean específicos y efectivos, y puedan implementarse a futuro.

En este estudio se encontró un aumento significativo en el nivel de expresión de Tau con el tratamiento con glucosamina a las 36 horas de ocurrida la isquemia cerebral focal. Con respecto a los niveles de fosforilación de Tau en el residuo serina 396, estos tienden a ser superiores en todos los tiempos evaluados con el tratamiento con glucosamina, siendo significativos a los 105 minutos y 36 horas, y en el residuo serina 214 no se encontraron diferencias significativas en los niveles de fosforilación de Tau entre los tratamientos con y sin glucosamina, ni entre los diferentes tiempos de ocurrida la isquemia cerebral. Estos resultados sugieren que la proteína Tau puede estar involucrada en el proceso de neuroprotección que ejerce la glucosamina en la isquemia cerebral focal y a su vez, que el efecto neuroprotector de la glucosamina podría estar relacionado con mantener elevada la expresión y fosforilación en el residuo serina 396 de la proteína Tau a lo largo del tiempo, evitando así su disminución y desfosforilación una vez ocurre el evento isquémico. No obstante, esto no indica que con el tratamiento con glucosamina Tau se esté hiperfosforilando.

Palabras clave: Tau, isquemia cerebral, fosforilación, glucosamina.

ABSTRACT

It has been reported that cerebral ischemia induces hyperphosphorylation of Tau and that the application of glucosamine exerts a neuroprotective effects in the postischemic rat brain. However the cellular mechanisms by which glucosamine acts is not yet fully known. This study evaluates if the treatment of the cerebral ischemia with glucosamine in the Wistar rat animal model alter the expression and the phosphorylation levels of Tau protein. With this purpose, the expression and phosphorylation levels of Tau were compared at different times after the focal cerebral ischemia in Wistar rats with and without glucosamine treatment.

Until now only one approved pharmacological therapy for the treatment of the acute ischemic stroke exists. Therefore it is very important that research into the identification of specific and effective new agents that can act like neuroprotectors with the hope that these can be implemented in the future.

The present study reports an increase in the expression level of Tau with glucosamine treatment at 36 hours after the focal cerebral ischemia. The phosphorylation levels of Tau at ser 396 tend to be higher at all times studied with glucosamine treatment and was significantly higher at 105 minutes and 36 hours. Phosphorylation at ser 214 wasn't different with or without glucosamine treatment neither between the different times after cerebral ischemia. This results indicate that Tau protein can be involved in the neuroprotection process of glucosamine treatment in the focal cerebral ischemia and that the neuroprotective effect of glucosamine can be related to the increased expression and phosphorylation levels at Tau ser 396 over time, avoiding the decreased and dephosphorylation once the ischemic event occurs. However, this result does not indicate that Tau is hyperphosphorylated with the glucosamine treatment.

Keywords: Tau, cerebral ischemia, phosphorylation, glucosamine.

1. INTRODUCCIÓN

El accidente cerebrovascular es la segunda causa de muerte (WHO, 2012) y la causa más importante de discapacidad grave a nivel mundial (Liu en Feng, Yang, Liu, Li, Yuan, Zhang, Wu, y Li, 2011). La isquemia cerebral focal es un tipo de accidente cerebrovascular (ACV), que corresponde a una reducción del flujo sanguíneo en una región específica del cerebro que impide mantener el metabolismo y funcionamiento normal de las células cerebrales (Torregrosa, Salom, Jover-Mengual, y Alborch, 2008).

Se conoce que el tratamiento con glucosamina, ejerce un efecto neuroprotector al reducir la formación del infarto en el cerebro postisquémico hasta 3 horas después de la reperfusión (Hwang *et al*; 2010). El grupo de investigación de Fisiología Animal de la Universidad ICESI, también ha confirmado el efecto neuroprotector de la glucosamina, al reducir a la mitad el tamaño del infarto en el modelo de isquemia cerebral focal en ratas Wistar a las 24 horas de ocurrida la isquemia. Sin embargo su mecanismo de acción aún está por ser establecido.

Tau es una proteína importante del citoesqueleto neuronal debido a que controla la polimerización y participa por tanto en la estabilización de los microtúbulos. Está sujeta a una gran regulación postraduccional que incluye la fosforilación por parte de cinasas y fosfatasas (Song *et al*; 2013) y la glicosilación, entre otras (Morris, Maeda, Vossel, y Mucke, 2011). El balance entre la fosforilación y desfosforilación son claves para modular su función estabilizadora (Wang *et al*; 2010).

Tau está asociada a problemas neurodegenerativos. Se ha encontrado que la isquemia cerebral induce a la hiperfosforilación de Tau promoviendo así la despolimerización e inestabilidad de los microtúbulos, lo cual podría afectar gravemente el transporte axonal, desestabilizar el citoesqueleto neuronal y probablemente contribuir al proceso de apoptosis inducido por la isquemia.

En este proyecto se evalúa si el tratamiento de la isquemia cerebral focal con glucosamina en el modelo animal rata Wistar, altera los niveles de expresión y fosforilación de la proteína Tau. Para ello se comparan los niveles de expresión y fosforilación de Tau en ratas Wistar a diferentes tiempos después de la isquemia cerebral focal, con y sin tratamiento con glucosamina. Esto con el fin de aportar al desarrollo de la hipótesis de que la proteína Tau está involucrada en el proceso de neuroprotección y por tanto a la elucidación del mecanismo celular mediante el cual actúa la glucosamina como agente neuroprotector.

Los niveles de expresión y fosforilación de Tau se obtuvieron mediante Western Blot; las muestras correspondieron al homogenizado de corteza cerebral frontoparietal de ratas Wistar sometidas a diferentes tratamientos. Las bandas obtenidas, fueron analizadas mediante densitometría empleando el programa *ImageJ*. El análisis estadístico se realizó por medio del análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba t-student para 2 colas; se trabajó con un $p < 0,05$

para determinar las diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. Los datos que no cumplieron el supuesto de normalidad para realizar el ANOVA se analizaron mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis.

2. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO

2.1. Planteamiento y justificación del problema

Cerca del 87% de todos los casos de ACV reportados mundialmente corresponden a isquemias (AHA en Feng et al., 2011).

Hasta el momento sólo existe una terapia farmacológica aprobada para el tratamiento del accidente cerebrovascular isquémico agudo correspondiente a la administración de un agente trombolítico, el activador del plasminógeno tisular recombinante (Kwon y Rha, 2013), el cual es efectivo y seguro dentro de las 3-4.5 horas posteriores a la aparición de los síntomas (Hacke *et al*; 2008). Por ello es importante y necesaria la realización de estudios que contribuyan a la identificación de nuevos agentes, como los neuroprotectores, que puedan ser específicos y efectivos, con el fin de poder implementarlos a futuro y contribuir al mejoramiento de la salud pública.

Este proyecto busca conocer si se presentan cambios en los niveles de expresión y/o fosforilación de la proteína Tau cuando se administra glucosamina a las ratas Wistar como tratamiento para la isquemia cerebral. Esto se realiza con el fin de proveer mayor conocimiento sobre el comportamiento de Tau, y aportar al desarrollo de la siguiente hipótesis: **¿Está la proteína Tau involucrada en el proceso de neuroprotección que ejerce la glucosamina?**

La hipótesis se basa en que Tau estabiliza los microtúbulos que permiten el crecimiento o estructuración de axones y dendritas, y el transporte intraneuronal, funciones vitales para la supervivencia neuronal. Y en el efecto neuroprotector que reportan de la glucosamina estudios publicados y resultados propios del grupo de investigación de Fisiología Animal de la Universidad ICESI.

2.2. Marco teórico y estado del arte

La isquemia cerebral se define como una reducción del flujo sanguíneo que impide mantener el metabolismo y funcionamiento normal de las células cerebrales (Torregrosa *et al.*, 2008). Si la reducción ocurre en la mayor parte o totalidad del cerebro, se denomina isquemia cerebral global; si es en una región específica, isquemia cerebral focal; e isquemia cerebral multifocal, si la reducción no presenta un patrón específico (Traystman, 2003).

Fisiopatología de la isquemia cerebral focal

Después de ocurrida una isquemia cerebral focal, se observan dos regiones importantes: núcleo isquémico y penumbra isquémica. La primera, corresponde a la zona donde el tejido cerebral sufre la reducción más dramática del flujo de sangre, que ocasiona la muerte celular necrótica, razón por la cual también se denomina, núcleo necrótico (Broughton, Reutens, y Sobey, 2009). Se encuentra rodeado por una zona menos afectada, la penumbra isquémica, un área de tejido cerebral que pese a estar dañada no muere (Lo, 2008), y sigue siendo metabólicamente activa. Sin embargo, muchas de las neuronas situadas en esta área pueden sufrir apoptosis o muerte celular programada, después de varias horas o días (Broughton *et al.*, 2009). Por tanto se concluye que en una isquemia cerebral, la muerte celular puede suceder de dos maneras, por necrosis o apoptosis (Arango, Escobar, Cardona, y Pimienta, 2004).

Son numerosas las investigaciones que se han realizado respecto al área de penumbra como también se le denomina, debido a que es una región que puede ser tratada farmacológicamente, con el fin de aumentar la sobrevivencia del tejido comprometido y evitar la progresión del infarto. El infarto cerebral, se define como un área de necrosis que se desarrolla en el sitio donde ha ocurrido la isquemia (Arango *et al.*, 2004).

Fisiopatología molecular de la isquemia

La isquemia cerebral desencadena una serie de procesos moleculares que empiezan con la interrupción de la fosforilación oxidativa y por tanto con el déficit en la producción de trifosfato de adenosina (ATP por sus siglas en inglés) (Arango *et al.*, 2004). Como resultado de la alteración de la bomba de sodio-potasio ATPasa y otras bombas iónicas dependientes de energía, se genera una interrupción en los gradientes iónicos transmembranales; aumenta la entrada de sodio, cloro, calcio y agua al citoplasma (Hansen, en Arango *et al.*, 2004) y además sale potasio (Blank y Kirshner, en Arango *et al.*, 2004). Como consecuencia de ello, las neuronas y las células gliales se despolarizan (Hansen, en Arango *et al.*, 2004).

Estos cambios producen un incremento de glutamato, una hiperexcitación de los receptores glutamatérgicos de N-metil-D-aspartato (NMDA) ionotróficos y metabotróficos, y de los receptores del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), los cuales aumentan aún más la concentración de calcio intracelular, contribuyendo a la iniciación del daño (Arango *et al.*, 2004).

Durante la isquemia cerebral también se generan radicales libres como el óxido de nitrógeno o monóxido de nitrógeno (NO), ya sea debido a la síntesis y activación de las enzimas NO sintasa inducible (iNOS), de la cicloxigenasa-2 (COX-2) (Nogawa, Zhang, Ross y Iadecola, 1997) o de la NO sintasa neuronal (nNOS) (Grandati *et al.*, 1997); se activan y expresan genes como respuesta al daño, por ejemplo, genes relacionados con la apoptosis o con factores de crecimiento; y se liberan citosinas (Arango *et al.*, 2004).

Glucosamina

La glucosamina (2-amino-2-deoxi-D-glucosa; GlcN), se sintetiza a partir de la glucosa; es un azúcar natural, producto principal de la ruta biosintética de las hexosaminas; componente esencial de glicoproteínas y proteoglicanos; y sustrato de dos precursores glicoprotéicos importantes: UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNac) y UDP-N-acetilgalactosamina (UDP-GalNac) (Hwang *et al.*, 2010).

La glucosamina se encuentra disponible comercialmente y se utiliza en el tratamiento de la artritis (Hwang, *et al.*, 2010). Pese a las constantes investigaciones, su eficacia clínica aún no ha podido esclarecerse, debido a que variables importantes como: la formulación, el tiempo de uso, la medición del efecto obtenido en los pacientes, entre otras, no están uniformadas o normalizadas, lo cual influye en los resultados obtenidos, y por tanto no es factible realizar una comparación entre los estudios. Sin embargo la mayoría de estos, se encuentran a favor de la efectividad de la glucosamina (Salazar *et al.*, 2014).

Se conoce que la glucosamina ejerce un efecto neuroprotector al reducir la formación del infarto en el cerebro postisquémico hasta 3 horas después de la perfusión. También, suprime la activación microglial y/o acumulación de macrófagos, y la inducción del mRNA de las moléculas inflamatorias (IL-1 β , TNF- α , iNOS y COX-2) en el cerebro postisquémico. Lo anterior indica que la glucosamina actúa retrasando los procesos de daño en el cerebro después de ocurrida la isquemia (Hwang *et al.*, 2010). Resultados aún no publicados del grupo de investigación de la Universidad ICESI, también confirman el efecto neuroprotector de la glucosamina, al reducir a la mitad el tamaño del infarto en el modelo de isquemia cerebral focal en ratas Wistar después de la administración de 200 mg/Kg de este compuesto (*Anexo 1*).

También se ha reportado que la glucosamina ejerce efectos citoprotectores al aumentar la glicosilación de proteínas cardíacas (Liu *et al.*, 2006). Además, estudios realizados en cultivos celulares evidencian que cuando se bloquea tanto la vía de la glucólisis como la vía biosintética de las hexosaminas, disminuye la supervivencia de las células (Zachara *et al.*, 2004) (*Anexo 2*).

La glucosamina reduce el tamaño del infarto cerebral en un modelo animal, lo cual sugiere su posible uso como neuroprotector; además puede administrarse por vía oral a seres humanos de forma segura, pues presenta poca o nula toxicidad. Pese a que su uso crónico se ha asociado a resistencia a la insulina en varios modelos, en condiciones de estrés agudo puede proveer citoprotección al aumentar transitoriamente los niveles de glicosilación.

Fosforilación y glicosilación

La fosforilación es uno de los mecanismos postraduccionales mediante el cual se puede regular la actividad de las proteínas. Consiste en la adición o eliminación de un grupo fosfato proveniente del ATP al grupo hidroxilo de una serina, treonina o tirosina de la cadena lateral de la proteína. Las cinasas y fosfatasas, son las enzimas que catalizan la adición o la eliminación respectivamente; las células contienen muchas cinasas y fosfatasas, algunas más específicas que otras (Bruce, Bray, Hopkin, Johnson, y Lewis, 2011).

Un tipo particular de glicosilación llamado O-GlcNAcilación es similar a la fosforilación. Difiere en el grupo químico que se adiciona o elimina de la proteína, en este caso corresponde al monosacárido β -N-Acetilglucosamina (O-GlcNAC). Las enzimas que participan en este mecanismo son: O- β -N-acetilglucosaminiltransferasa (OGT), que cataliza la adición de O-GlcNAC a las proteínas y β -N-acetilglucosaminidasa (O-GlcNAcase), que ejerce la función contraria (Butkinaree, Park, y Hart, 2010).

Se ha reportado que las células termotolerantes presentan incrementos en los niveles de O-GlcNAC, y que los decrecimientos hacen que las células sean más sensibles al estrés (Butkinaree *et al.*, 2010). Lo cual sugiere que la O-GlcNAcilación ejerce un papel importante en la sobrevivencia de las células. (Butkinaree *et al.*, 2010; Groves, Lee, Yildirim, y Zachara, 2013).

La O-GlcNAcilación de muchas proteínas del citoesqueleto se reduce cuando se activan proteínas cinasas (PKC y PKA), y cuando se inactiva PKC aumenta la O-GlcNAcilación (Griffith y Schmitz, 1999). Aunque este comportamiento competitivo entre estas dos modificaciones postraduccionales no siempre se observa en todos los residuos fosforilados, pues también hay evidencias de que un incremento en la O-GlcNAcilación, conlleva a un aumento en los niveles de fosforilación en algunos residuos (Butkinaree *et al.*, 2010; Groves *et al.*, 2013). Por esta razón se concluye que la relación que se establece entre estos dos mecanismos es complicada, va

más allá de la simple competencia por unos residuos específicos, y es particular a la proteína que se esté estudiando (Wang, Pandey, y Hart, 2007).

Citoesqueleto y microtúbulos

El citoesqueleto es una estructura celular dinámica y adaptativa, compuesta por una red de diversos polímeros y proteínas en constante movimiento. Los polímeros del citoesqueleto son tres: los filamentos de actina, microtúbulos y microfilamentos. Gracias a estos, la célula presenta una forma y organización específica, cierta resistencia mecánica, y dependiendo de la necesidad celular, le permiten moverse o cambiar un poco su forma (Fletcher y Mullins, 2010).

Los microtúbulos se caracterizan por ser de los tres polímeros el de estructura más rígida (Fletcher y Mullins, 2010), están formados por α - y β -tubulinas (Berg, Tymoczko, y Stryer, 2002), presentan la capacidad de polimerizarse y despolimerizarse fácilmente y se encuentran polarizados (Fletcher y Mullins, 2010). Una de sus funciones corresponde al transporte intracelular, en el cual participan las proteínas motoras llamadas: dineínas citoplásmicas y quinesinas, que se mueven a lo largo de los microtúbulos y, transportan organelos y vesículas entre el centro de la célula y la periferia. Las dineínas ciliares, se encargan del movimiento de cilios y flagelos (Berg *et al.*, 2002).

Los microtúbulos presentan un papel muy importante en el crecimiento de axones y dendritas, hacen parte del andamiaje celular, participan en la diferenciación neuronal y son vitales para el mantenimiento de las neuronas (Ori-McKenney, Jan, y Jan, 2012). Durante la isquemia, los microtúbulos se desarman, lo cual puede conllevar a la muerte neuronal. Sin embargo aún hay varios aspectos sobre el comportamiento de los microtúbulos en las neuronas que no han podido ser esclarecidos.

Proteína TAU

Tau es una proteína asociada a microtúbulos (MAP por sus siglas en inglés), que se expresa abundantemente en el soma y los axones (Wen, Yang, Liu, y Simpkins, 2004), controla la polimerización y por tanto la estabilidad de los microtúbulos; y además es extremadamente estable al calor (Weingarten, Lockwood, Hwo, y Kirschner, 1975).

Tau también se ha observado en el núcleo neuronal y no neuronal, y aunque su función en este sitio aún no se ha elucidado del todo, hace poco encontraron que es capaz de proteger al ADN neuronal del daño inducido por el estrés por calor (Sultan *et al.*, 2011).

Se conoce que Tau puede sufrir modificaciones postraduccionales como: fosforilación, acetilación, glicación, isomerización, nitración, O-GlcNAcilación y ubiquitinación (Morris, Maeda, Vossel, y Mucke, 2011). Son varias las cinasas involucradas en la fosforilación de la proteína Tau y varios los sitios que pueden ser fosforilados (Buee, Bussiere, Buée-Scherrer, Delacourte, Hof, 2000). Numerosos estudios han identificado que las principales proteínas reguladoras, incluidas las Tau fosfatasas, se encuentran en el cerebro (Gong e Iqbal, 2008).

En el cerebro de un hombre adulto existen seis isoformas de la proteína Tau (Gong e Iqbal, 2008). La isoforma más larga está constituida por 441 amino ácidos (Biernat *et al*; Schneider *et al* en, Mailliot *et al.*, 2000) y presenta como potenciales sitios de fosforilación, un total de 79 serinas y treoninas. La fosforilación en 30 de estos sitios ya ha sido reportada (Buee *et al*, en Wen *et al.*, 2007); sin embargo, la importancia de cada uno de ellos sigue siendo controversial (Wen *et al.*, 2004).

Regulación de la fosforilación de Tau

La fosforilación de Tau está regulada por varias proteínas cinasas y fosfatasas (Song *et al.*, 2013). La glucógeno sintasa cinasa-3 β (GSK-3 β por sus siglas en inglés), también llamada proteína Tau cinasa-1 (Martin, Magnaudeix, Esclaire, Yardin, y Terro, 2009), es una de las principales proteínas cinasas que regulan la fosforilación de Tau (Leroy *et al*, en Guadagna, Esiri, Williams, y Francis, 2012), y es la más conocida (Martin *et al.*, 2009). Se ha encontrado que la actividad de GSK-3 β incrementa cuando se reduce su fosforilación, generando un aumento en la fosforilación de Tau (Baum *et al*, en Guadagna *et al.*, 2012).

Debido a que la proteína GSK-3 β es pro-apoptótica (Chuang, Wang, y Chiu, 2011), y participa en la fosforilación de Tau, se sugiere que su inhibición reduce el daño isquémico cerebral y por tanto estaría contribuyendo al proceso de neuroprotección (Valerio *et al.*, 2011). Sin embargo, un estudio en ratas sometidas a isquemia cerebral (Song *et al.*, 2013) demuestra que “no es obligatoria la activación de GSK-3 β para que Tau se hiperfosforile”.

La proteína fosfatasa 2A (PP2A) es la proteína fosfatasa más importante en la regulación de Tau. Su actividad con respecto a las otras Tau fosfatasas existentes en el cerebro humano corresponde al 71% aproximadamente (Liu, Grundke, Iqbal, y Gong, 2005). Se ha encontrado también, que PP2A es capaz de desfosforilar a Tau en diversos sitios: Ser199, Ser202, Thr205, Thr212, Ser214, Ser235, Ser262, Ser396, Ser404 y Ser409, pero con diferentes eficiencias (Liu *et al.*, 2005).

Por último, se ha reportado que las proteínas GSK-3 β y PP2A presentan vías de señalización interconectadas (Martin, Page y Terro, 2011), y que la interacción de Tau con GSK-3 β y PP2A se ve alterada durante la isquemia cerebral (Song *et al.*, 2013).

Tau e isquemia cerebral

Los resultados de un estudio (Wen *et al.*, 2004) permitieron concluir que la isquemia cerebral induce a la hiperfosforilación de la proteína Tau. También lograron detectar un incremento en la actividad de Tau-kinasa en una de las regiones isquémicas del cerebro. Además, sugieren que la hiperfosforilación de Tau es consecuencia de la activación e inactivación de una variedad de fosfatasas y cinasas debido a daños causados durante la isquemia.

Esta hiperfosforilación de la proteína Tau, puede causar una disminución de su afinidad por los microtúbulos y promover la despolimerización de estos, lo cual podría afectar gravemente el transporte axonal, desestabilizar el citoesqueleto neuronal y probablemente contribuir al proceso de apoptosis inducido por la isquemia (Wen *et al.*, 2004). Varios estudios sugieren también que “la fosforilación de Tau contribuye a la muerte neuronal después de ocurrida la isquemia cerebral” (Idan-Feldman, Ostritsky y Gozes, en Dong *et al.*, 2014). Es debido a estas razones, que se encuentra en numerosas investigaciones que la proteína Tau está asociada a problemas neurodegenerativos.

2.3. Objetivos

2.3.1 Objetivo general

Evaluar si el tratamiento de la isquemia cerebral focal con glucosamina en el modelo animal rata Wistar, altera los niveles de expresión y fosforilación de la proteína Tau.

2.3.2 Objetivos específicos

1. Comparar los niveles de expresión de la proteína Tau en ratas Wistar a diferentes tiempos después de la isquemia cerebral focal, con y sin tratamiento con glucosamina.
2. Comparar los niveles de fosforilación de la proteína Tau en ratas Wistar a diferentes tiempos después de la isquemia cerebral focal, con y sin tratamiento con glucosamina.

2.4. Metodología Utilizada

2.4.1 Animales experimentales

El estudio se llevó a cabo en ratas albinas correspondientes a la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*) procedentes del Bioterio de la Universidad ICESI, donde estuvieron sometidas a períodos alternos de luz y oscuridad de 12 horas, temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con comida y agua *ad libitum*; se encontraban en jaulas individuales y las camas con viruta se cambiaban cada 48 horas. Las ratas fueron seleccionadas bajo las siguientes condiciones: machos, adultos (de 10 a 14 meses de edad), y peso entre 300 a 350 gramos (promedio 325 gramos).

2.4.2 Procedimiento quirúrgico

Administración de la glucosamina

La glucosamina fue administrada una hora antes de la isquemia cerebral por vía intraperitoneal a una concentración de 200 mg/Kg.

Oclusión de la Arteria Cerebral Media (MCAO por sus siglas en inglés)

El animal se anestesió por vía inhalatoria con isoflurano al 5% en oxígeno medicinal, posterior a uno-dos minutos la anestesia se mantuvo con una concentración entre el 2 y 3%. Para la oclusión de la arteria cerebral media derecha se empleó la técnica modificada de inserción de un filamento intraluminal recubierto de poli-L-lisina.

El primer paso de este procedimiento consistió en una incisión longitudinal en la línea media del cuello. La arteria carótida común (ACC) y la arteria carótida externa (ACE) fueron disecadas; las ramificaciones de esta última se ligaron con propileno 6/0, con el propósito de que la arteria carótida interna (ACI) fuera el único remanente de la ACC derecha, y para controlar el flujo retrógrado se utilizó un cordón de caucho alrededor de la ACI. El filamento de nylon de 3,5 cm de longitud, se introdujo por el extremo del fondo del saco de la ACE hasta una longitud de 1,95 cm donde se fijó con polipropileno 6/0. Posteriormente se cerró la herida quirúrgica aunque el filamento no fue retirado; permaneció hasta el momento de sacrificio correspondiente al establecido por cada grupo experimental.

Las funciones cardiorespiratorias, la temperatura rectal y la actividad electroencefalográfica, se monitorearon durante todo el procedimiento quirúrgico. La temperatura corporal se mantuvo alrededor de 37°C con una lámpara incandescente.

2.4.3 Obtención de las muestras

Como los dos objetivos específicos estaban encaminados al estudio del comportamiento de la proteína Tau a diferentes tiempos después de ocurrida la isquemia cerebral focal; se trabajó con muestras diferentes en cuanto a tiempo de isquemia y tratamiento, todas procedentes de los cerebros de las ratas Wistar, específicamente de la corteza frontoparietal derecha. La distribución de los grupos experimentales se observa en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Grupos experimentales de acuerdo con el tiempo de sacrificio después de la isquemia y aplicación de glucosamina.

| TIEMPO DESPUÉS DE LA ISQUEMIA | Control de cirugía (Sham) | | 15 Min | | 105 Min | | 6 Horas | | 36 Horas | |
|-------------------------------|---------------------------|---|--------|---|---------|---|---------|---|----------|---|
| TRATAMIENTO CON GLUCOSAMINA | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - |
| GRUPO | E | F | K | L | M | N | D | B | O | P |

Nota: El número de ratas Wistar por grupo fue mínimo cuatro.

2.4.4 Western blot

La metodología empleada para obtener los niveles de expresión y fosforilación de la proteína Tau se basó en la técnica de Western Blot. Los pasos desarrollados se llevaron a cabo teniendo en cuenta la guía de la casa comercial Abcam y el Procedimiento Operativo Estandarizado POE para la realización del Western Blot del laboratorio de Fisiología animal de la Universidad ICESI.

2.4.4.1 Primer paso: tratamiento de la muestra

El tejido nervioso se diseccionó y se puso en hielo para prevenir la degradación de las proteínas por acción de las proteasas. Posteriormente se colocó el tejido en un tubo Eppendorf, y se realizó la homogenización de la muestra empleando un homogenizador eléctrico. Previo a este proceso, se adicionó un buffer para lisis que permitió la liberación de las proteínas Tau que se encontraban en la corteza frontoparietal. Este buffer contenía inhibidores de proteasas y fosfatasa, con el fin de evitar la degradación y/o desfosforilación de las proteínas.

Finalmente se centrifugó la muestra por 20 minutos a 12000 rpm a 4°C en una microcentrífuga; el precipitado se desechó, el sobrenadante fue puesto en un tubo Eppendorf nuevo y almacenado a -80°C.

Debido a que se compararon los niveles de expresión y fosforilación de la proteína Tau, se debía asegurar que la concentración de proteínas presentes en los diferentes carriles de electroforesis fuera la misma y por lo tanto se midió la concentración de proteínas en los homogenizados de los diferentes tratamientos. Esto se realizó mediante el método colorimétrico Bradford; el cual se basa en el cambio de coloración que se presenta cuando el colorante azul de Coomassie interacciona con las proteínas.

Para ello se realizó una curva estándar, correspondiente a la absorbancia Vs la concentración de la proteína estándar Albúmina Sérica Bovina (BSA). La concentración del stock utilizado fue de 0,125 µg/µL y las diluciones se prepararon con buffer fosfato salino 1X (PBS por sus siglas en inglés), ver *tabla 2* y *gráfica 1*. La cantidad de proteínas presente en el homogenizado de corteza de cada grupo experimental, se determinó a partir de la ecuación de la recta obtenida en la curva estándar y las absorbancias correspondientes a cada uno, ver *tabla 5* y *anexo 3*.

Las lecturas se realizaron en el lector de microplacas Synergy H1, 25 minutos después de adicionar el reactivo de Bradford.

- **Curva de estandarización**

Tabla 2. Preparación de las diluciones para la realización de la curva estándar.

| Concentración (µg/mL) | Volumen stock BSA (µL) | Volumen PBS 1X (µL) | Volumen reactivo Bradford (µL) |
|------------------------------|-------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| 1 | 8 | 792 | 200 |
| 2 | 16 | 784 | 200 |
| 3 | 24 | 776 | 200 |
| 5 | 40 | 760 | 200 |
| 7 | 56 | 744 | 200 |
| 8 | 80 | 720 | 200 |

Tabla 3. Concentraciones de BSA obtenidas por el lector de microplacas para realización de la curva estándar.

| Estándar (µg/mL) | Repetición 1 (µg/mL) | Repetición 2 (µg/mL) | Repetición 3 (µg/mL) | Promedio (µg/mL) |
|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 1 | 0,424 | 0,434 | 0,438 | 0,432 |
| 2 | 0,471 | 0,474 | 0,481 | 0,475 |
| 3 | 0,506 | 0,518 | 0,505 | 0,510 |
| 5 | 0,573 | 0,593 | 0,591 | 0,586 |
| 7 | 0,673 | 0,636 | 0,638 | 0,649 |
| 8 | 0,724 | 0,745 | 0,753 | 0,741 |

Tabla 4. Absorbancias a 595 nm obtenidas por el lector de microplacas para realización de la curva estándar.

| Estándar (µg/mL) | Repetición 1 | Repetición 2 | Repetición 3 | Promedio |
|-------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------|
| 1 | <0,550 | 0,821 | 0,941 | 0,881 |
| 2 | 1,919 | 1,992 | 2,197 | 2,036 |
| 3 | 2,938 | 3,295 | 2,888 | 3,040 |
| 5 | 4,884 | 5,461 | 5,402 | 5,249 |
| 7 | 7,808 | 6,725 | 6,798 | 7,110 |
| 8 | 9,315 | 9,930 | 10,164 | 9,803 |

Gráfica 1. Curva estándar para la determinación de la concentración de proteínas.

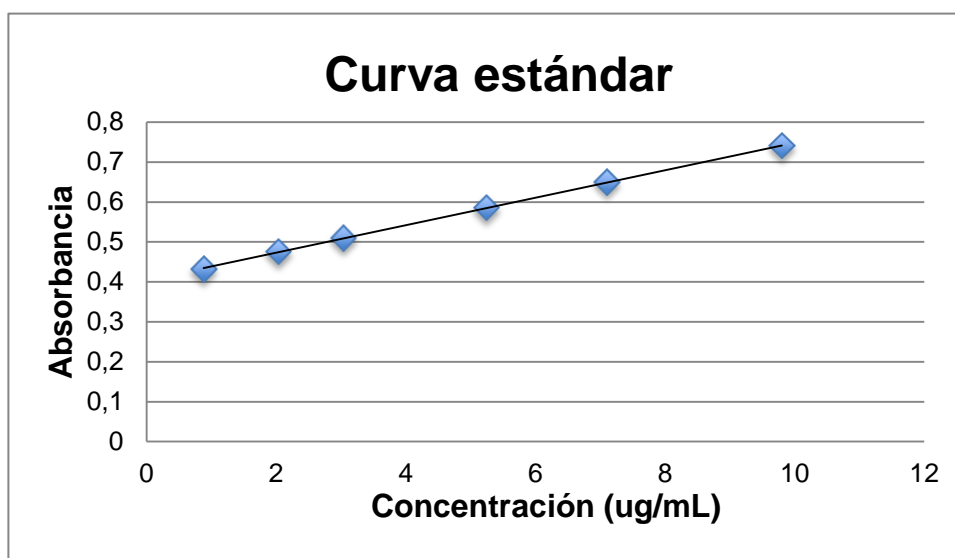


Tabla 5. Absorbancias a 595 nm obtenidas por el lector de microplacas y concentración de proteínas de cada grupo experimental calculadas a partir de la curva estándar.

| Grupo experimental | Absorbancia a 595 nm | Concentración de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) | Concentración de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) |
|--------------------|----------------------|---|---|
| F | 0,162 | 4,333 | 8667 |
| L | 0,206 | 5,620 | 11240 |
| N | 0,236 | 6,497 | 12994 |
| B | 0,173 | 4,655 | 9310 |
| P | 0,186 | 5,035 | 10070 |
| E | 0,176 | 4,742 | 9485 |
| K | 0,162 | 4,333 | 8667 |
| M | 0,342 | 9,596 | 19193 |
| D | 0,165 | 4,421 | 8842 |
| O | 0,340 | 9,538 | 19076 |

Para la lectura de las absorbancias de cada grupo experimental, la preparación de las muestras fue la siguiente: se tomó 1 μL del homogenizado de corteza y se diluyó en 1000 μL de PBS 1X, posteriormente se tomaron 500 μL de la dilución anterior y se diluyeron en 300 μL de PBS 1X y 200 μL del reactivo de Bradford; la dilución final fue 1 en 2000.

Debido a que los anticuerpos utilizados reconocen un fragmento o epítipo de la proteína Tau en su forma desnaturalizada, previo a la carga se adicionó a cada muestra el buffer de carga Laemmli 2X que contiene 4% de dodecil sulfato de sodio (SDS), detergente aniónico desnaturalizante, 10% de 2-mercaptoetanol, 20% de glicerol, 0,004% de azul de bromofenol y 0,125M Tris HCl. En la *Tabla 6* se observa la composición de cada muestra a servir. Los cálculos realizados para determinar el volumen de muestra se encuentran en el *anexo 4*.

Tabla 6. Composición muestra para servir en los pozos del gel.

| Grupo experimental | F | L | N | B | P | E | K | M | D | O |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Volumen muestra (μL) | 3,462 | 2,669 | 2,309 | 3,222 | 2,979 | 3,136 | 3,462 | 1,563 | 3,393 | 1,573 |
| Volumen Buffer Laemmli 2X (μL) | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Volumen agua (μL) | 6,538 | 7,331 | 7,691 | 6,778 | 7,021 | 6,837 | 6,538 | 8,437 | 6,607 | 8,427 |
| Volumen total (μL) | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |

Nota: El volumen de muestra garantizó que se sirvieran 30 μg de proteína en cada pozo.

Posteriormente, las muestras se calentaron a 95°C durante 5 minutos y se centrifugaron aproximadamente en 30 segundos para luego servir las en los pozos.

2.4.4.2 Segundo paso: electroforesis en gel

Esta técnica permite separar las proteínas de acuerdo a su peso molecular. Mediante una pipeta, se tomaron las muestras de los distintos grupos experimentales y se ubicaron en 10 de los 12 pozos del gel de poliacrilamida al 8% preparado en el laboratorio. Los otros 2 pozos fueron ocupados con el marcador de peso molecular Broad Range protein marker comercializado por Santa Cruz, que permite determinar el tamaño de las proteínas presentes en la muestra y por tanto localizar a Tau. El orden de siembra de las muestras en el gel y la composición de este se resumen en las tablas 7 y 8 respectivamente.

Tabla 7. Siembra de las muestras en el gel de poliacrilamida al 8%.

| POZO | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------------------------------------|----|---|---|---|---|---|----|---|---|----|----|----|
| MUESTRA (grupo experimental) | MP | F | L | N | B | P | MP | E | K | M | D | O |

Tabla 8. Composición gel poliacrilamida al 8% por duplicado.

| COMPONENTES | RUNNING GEL | STACKING GEL |
|-----------------------------|-------------|--------------|
| Agua destilada | 11,5 mL | 4,1 mL |
| Mezcla de acrilamida al 30% | 6,7 mL | 1,0 mL |
| Tris 1,5M pH 8,8 | 6,3 mL | |
| Tris 1,5 M pH 6,7 | | 750 µL |
| SDS al 10% | 250 µL | 60 µL |
| Persulfato de amonio al 10% | 250 µL | 60 µL |
| TEMED | 15 µL | 6 µL |
| VOLUMEN FINAL | 25,015 mL | 5.976 mL |

Posteriormente el gel se sometió a un campo eléctrico el cual generó la migración de las proteínas. El tiempo de corrida de la electroforesis fue de 1 hora 45 minutos a 0,120 Amperios.

2.4.4.3 Tercer paso: transferencia y marcaje de proteínas

- **Transferencia**

El proceso de transferencia consiste en el paso de las proteínas del gel a una membrana, mediante la acción de un campo eléctrico. Para este estudio se utilizaron membranas de PDVF (polifluoruro de vinilideno o fluoruro de polivinilideno) las cuales se activaron previamente a su uso en metanol durante un minuto.

El gel y la membrana se ubicaron de la siguiente manera: esponja/papel filtro/gel/membrana PDVF activada/papel filtro/esponja, formando así el denominado Sandwich; este se puso dentro de un cassette que fue ubicado posteriormente en la cámara de transferencia que luego sería sometida a un campo eléctrico. Es importante especificar que la membrana se ubicó cerca al electrodo positivo y el gel al electrodo negativo.

La transferencia se llevó a cabo en condiciones húmedas y en frío, ya que durante este proceso, el buffer empleado se calienta y puede alterar el paso de las proteínas. A mayor temperatura menor eficiencia de la transferencia. El tiempo fue de 2 horas y 15 minutos a 0,60 Amperios.

- **Bloqueo de la membrana**

Después de la transferencia, se realizó el bloqueo de la membrana con el fin de evitar la unión inespecífica de los anticuerpos primarios y secundarios a esta. Para ello, se incubó la membrana con la solución de bloqueo Tris-Buffer Salino y Tween 20 (TBST) más Álbmina de Suero Bovino (BSA por sus siglas en inglés) al 3% por una hora a temperatura ambiente y bajo agitación constante; se utilizó como equipo un shaker con velocidad de agitación de 13 y ángulo de 15°.

- **Incubación de la membrana**

Posteriormente se retiró la solución de bloqueo y se incubó con el anticuerpo primario monoclonal durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se retiró este y se realizaron 5 lavados con el buffer TBST 1X durante 5 minutos cada uno, bajo agitación constante y ángulo de 15°. La membrana se incubó luego con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación constante y ángulo de 15°; éste fue desechado y para remover los residuos se lavó la membrana 5 veces con TBST 1X , el tiempo por lavado fue de 5 minutos cada uno.

- **Revelado**

El proceso de revelado se llevó a cabo en el cuarto oscuro empleando el método quimioluminiscente. Para ello se utilizó un kit de quimioluminiscencia marca Thermo Scientific, compuesto por dos soluciones: peróxido de hidrógeno y luminol.

La membrana se incubó con la mezcla de estas dos soluciones correspondiente a un volumen total de 4 mL (2 mL de cada solución), el tiempo de incubación fue de 5 minutos. Como el anticuerpo secundario estaba conjugado o marcado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés), esta en presencia de peróxido de hidrógeno catalizó la oxidación del luminol, generando luz.

Después se expuso la membrana a la película fotográfica y esta última fue colocada en la máquina de revelado. El resultado fue una película donde se observaron las bandas correspondientes Tau.

- **Stripping**

Stripping es un término que se utiliza para describir la remoción o eliminación de los reactivos de quimioluminiscencia y anticuerpos primarios y secundarios de una membrana de Western Blot. Este proceso se realizó de la siguiente manera:

1. Un lavado con TBST 1X por 5 minutos y posterior retiro de la solución.
2. Tres lavados con solución de stripping por 10 minutos cada uno. Para cada lavado se utilizó solución nueva.
3. Un lavado con PBS 1X por 10 minutos.
4. Un lavado con TBST 1X por 10 minutos.

Nota: El volumen adicionado tanto de TBST 1X como de solución de stripping y PBS 1X, fue la cantidad suficiente para cubrir completamente la membrana. Todos los lavados se realizaron a temperatura ambiente y bajo agitación constante con un ángulo de 15°.

Debido a que la membrana se utilizó nuevamente para determinar la presencia de la Tau fosforilada en dos de sus residuos de serina, se realizó nuevamente el bloqueo de la membrana para posteriormente incubar con el correspondiente anticuerpo primario.

2.4.5 Anticuerpos

Tabla 9. Anticuerpos utilizados en el Western Blot.

| Anticuerpo primario | Proporción | Anticuerpo secundario | Proporción |
|---------------------|------------|-----------------------|------------|
| Tau total | 1:500 | Anti-cabra IgG | 1:20000 |
| p-Tau ser 214 | 1:500 | Anti-conejo IgG | 1:3000 |
| p-Tau ser 396 | 1:500 | Anti-conejo IgG | 1:3000 |
| β -actina | 1:500 | Anti-ratón IgG | 1:3000 |

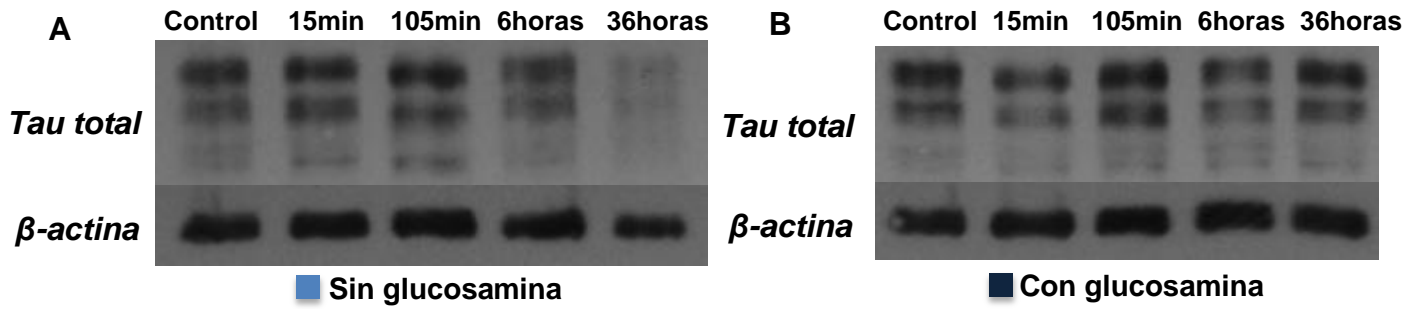
2.4.6 Densitometría y análisis estadístico

Una vez obtenida la película, las bandas se analizaron mediante densitometría, empleando el programa *ImageJ* desarrollado por el Instituto Nacional de Salud (NIH) en Estados Unidos. Se trabajó con una imagen de 8 bits.

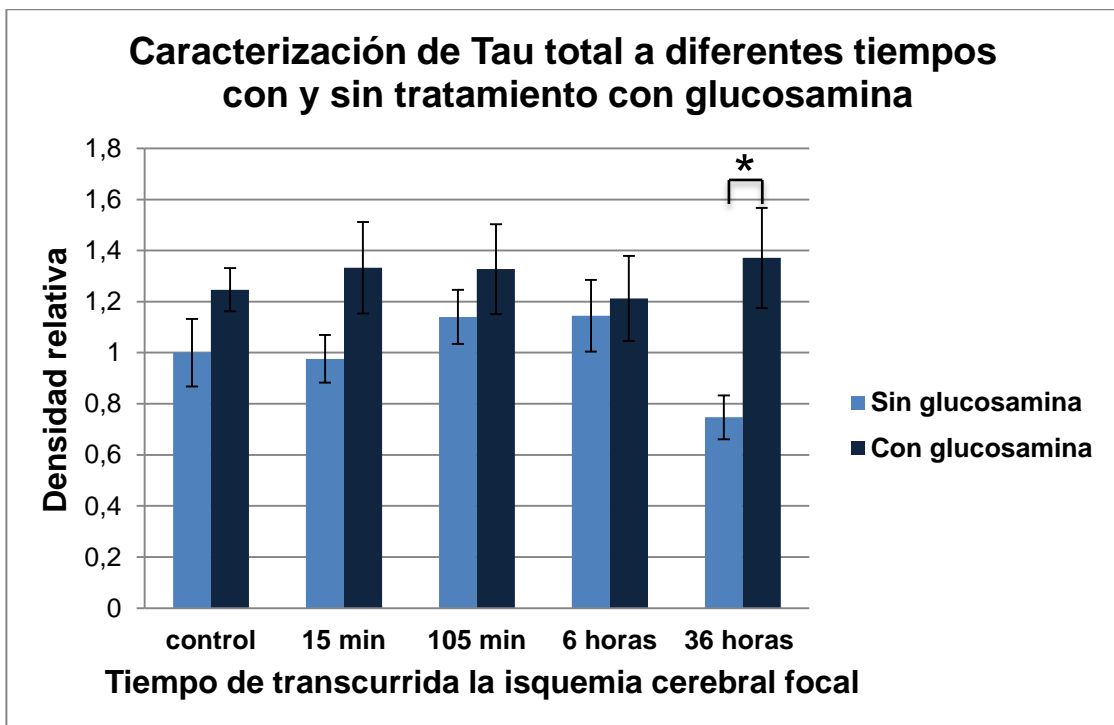
Los datos obtenidos por este programa para los diferentes grupos experimentales, se analizaron por medio del análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba t-student para 2 colas. Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas se determinaron mediante las pruebas Kolmogorov, y Bartlett y Levene respectivamente. Los datos que no cumplieron con el supuesto de normalidad para realizar el ANOVA fueron analizados mediante la prueba no paramétrica de kruskal Wallis seguido de la prueba Tukey. Para determinar las diferencias significativas entre los diferentes tratamientos se trabajó con un $p < 0,05$.

Ver anexo 5. Matriz de marco lógico.

2.5. Resultados



C



D

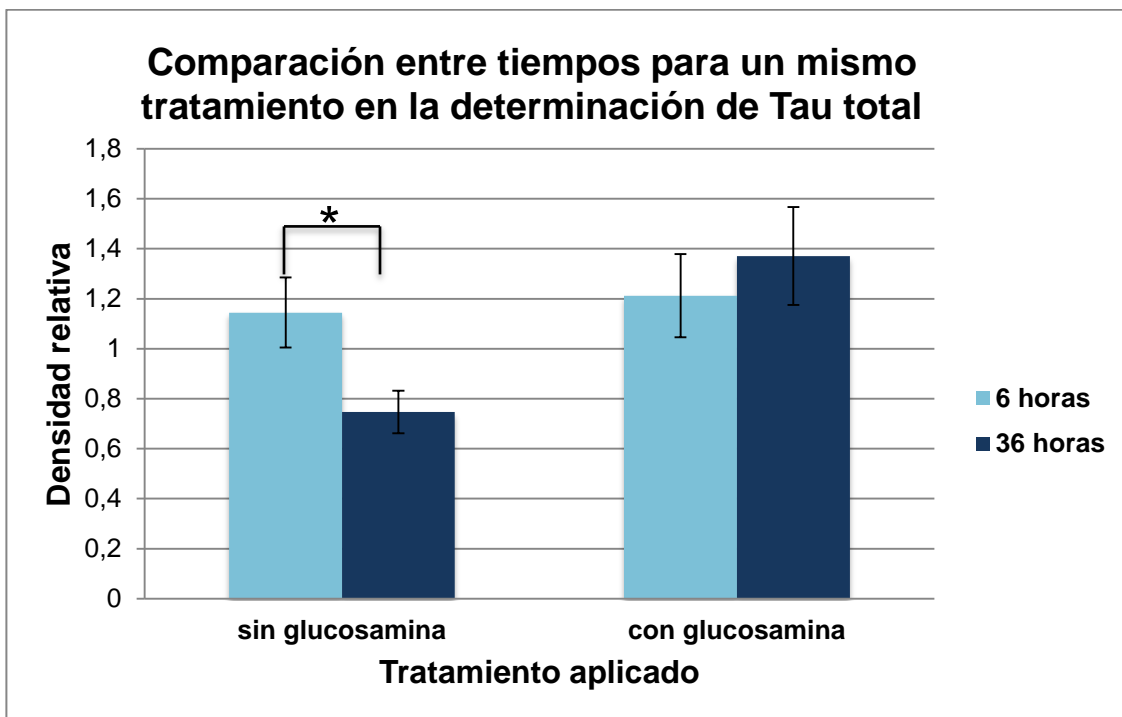
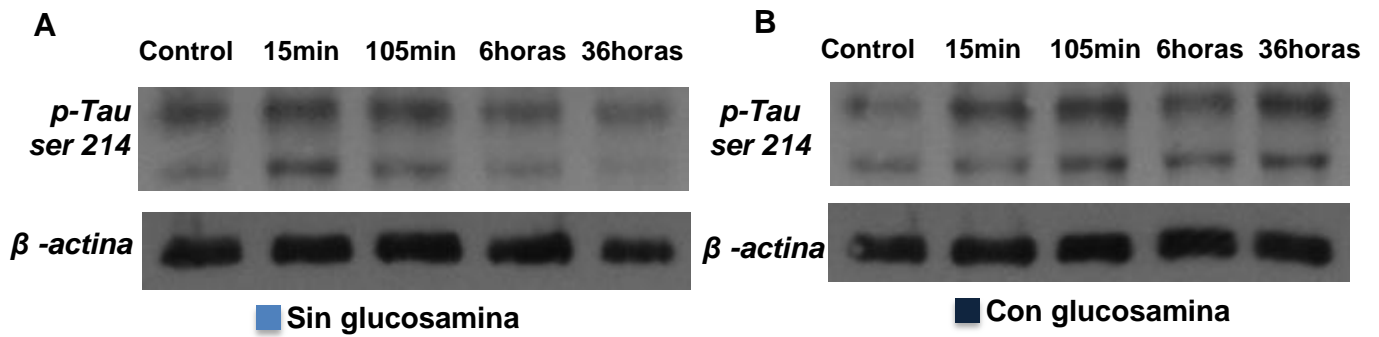
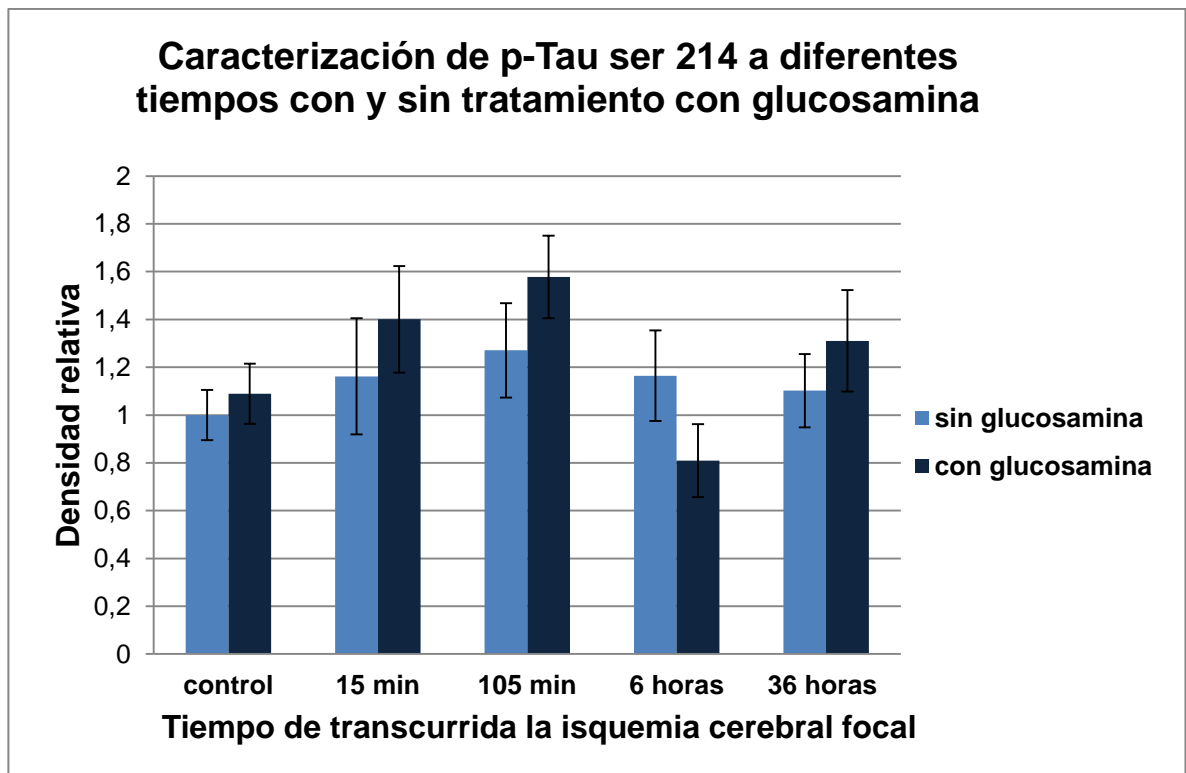


Figura 1. Niveles de expresión de la proteína Tau en la corteza frontoparietal de la rata Wistar durante la isquemia cerebral focal a través del tiempo, con y sin tratamiento con glucosamina. (A) Western Blot de los niveles de Tau total sin tratamiento con glucosamina y su control de carga β -actina. (B) Western Blot de los niveles de Tau total con tratamiento con glucosamina y su control de carga β -actina. (C) Comparación de los niveles de expresión de Tau total entre tratamientos a los diferentes tiempos. (D) Comparación de los niveles de expresión de Tau total entre 6 horas y 36 horas para un mismo tratamiento (media \pm EEM, n=8, *p<0,05 diferencia significativa en la prueba t-student).

De acuerdo con la prueba de Kruskal Wallis, existen diferencias significativas en los niveles de expresión de Tau entre los tratamientos con y sin glucosamina, pero no entre los diferentes tiempos de ocurrida la isquemia cerebral (mediana, nivel de significancia $\alpha=0,05$) (Anexo 6). Con la prueba t-student se encontró que el nivel de expresión de Tau a las 36 horas de ocurrida la isquemia cerebral, aumentó significativamente con el tratamiento con glucosamina (Figura 1C y Gráficas 4 y 5-Anexo 6), y disminuyó con respecto a las 6 horas sin el tratamiento con glucosamina (Figura 1D).



C



D

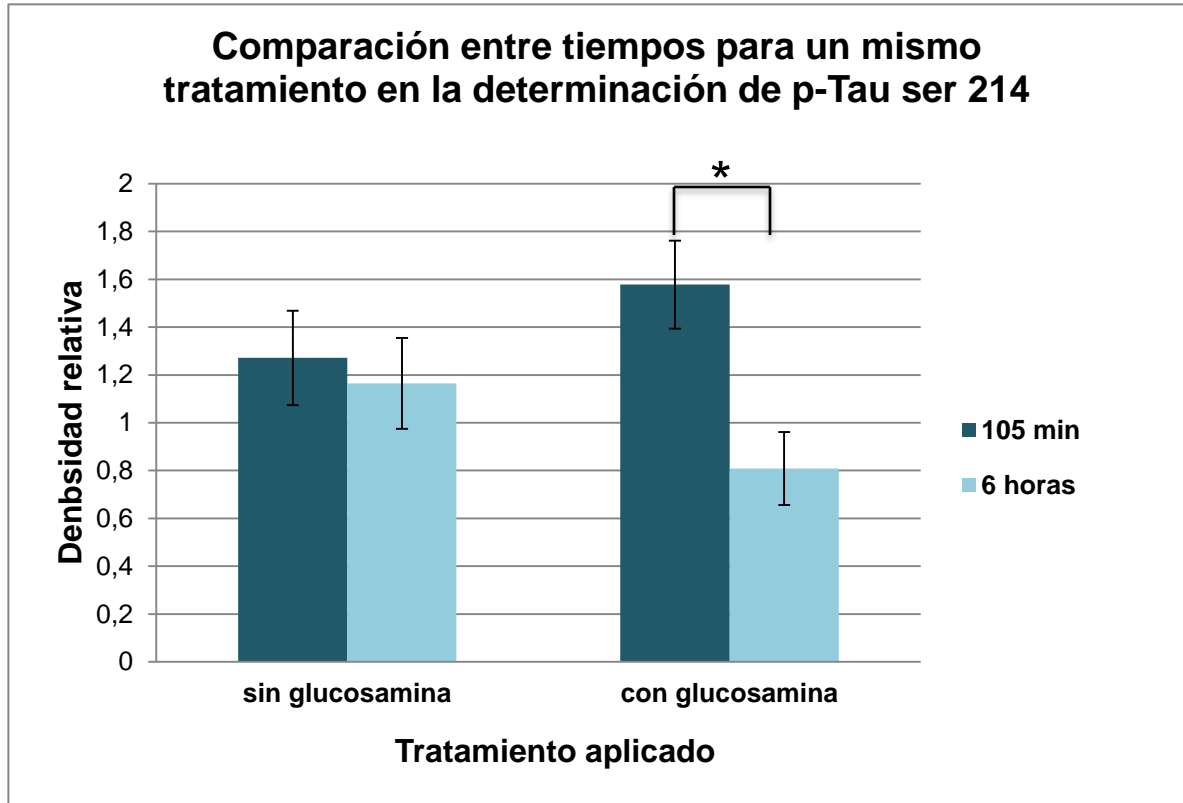
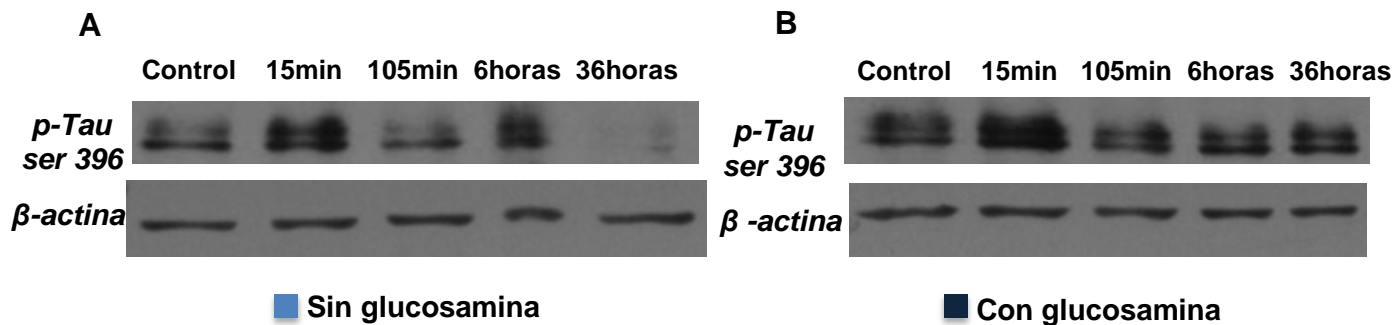
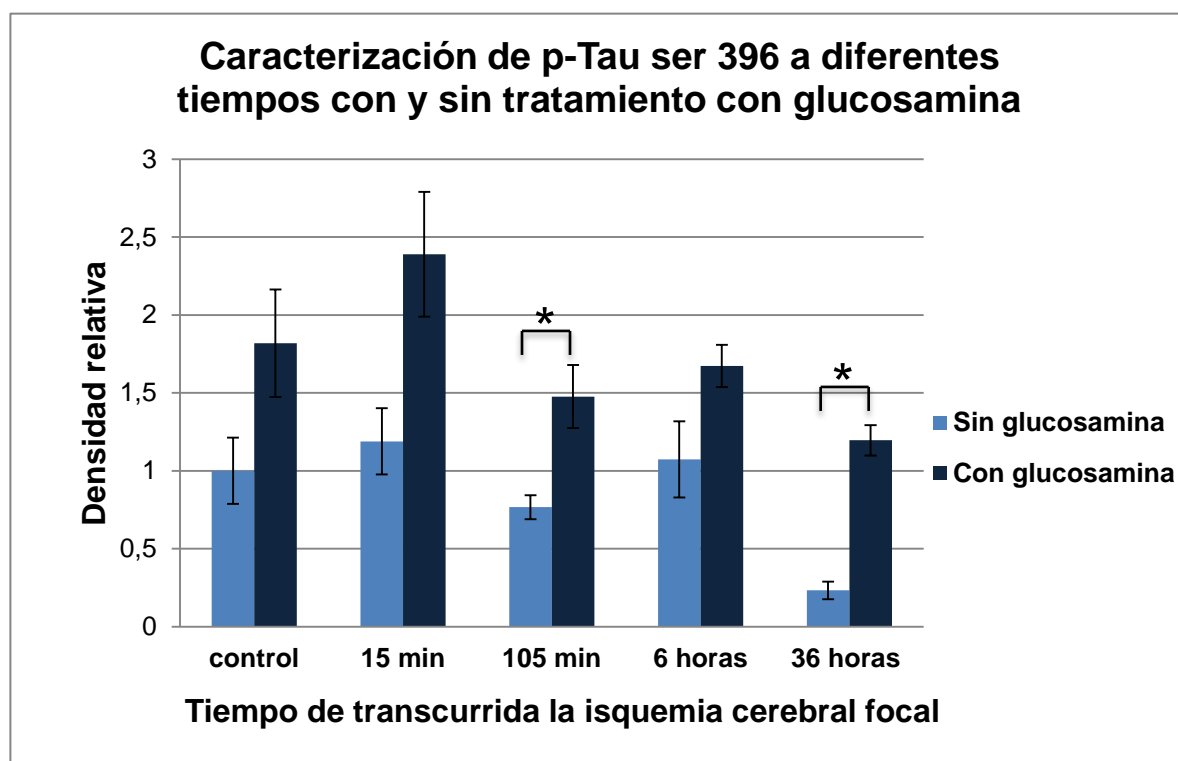


Figura 2. Niveles de expresión de la proteína p-Tau ser 214 en la corteza frontoparietal de la rata Wistar durante la isquemia cerebral focal a través del tiempo, con y sin tratamiento con glucosamina. (A) Western Blot de los niveles de p-Tau ser 214 sin tratamiento con glucosamina y su control de carga β -actina. (B) Western Blot de los niveles de p-Tau ser 214 con tratamiento con glucosamina y su control de carga β -actina. (C) Comparación de los niveles de expresión de p-Tau ser 214 entre tratamientos a los diferentes tiempos. (D) Comparación de los niveles de expresión de p-Tau ser 214 entre 105 minutos y 6 horas para un mismo tratamiento (media \pm EEM, $n=4$, * $p<0,05$ diferencia significativa en la prueba t-student).

De acuerdo con el ANOVA no se encontraron diferencias significativas en los niveles de fosforilación de Tau en el residuo serina 214 entre los tratamientos con y sin glucosamina, ni entre los diferentes tiempos de ocurrida la isquemia cerebral (*Anexo 7 y Figura 2C*). Por otro lado, con la prueba t-student se presentó una disminución significativa de la fosforilación de Tau en este residuo con el tratamiento con glucosamina a las 6 horas después de la isquemia cerebral respecto a la observada a los 105 minutos (*Figura 2D*).



C



D

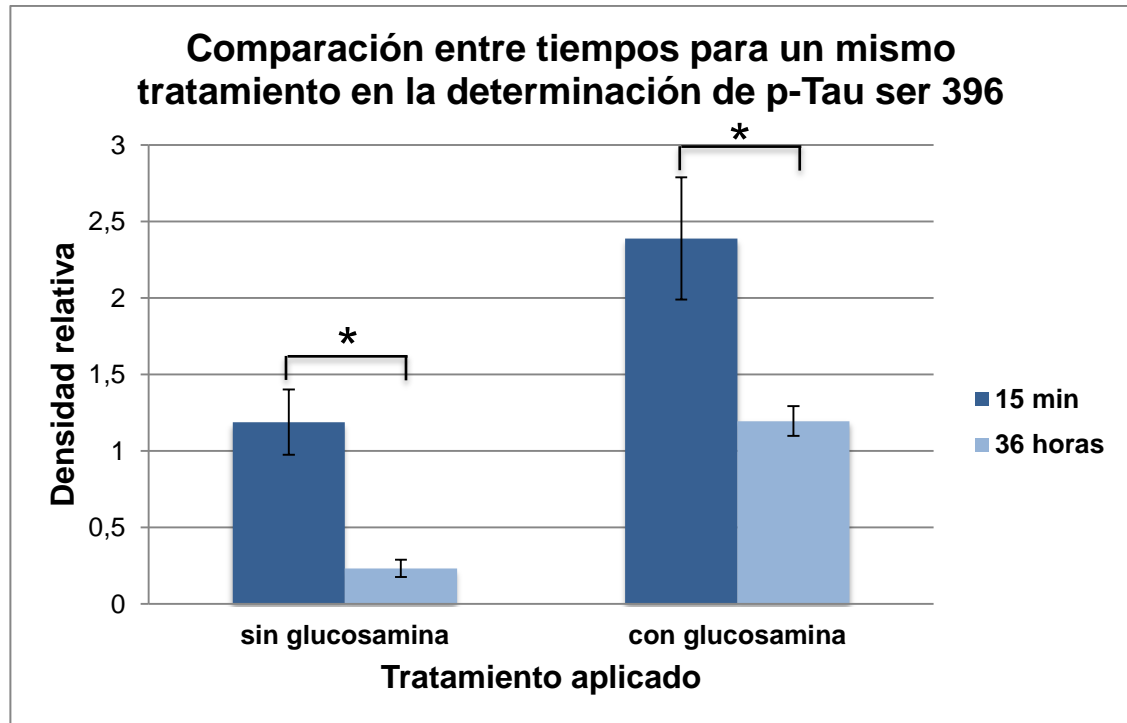


Figura 3. Niveles de expresión de la proteína p-Tau ser 396 en la corteza frontoparietal de la rata Wistar durante la isquemia cerebral focal a través del tiempo, con y sin tratamiento con glucosamina. (A) Western Blot de los niveles de p-Tau ser 396 sin tratamiento con glucosamina y su control de carga β -actina. (B) Western Blot de los niveles de p-Tau ser 396 con tratamiento con glucosamina y su control de carga β -actina. (C) Comparación de los niveles de expresión de p-Tau ser 396 entre tratamientos a los diferentes tiempos. (D) Comparación de los niveles de expresión de p-Tau ser 396 entre 15 minutos y 36 horas para un mismo tratamiento (media \pm EEM, n=3, * $p < 0,05$ diferencia significativa en la prueba t-student)

Con el ANOVA se encontraron diferencias significativas en los niveles de fosforilación de p-Tau ser 396 entre los tratamientos con y sin glucosamina, y también entre los diferentes tiempos de ocurrida la isquemia cerebral (*Anexo 8*). De acuerdo con la prueba t-student, a los 105 minutos se presentó un aumento significativo en el nivel de fosforilación de Tau con el tratamiento con glucosamina, al igual que a las 36 horas (*Figura 3C*).

Se observa además, que los niveles de p-Tau ser 396 tienden a ser superiores en todos los tiempos con el tratamiento con glucosamina en comparación con el tratamiento sin glucosamina (*Gráfica 12-Anexo 8 y Figura 3C*). Adicional a ello, se presentó una disminución del nivel de fosforilación de Tau en este residuo entre los 15 minutos y 36 horas de ocurrida la isquemia cerebral tanto en el tratamiento con glucosamina como sin glucosamina (*Figura 3D*).

2.6. Discusión

Para conocer el comportamiento que presenta la proteína Tau durante la isquemia cerebral focal y aportar a la hipótesis de que esta está involucrada en el proceso de neuroprotección que ejerce la glucosamina, se caracterizó primero su expresión total. De acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis, no se observaron diferencias significativas en el nivel de expresión de la proteína Tau entre los diferentes tiempos después de ocurrida la isquemia cerebral focal (*Anexo 6*). Estos resultados concuerdan con un estudio reciente (Wang *et al.*, 2010) en el que se investigó la expresión de la proteína Tau total en la corteza parietal derecha de ratas expuestas a isquemia cerebral y reperfusión a diferentes tiempos.

De acuerdo con la prueba de Kruskal Wallis, existen diferencias significativas en los niveles de expresión de Tau entre los tratamientos con y sin glucosamina (*Anexo 6*). El aumento significativo en los niveles de expresión de Tau con el tratamiento con glucosamina se presentó a las 36 horas de ocurrida la isquemia cerebral (*Figura 1C y Gráficas 4 y 5-Anexo 6*). Con respecto a la expresión de Tau con el tratamiento sin glucosamina se encontró una disminución significativa entre las 6 y 36 horas de ocurrida la isquemia cerebral (*Figura 1D*); esta disminución muy probablemente coincide con el tiempo en que sucede la muerte celular, ya que se conoce que el déficit de glucosa y oxígeno que se produce en la isquemia cerebral genera la muerte neuronal (Song *et al.*, 2013). Lo anterior sugiere que el efecto neuroprotector de la glucosamina podría estar relacionado con evitar la disminución de la expresión de la proteína Tau a las 36 horas de ocurrido el evento isquémico.

Sin embargo conocer el nivel de expresión de Tau no es suficiente para comprender el comportamiento de esta proteína durante la isquemia cerebral y el efecto que el tratamiento con la glucosamina tenga sobre ella, pues hay que recordar que esta proteína además de que está sujeta a gran regulación por parte de cinasas y fosfatasas que pueden verse alteradas durante la isquemia cerebral y por tanto influir en su comportamiento, presenta 79 sitios potenciales de fosforilación (Buee *et al.*, en Wen *et al.*, 2007), y que es precisamente su estado hiperfosforilado el que está asociado al proceso de apoptosis neuronal (Wen *et al.*, 2004). Debido a lo anterior este estudio caracterizó también los niveles de fosforilación de Tau en los residuos de serina 214 (ser 214) y serina 396 (ser 396), dos de los sitios de fosforilación relacionados con procesos de supervivencia y muerte celular.

Se eligió el residuo ser 214, ya que es uno de los sitios de fosforilación de Tau que ha reportado un incremento significativo en su fosforilación con respecto al control en ratas con isquemia cerebral, específicamente en la corteza frontoparietal (Wen *et al.*, 2004), misma región que fue estudiada en este proyecto.

Tau fosforilada en el residuo 214 (p-Tau ser 214) se localiza fuera del dominio del enlace a microtúbulos, es sustrato potencial de PKA y al parecer su actividad está relacionada con la separación de Tau de los microtúbulos. Aunque no se debe pasar por alto que la importancia de cada sitio de fosforilación de Tau es controversial (Wen *et al.*, 2004).

De acuerdo con el ANOVA, p-Tau ser 214 no presentó diferencias significativas en los niveles de fosforilación entre los tratamientos con y sin glucosamina, ni entre los diferentes tiempos de ocurrida la isquemia cerebral (*Anexo 7 y Figura 2C*). Sin embargo, al comparar los niveles de fosforilación de Tau en ese residuo a los 105 minutos y 6 horas después de la isquemia cerebral por medio de la prueba t-student, se encontró una disminución significativa con el tratamiento con glucosamina (*Figura 2D*).

Se podría pensar entonces que el residuo serina 214 de la proteína Tau no se ve modificado ni por la isquemia ni por el tratamiento con la glucosamina, idea que puede sustentarse con lo reportado en un estudio que pese a demostrar que la O-GlcNAcilación regula negativamente la fosforilación de Tau en ser 199, ser 202, Thr 205, Thr 212, **ser 214**, ser 262 y **ser 396** en la línea celular PC12, encuentran que la fosforilación de tau en ser 202, 214 y 404 también es regulada positivamente o no se ve afectada por la O-GlcNAcilación en cerebros activos de ratas y ratones (Liu, Iqbal, Grundke-Iqbal, Hart, Gong, 2004).

Algunos sitios de fosforilación de Tau aún no han sido investigados o no se les ha encontrado una posible función; esto último es lo que sucede con el sitio de fosforilación de Tau en ser 396, a pesar de que se ha relacionado en varios estudios con isquemia cerebral y Enfermedad de Alzheimer. De acuerdo con el ANOVA se encontraron diferencias significativas en los niveles de fosforilación a diferentes tiempos de ocurrida la isquemia cerebral y también entre tratamientos (*Anexo 8*).

Se observó que los niveles de fosforilación de Tau en ser 396 con el tratamiento con glucosamina muestran una tendencia a ser superiores en todos los tiempos evaluados a los obtenidos sin glucosamina (*Gráfica 12-Anexo 8*), siendo significativos a los 105 minutos y 36 horas según la prueba t-student (*Figura 3C*). Estos comportamientos llevan a pensar que la glucosamina sí ejerce un efecto en la proteína Tau que consiste en mantener y aumentar los niveles de fosforilación en el residuo ser 396, evitando la desfosforilación. En estos resultados es evidente cómo después de las 36 horas disminuye significativamente la densidad relativa de p-Tau ser 396 cuando no hay un tratamiento con glucosamina (*Figura 3C y 3D*), reafirmando que la isquemia cerebral es un evento que no permite que las células cerebrales mantengan su funcionamiento normal (Torregrosa *et al.*, 2008).

En este caso, el resultado obtenido es contrario a lo publicado por el grupo de Liu *et al.* en el año 2004, en un estudio sobre la Enfermedad de Alzheimer en el que encontraron que la O-GlcNAcilación regula negativamente la fosforilación de Tau en ser 396.

En resumen, el tratamiento con glucosamina logró que el sitio de fosforilación de Tau ser 396 presentara niveles de fosforilación mayores que sin glucosamina. Teniendo en cuenta que durante la isquemia ocurre una rápida desfosforilación de Tau en ser 396-404 (Mailliot *et al.*, 2000; Wen *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2013), el posible efecto atribuido a la glucosamina (mantener y aumentar los niveles de fosforilación evitando la desfosforilación) adquiere mayor peso. Wen *et al.*, 2004, menciona además, que el déficit de oxígeno y glucosa en el cerebro neocortical de ratas y humanos durante la isquemia, induce a la desfosforilación de Tau entre los 30 y 60 minutos. Y que puede deberse a la activación potencial de las fosfatasa.

De acuerdo con los resultados de la isquemia cerebral sin tratamiento con glucosamina para el sitio de fosforilación ser 396 (*Figura 3C*), los niveles de fosforilación de Tau fueron relativamente inferiores comparados con los de ser 214 (*Figura 2C*). Interesante fue encontrar que precisamente ser 396-404 se desfosforilan completamente durante la isquemia en la corteza frontal (Mailliot *et al.*, 2000), y aunque este no fue el caso, a las 36 horas la cantidad fosforilada fue bastante baja. Song *et al.*, 2013 reportan que el nivel de fosforilación de Tau ser 202 y 396/404 en el hipocampo decrece rápidamente durante la isquemia cerebral; evidenciando la desfosforilación de Tau en este residuo durante la isquemia.

Estos estudios también determinaron que durante la reperfusión Tau se fosforila lentamente, debido a la inducción de las cinasas o la disminución de la actividad de las fosfatasa (Wen *et al.*, 2004), que con la reperfusión se logra recuperar más o menos el estado inicial de la fosforilación de Tau después de 24 horas (Mailliot *et al.*, 2000), y los resultados de Song *et al.*, 2013 en el hipocampo demuestran que el nivel de fosforilación no sólo retornó a su estado inicial sino que esto sucedió 12 horas después de la reperfusión. Por consiguiente, se puede inferir que después de la reperfusión Tau vuelve a fosforilarse; sin embargo, el nivel de fosforilación que adquiere nuevamente, el tiempo que demora en hacerlo y las enzimas implicadas, aún siguen siendo temas controversiales y requieren más estudio.

Estudios recientes no determinan una relación definitiva entre Tau hiperfosforilada y la apoptosis neuronal inducida por la isquemia cerebral (Wen *et al.*, 2004). No obstante, los resultados de Wang *et al.*, 2010 muestran una correlación entre p-Tau ser 396, apoptosis neuronal y expresión de bax (proteína proapoptótica) y mencionan que la hiperfosforilación de Tau inhibe la actividad antiapoptótica de la proteína bcl-2 (Guise *et al.* en Wang *et al.*, 2010).

A pesar de que la mayoría de la evidencia apunta a que la neuroprotección por medio de Tau debería implicar menos fosforilación, ya que su hiperfosforilación está relacionada con la disminución de su afinidad por los microtúbulos y con la contribución a la muerte neuronal; en este estudio se observó un aumento en la fosforilación de ser 396 con el tratamiento con glucosamina durante la isquemia cerebral. Sin embargo, los resultados no indican que con el tratamiento con glucosamina Tau se está hiperfosforilando; se debe tener en cuenta que no todos los sitios de fosforilación de Tau reaccionan igual durante la isquemia, lo cual

puede deberse a las diferentes cinasas y fosfatasa implicadas (Mailliot *et al.*, 2000).

Si la glucosamina está reduciendo la hiperfosforilación de Tau lo debe estar haciendo en conjunto con los otros 77 residuos que se pueden fosforilar, debido a que el residuo ser 214 no se presentó modificación y en ser 396 aumentó su fosforilación. La glucosamina podría estar actuando por ejemplo, en los residuos Thr 231 y ser 422 que presentaron aumentos significativos durante la isquemia cerebral (Wen *et al.*, 2004), o en ser 199, Thr 205, Thr 212, ser 262, residuos donde se ha reportado que la O-GlcNAcilación regula negativamente la fosforilación de Tau (Liu *et al.*, 2004).

En la isquemia cerebral se ha encontrado que el tratamiento con glucosamina tiende a aumentar la forma inactiva de GSK-3 β (p- GSK-3 β serina 9), inhibiendo por tanto la función cinasa de la proteína, y además, disminuye una de las formas que mejora su actividad (p- GSK-3 β tirosina 216), resultados obtenidos hasta las 6 horas después de ocurrida la isquemia (Viveros, 2014). Esto indica que probablemente el aumento en la fosforilación de Tau en ser 396 reportada en este estudio no se está dando por la cinasa de GSK-3 β sino por otra cinasa.

Sin embargo, se encontró un estudio que plantea todo lo contrario con respecto al papel de Tau en el daño neuronal, el cual se basa en que su hiperfosforilación inhibe la apoptosis y por lo tanto su desfosforilación hace que la célula sea más vulnerable a esta. El mismo estudio sugiere que la fosforilación de Tau antagoniza la fosforilación de la proteína β -catenina mediante un mecanismo competitivo, debido a que las dos son sustrato de GSK-3 β y que al hacerlo, β -catenina se estabiliza, se promueve su translocación nuclear y la sobrevivencia de la célula (Li *et al.*, 2007). Además, observaron un decrecimiento en la habilidad de Tau para proteger la célula de la apoptosis al mutar el residuo 396, lo cual indica una posible relación de este sitio de fosforilación con la actividad antiapoptótica de Tau (Li *et al.*, 2007).

Además de Tau, otras proteínas que podrían estar involucradas en el proceso de neuroprotección post-isquémico cerebral son: MAP-2, AKT y Glucógeno Sintasa Cinasa-3beta (GSK-3 β por sus siglas en inglés). MAP-2 al igual que Tau es una proteína asociada a microtúbulos que tiene la capacidad de unirse a estos y estabilizarlos, y se expresa principalmente en las neuronas (Dehmelt y Halpain, 2004). Con respecto a la proteína AKT, se ha reportado que cuando esta es fosforilada es capaz de prevenir la apoptosis celular (Noshita, Lewén, Sugawara, y Chan, 2001). Y GSK-3 β que es pro-apoptótica y fue mencionada previamente (Chuang *et al.*, 2011). Algunos integrantes del grupo de investigación de Fisiología Animal de la Universidad ICESI se han encargado de estudiar dichas proteínas.

2.7. Conclusiones

1. Se encontraron cambios en los niveles de expresión y fosforilación del residuo serina 396 de la proteína Tau en la corteza frontoparietal de ratas Wistar sometidas a diferentes tiempos de isquemia cerebral focal.
2. Se presentó un aumento significativo en el nivel de expresión de Tau con el tratamiento con glucosamina a las 36 horas de ocurrida la isquemia cerebral focal.
3. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de fosforilación de Tau en el residuo serina 214 entre los tratamientos con y sin glucosamina, ni entre los diferentes tiempos de ocurrida la isquemia cerebral.
4. Los niveles de fosforilación de Tau en el residuo serina 396 con el tratamiento con glucosamina tienden a ser superiores en todos los tiempos evaluados en comparación con el tratamiento sin glucosamina, siendo significativos a los 105 minutos y 36 horas.
5. El efecto neuroprotector de la glucosamina podría estar relacionado con mantener elevada la expresión y fosforilación en el residuo serina 396 de la proteína Tau a lo largo del tiempo, evitando así su disminución y desfosforilación una vez ocurre el evento isquémico. Estos resultados no indican que con el tratamiento con glucosamina Tau se hiperfosforila, dado que se estudiaron 2 de los 79 residuos posibles de fosforilarse y sólo 1 mostró el aumento, esto puede deberse a que Tau compite como sustrato para diferentes cinasas.

2.8. Recomendaciones

1. Confirmar que el tratamiento con glucosamina causa O-GlcNAcilación en Tau mediante inmunoprecipitación con RL2 y/o CTD110.6 (anticuerpos O-GlcNAc) seguido de un análisis por Western Blot con anticuerpo anti Tau.
2. Evaluar el efecto de la glucosamina en los sitios de fosforilación ser 262 y Thr 212 de Tau, ya que en estos residuos se ha reportado que la O-GlcNAcilación regula negativamente la fosforilación de Tau, y el comportamiento de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) en la isquemia cerebral focal bajo los mismos parámetros de este estudio.
3. Investigar si a los tiempos estudiados de isquemia cerebral focal hay correlación entre Tau fosforilada (residuos ser 214 y 396) y apoptosis neuronal mediante prueba histoquímica con NeuN.
4. Realizar técnicas inmunohistoquímicas con los anticuerpos contra Tau total y algunos de sus residuos fosforilados con el fin de aportar mayor conocimiento sobre el comportamiento de la proteína Tau al determinar la distribución de la proteína Tau en el tejido cerebral sometido a isquemia cerebral focal.

3. BIBLIOGRAFÍA

- Arango, C., Escobar, M., Cardona, GP., y Pimienta, H. (2004). Fisiopatología de la isquemia cerebral focal: aspectos básicos y proyección a la clínica. *Revista de Neurología*, 39, 156-165.
- Berg, JM., Tymoczko, JL., y Stryer, L. (2002). Kinesin and Dynein Move Along Microtubules. *Biochemistry* (34).
- Broughton, B., Reutens, D., y Sobey, C. (2009). Apoptotic Mechanisms After Cerebral Ischemia. *STROKE*, 40, 331-339.
- Bruce, A., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., y Lewis, J. (2011). Estructura y Función de las proteínas. *Introducción a la Biología Celular* (4), 900.
- Buee, L., Bussièrè, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., y Hof, PR. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research*, 33 (1), 95–130.
- Butkinaree, C., Park, K., y Hart, GW. (2010). O-linked β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1800(2), 96-106.
- Chuang, DM., Wang, Z., y Chiu, CT. (2011). GSK-3 as a target for lithium-induced neuroprotection against excitotoxicity in neuronal cultures and animal models of ischemic stroke. *Frontiers in molecular neuroscience*, 4. doi: 10.3389/fnmol.2011.00015
- Dehmelt, L., y Halpain, S. (2004). The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biology*, 6(1), 204.1-204.10.
- Dong, DW., Zhang, YS., Yang, WY., Wang-Qin, RQ., Xu, AD., y Ruan, YW. (2014). Hyperphosphorylation of tau protein in the ipsilateral thalamus after focal cortical infarction in rats. *Brain Research*. 1543, 280-289. doi: 10.1016/j.brainres.2013.11.004
- Feng, S., Yang, Q., Liu, M., Li, W., Yuan, W., Zhang, S., Wu, B., y Li, J. (2011). Edaravona para el tratamiento del accidente cerebrovascular isquémico agudo. (Revisión Cochrane traducida). *Cochrane*, (12). doi: 10.1002/14651858.CD007230
- Fletcher, DA., y Mullins, R. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463(28), 485-492. doi: 10.1038/nature08908
- Gong, CX., e Iqbal, K. (2008). Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for Alzheimer disease. *Current Medicinal Chemistry*, 15(23), 2321-2328.
- Grandati, M., Verrecchia, C., Revaud, ML., Allix, M., Boulu, RG., y Plotkine, M. (1997). Calcium-independent NO-synthase activity and nitrites/nitrates production in transient focal cerebral ischaemia in mice. *British Journal of Pharmacology*, 122 (4), 625-630.
- Griffith, L., y Schmitz, B. (1999). O-linked N-acetylglucosamine levels in cerebellar neurons respond reciprocally to perturbations of phosphorylation. *European Journal of Biochemistry*, 262(3), 824–831.

- Groves, JA., Lee, A., Yildirim, G., y Zachara, NE. (2013). Dynamic O-GlcNAcylation and its roles in the cellular stress response and homeostasis. *Cell stress & chaperones*, 18(5), 535-558.
- Guadagna, S., Esiri, MM., Williams, RJ., y Francis, PT. (2012). Tau phosphorylation in human brain: relationship to behavioral disturbance in dementia. *Neurobiology of Aging*, 33(12), 2798–2806. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.01.015
- Hacke, W., Kaste, M., Bluhmki, E., Brozman, M., Dávalos, A., Guidetti, D., Larrue, V., R. Lees, K., Medeghri, Z., Machnig, T., Schneider, D., von Kummer, R., Wahlgren, N., y Toni, D. (2008). Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 Hours after Acute Ischemic Stroke. *The New England Journal of Medicine*, 359(13), 1317-1329.
- Hwang, SY., Shin, JH., Hwang, JS., Kim, SY., Shin, JA., Oh, ES., Oh, S; Kim, JB., Lee, JK., y Han, IO. (2010). Glucosamine exerts a neuroprotective effect *via* suppression of inflammation in rat brain ischemia/reperfusion injury. *Glia*, 58(15), 1881-1892. doi: 10.1002/glia.21058
- Kwon, j., y Rha, J. (2013). Recent advances in thrombolysis of acute ischemic stroke. *Journal of the Korean Medical Association*, 56(5), 402-409.
- Li, HL., Wang, HH., Liu, SJ., Deng, YQ., Zhang, YJ., Tian, Q., Wang, XC., Chen, XQ., Yang, Y., Zhang, JY., Wang, Q., Xu, H., Liao, FF., y Wang, JZ. (2007). Phosphorylation of tau antagonizes apoptosis by stabilizing β -catenin, a mechanism involved in Alzheimer's neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 104 (9), 3591–3596.
- Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., y Gong, CX. (2005). Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *European Journal of Neuroscience*, 22(8), 1942-1950.
- Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Hart, GW., Gong, CX. (2004). O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: A mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 101(29), 10804–10809. doi: 10.1073/pnas.0400348101
- Liu, J., Pang, Y., Chang, T., Bounelis, P., Chatham, JC., y Marchase, RB. (2006). Increased hexosamine biosynthesis and protein O-GlcNAc levels associated with myocardial protection against calcium paradox and ischemia . *Journal Of Molecular and Cellular Cardiology*, 40(2), 303-312.
- Lo, E. (2008). A new Penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nature Medicine*, 14, 497-500.
- Mailliot, C., Podevin-Dimster, V., Rosenthal, RE., Sergeant, N., Delacourte, A., Fiskum, G., y Buée, L. (2000). Rapid tau protein dephosphorylation and differential rephosphorylation during cardiac arrest-induced cerebral ischemia and reperfusion. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 20(3), 543-549.

- Martin, L., Magnaudeix, A., Esclaire, F., Yardin, C., y Terro, F. (2009). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 β downregulates total tau proteins in cultured neurons and its reversal by the blockade of protein phosphatase-2A. *Brain Research*, 1252, 66–75. doi: 10.1016/j.brainres.2008.11.057
- Martin, L., Page, G., y Terro, F. (2011). Tau phosphorylation and neuronal apoptosis induced by the blockade of PP2A preferentially involve GSK3b. *Neurochemistry International*, 59(2), 235–250. doi: 10.1016/j.neuint.2011.05.010
- Morris, M., Maeda, S., Vossel, K., y Mucke, L. (2011). The Many Faces of Tau. *Neuron*, 70(3), 410-426. doi: 10.1016/j.neuron.2011.04.009
- Nogawa, S., Zhang, F., Ross, ME., y Ladecola, C. (1997). Cyclo-Oxygenase-2 Gene Expression in Neurons Contributes to Ischemic Brain Damage. *The Journal of Neuroscience*, 17(8), 2746–2755.
- Noshita, N., Lewén, A., Sugawara, T., y Chan, PH. (2001). Evidence of phosphorylation of Akt and neuronal survival after transient focal cerebral ischemia in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 21(12), 1442-1450.
- Ori-McKenney, KM., Jan, LY., y Jan, YN. (2012). Golgi Outposts Shape Dendrite Morphology by Functioning as sites of Acentrosomal Microtubule Nucleation in Neurons. *Neuron*, 76(5), 921-930.
- Salazar, J., Bello, L., Chávez, M., Añez, R., Rojas, J., y Bermúdez, V. (2014). Glucosamine for Osteoarthritis: Biological Effects, Clinical Efficacy, and Safety on Glucose Metabolism (Review). *Arthritis*.
- Song, B., Ao, Q., Wang, Z., Liu, W., Niu, Y., Shen, Q., Zuo, H., Zhang, X., y Gong, Y. (2013). Phosphorylation of tau protein over time in rats subjected to transient brain ischemia. *Neural Regeneration Research*, 8(34), 3173-3182. doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2013.34.001
- Sultan, A., Nessler, F., Violet, M., Begard, S., Loyens, A., Talahari, S., Mansuroglu, Z., Marzin, D., Sergeant, N., Humez, S., Colin, M., Bonnefoy, E., Buee, L., y Galas, MC. (2011). Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *Journal of Biological Chemistry*, 286 (6), 4566–4575. doi: 10.1074/jbc.M110.199976
- Torregrosa, G., Salom, J., Jover-Mengual, T., y Alborch, E. (2008). Fisiopatología básica: de la oclusión arterial a la muerte neuronal. En J. Montaner (Ed.), *Fisiopatología de la isquemia cerebral* (Vol. Avances en Patología Neurovascular). Barcelona: Marge Medica Books.
- Traystman, RJ. (2003). Animal Models of Focal and Global Cerebral Ischemia. *ILAR Journal*, 44(2), 85-95.
- Valerio, A., Bertolotti, P., Delbarba, A., Perego, C., Dossena, M., Ragni, M., Spano, P., Carruba, M., De simoni, M., y Nisoli, E. (2011). Glycogen synthase kinase-3 inhibition reduces ischemic cerebral damage, restores impaired mitochondrial biogenesis and prevents ROS production. *Journal of neurochemistry*, 116(6), 1148-1159. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07171.x

- Vivero, E. (2014). Caracterización de los niveles de expresión de la proteína GSK-3 β en un modelo animal de isquemia cerebral focal en el tratamiento con glucosamina (Tesis de pregrado). Universidad ICESI, Santiago de Cali, Colombia.
- Wang, Z., Pandey, A., y Hart, GW. (2007). Dynamic Interplay between O-Linked N-Acetylglucosaminylation and Glycogen Synthase Kinase-3-dependent Phosphorylation. *Molecular & Cellular Proteomics* 6.8, 6(8), 1365-1379.
- Wang, H., Zhao, H., Ye, Y., Xiong, N., Huang, J., Yao, D., Shen, Y., y Zhao, X. (2010). Focal Cerebral Ischemia Induces Alzheimer`s Disease-like Pathological Change in Rats. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, 30(1), 29-36. doi:10.1007/s11596-010-0106-4
- Weingarten, MD., Lockwood, AH., Hwo, SY., y Kirschner, MW. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(5), 1858-1862.
- Wen, Y., Yang, SH., Liu, R., y Simpkins, WJ. (2004). Transient cerebral ischemia induces site-specific hyperphosphorylation of tau protein. *Brain Research*, 1022(1), 30-38. doi: 10.1016/j.brainres.2004.05.106
- Wen, Y., Yang, SH., Liu, R., Perez, EJ., Brun-Zinkernagel, AM., Koulen, P., y Simpkins, JW. (2007). Cdk5 is involved in NFT-like tauopathy induced by transient cerebral ischemia in female rats. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*, 1772 (4), 473–483.
- WHO. (2012). The top 10 causes of death (310). Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
- Zachara, NE., O'Donnell, N., Cheung, WD., Mercer, JJ., Marth, JD., y Hart, GW. (2004). Dynamic O-GlcNAc Modification of Nucleocytoplasmic Proteins in Response to Stress. A survival response of mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(29), 30133-30142. doi: 10.1074/jbc.M403773200

4. ANEXOS

Anexo 1. Tamaño del infarto en el modelo de isquemia cerebral focal en ratas Wistar.

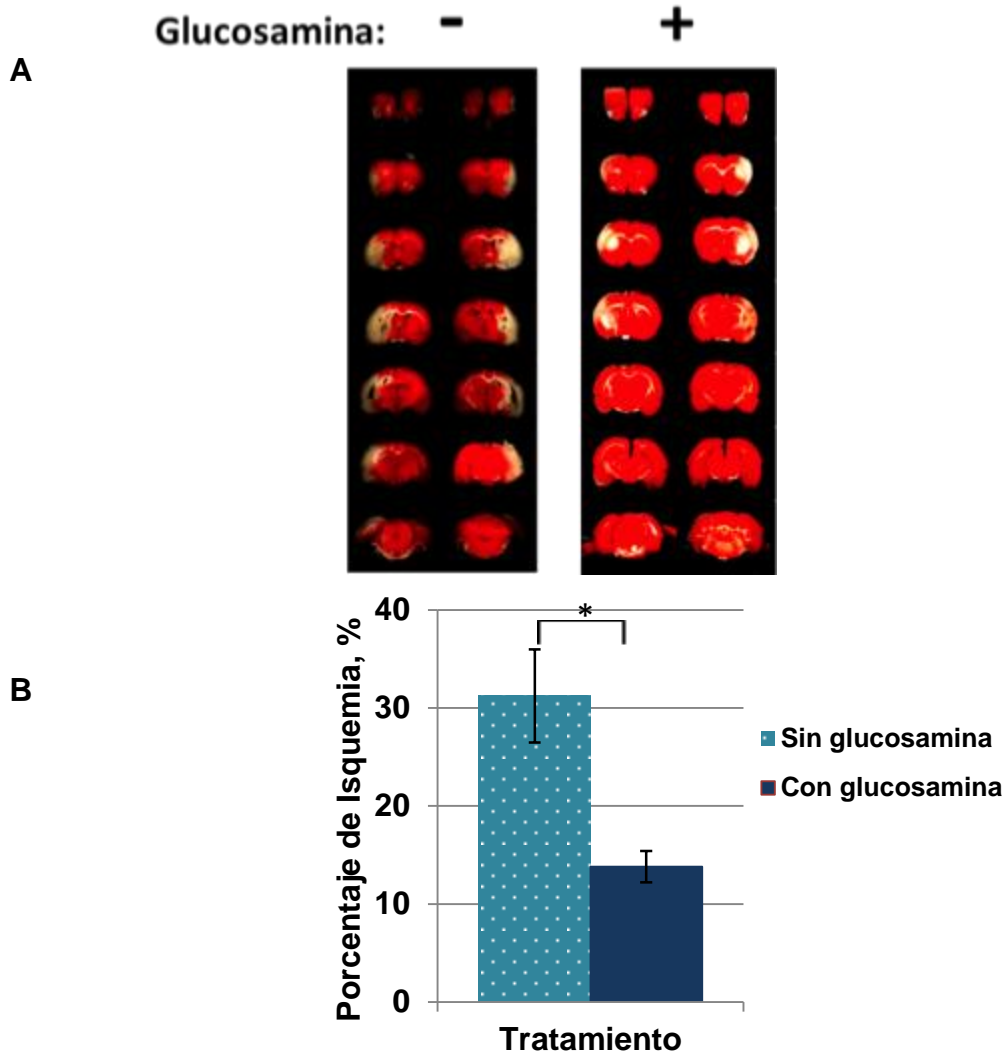
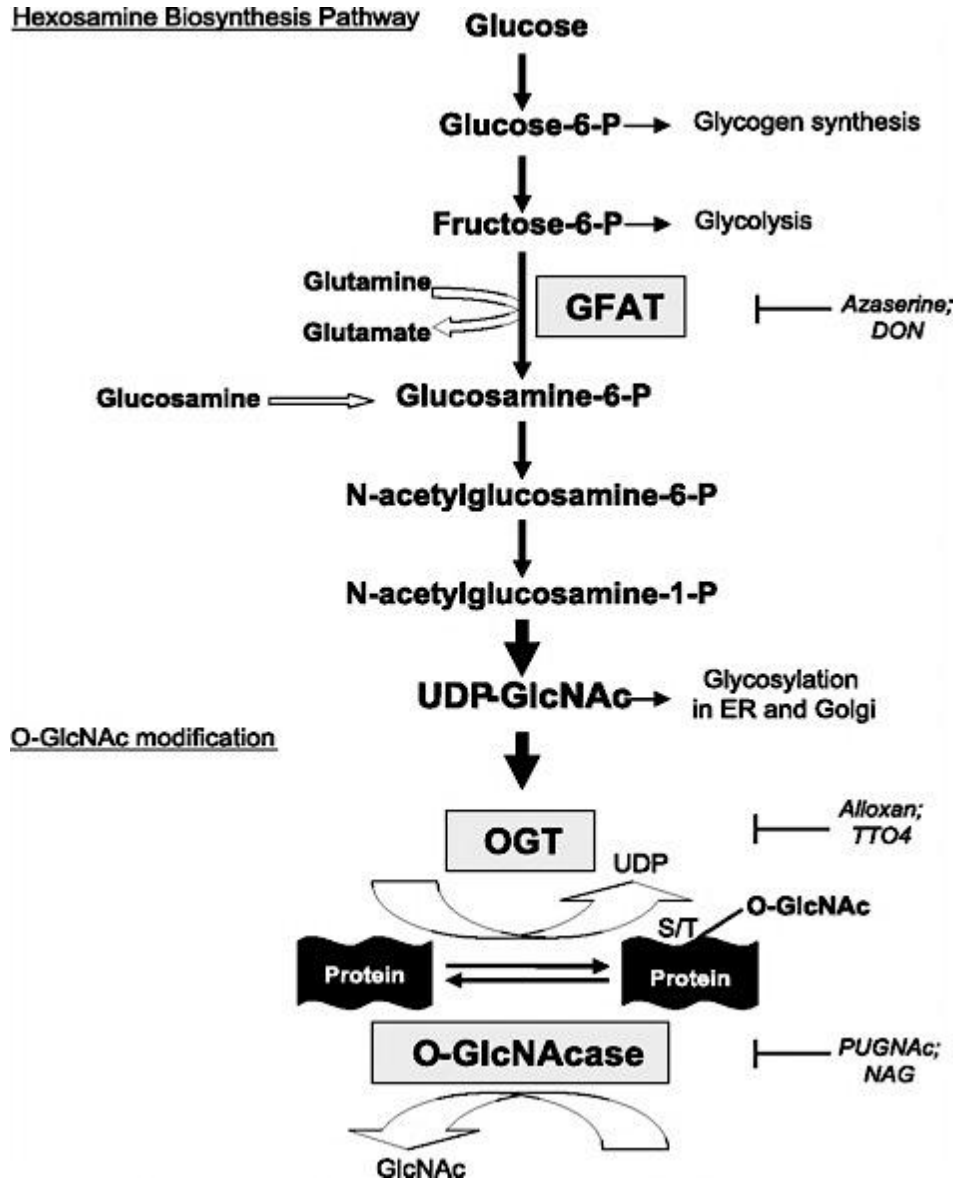


Figura 4. Tamaño del infarto evaluado con TTC, reactivo con el que se destaca en blanco el tejido muerto que no se tiñe de rojo, a las 24 horas de inducida la isquemia en el modelo de isquemia cerebral focal en ratas Wistar MCAO (Middle cerebral artery occlusion). (A) Tinción con TTC de cortes coronales de cerebro de rata a la que se le induce una isquemia con reperusión, sin tratamiento de glucosamina y con aplicación intraperitoneal de glucosamina media hora después de inducida la isquemia. (B) Comparación del tamaño del infarto medido como porcentaje del volumen del cerebro en los grupos sin tratamiento y con glucosamina (media \pm EEM, n=4, *, p<0.05 por la prueba de t-student).

Anexo 2. Vía biosintética de las hexosaminas.



Anexo 3. Cálculo realizado para determinar la concentración de proteínas a partir de la ecuación de la recta obtenida en la curva estándar.

$$Y = 0,0342X + 0,0138$$

$$X = \frac{Y - 0,0138}{0,0342}$$

donde: Y corresponde a la absorbancia y X a la concentración de proteínas.

Muestra de cálculo para el grupo experimental F:

$$X = \frac{Y - 0,0138}{0,0342} = \frac{0,162 - 0,0138}{0,0342} = 4,333 \mu g/mL$$

Teniendo en cuenta las diluciones realizadas a la muestra, la concentración de proteínas es:

$$4,333 \frac{\mu g}{mL} \times \frac{2000 \mu L}{1 \mu L} = 8667 \mu g/mL$$

Anexo 4. Cálculo realizado para determinar el volumen de cada componente a servir en los pozos.

Deben tenerse en cuenta los siguientes datos:

1. Se estableció servir en cada pozo 30 μg de proteína.
2. El volumen de buffer Laemmli en cada pozo es de 10 μL .
3. El volumen total a adicionar en cada pozo es de 20 μL .

Muestra de cálculo para el grupo experimental F:

$$\begin{aligned} \text{Volumen muestra} &= \frac{30 \mu g \text{ proteína a servir}}{8667 \frac{\mu g}{mL} \text{ Muestra}} = 0,00346 \text{ mL} \times \frac{1000 \mu L}{1 \text{ mL}} \\ &= 3,462 \mu L \text{ de muestra} \end{aligned}$$

$$10 \mu L \text{ Buffer Laemmli} + 3,462 \mu L \text{ muestra} = 13,462 \mu L$$

$$20 \mu L \text{ de solución a servir} - 13,462 \mu L = 6,538 \mu L \text{ agua}$$

Anexo 5. Matriz de marco lógico.

| Objetivo general | | | |
|---|---|--|--|
| <p>Evaluar si el tratamiento de la isquemia cerebral focal con glucosamina en el modelo animal rata Wistar, altera los niveles de expresión y fosforilación de la proteína TAU.</p> | | | |
| Objetivo específico | Actividad | Supuestos | Indicador |
| <p>Comparar los <u>niveles de expresión</u> de la proteína Tau en ratas Wistar a diferentes tiempos después de la isquemia cerebral focal, con y sin tratamiento con glucosamina.</p> | <ul style="list-style-type: none"> -Toma y tratamiento de la muestra. -Determinación de la concentración de proteínas presentes en el homogenizado. -Separación de las proteínas de acuerdo a su tamaño mediante la electroforesis en gel. -Detección de las proteínas Tau utilizando el método de quimioluminiscencia. -Comparación de las bandas obtenidas mediante densitometría. | <ul style="list-style-type: none"> -Contar con Ratas Wistar con buenos resultados de la isquemia cerebral focal. -Conseguir el anticuerpo para la detección de la proteína Tau. -Disponibilidad de equipos y materiales. -Encontrar diferencias en el nivel de expresión de la proteína Tau. | <p>Comparación de la intensidad de las bandas obtenidas mediante la técnica de Western Blot en los diferentes tratamientos experimentales.</p> |

| | | | |
|---|--|--|--|
| <p>Comparar los <u>niveles de fosforilación</u> de la proteína Tau en ratas Wistar a diferentes tiempos después de la isquemia cerebral focal, con y sin tratamiento con glucosamina.</p> | <ul style="list-style-type: none"> -Toma y tratamiento de la muestra. -Determinación de la concentración de proteínas presentes en el homogenizado. -Separación de las proteínas de acuerdo a su tamaño mediante la electroforesis en gel. -Detección de las proteínas Tau fosforiladas utilizando el método de quimioluminiscencia. -Comparación de las bandas obtenidas mediante densitometría. | <ul style="list-style-type: none"> -Contar con Ratas Wistar con buenos resultados de la isquemia cerebral focal. -Conseguir el anticuerpo para la detección de la proteína Tau fosforilada. -Disponibilidad de equipos y materiales. -Encontrar diferencias en el nivel de fosforilación de la proteína Tau. | <p>Comparación de la intensidad de las bandas obtenidas mediante la técnica de Western Blot en los diferentes tratamientos experimentales.</p> |
|---|--|--|--|

Anexo 6. Resultados análisis estadístico para Tau total.

1. ANOVA: Se realiza cuando se cumplen los siguientes dos supuestos:

- **Supuesto 1:** Homogeneidad de varianzas

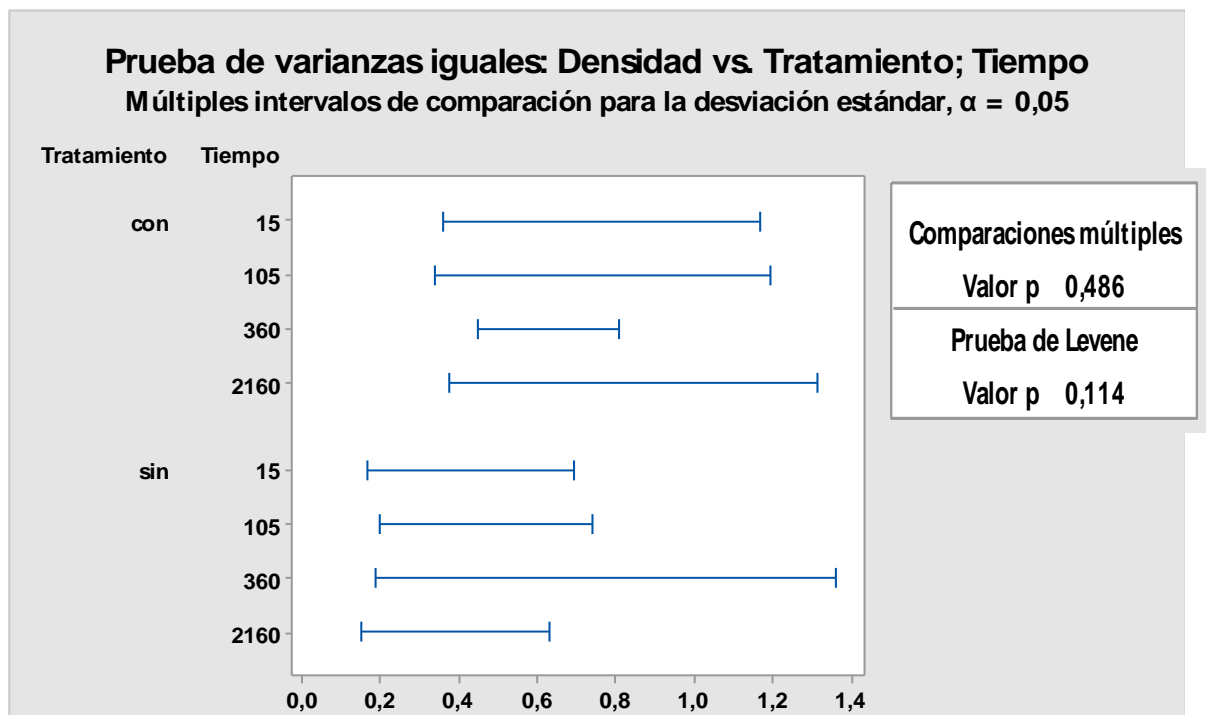
Se plantea, H_0 : Las varianzas son iguales; H_a : Las varianzas no son iguales

- **Supuesto 2:** Datos con distribución normal

H_0 : Los datos tienen distribución normal; H_a : Los datos no tienen distribución normal

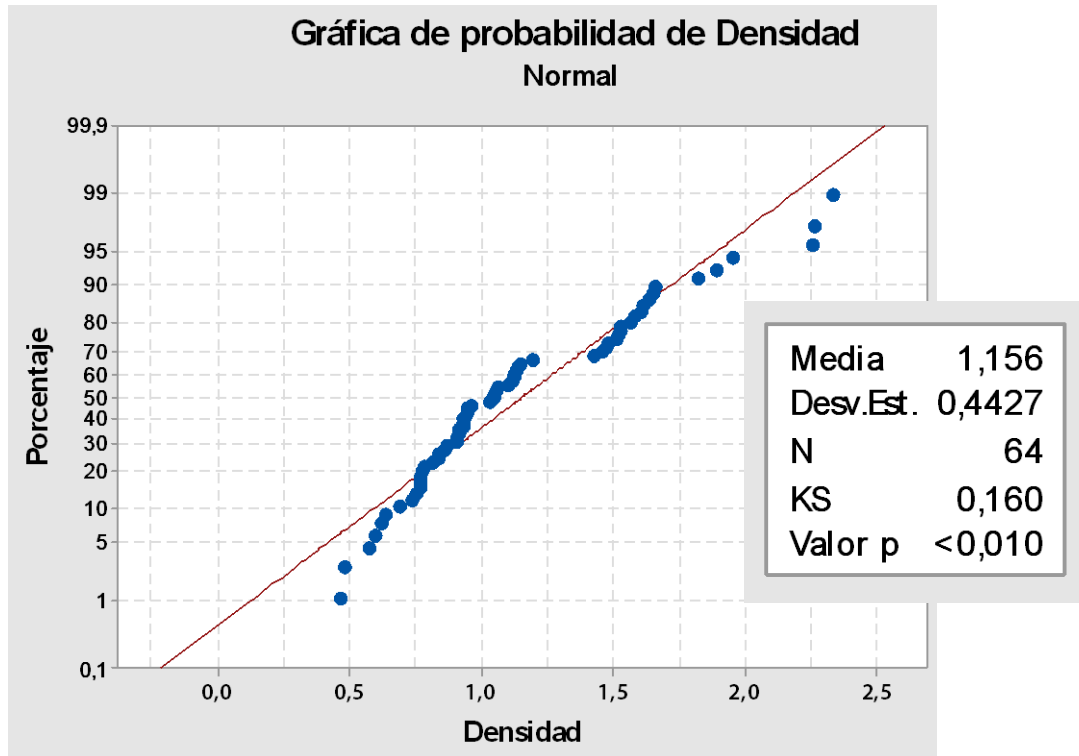
Se rechaza H_0 si: Valor $p < 0,05$

Gráfica 2. Prueba de varianzas iguales para datos de Tau total.



Como el valor p es mayor a $0,05$ no se rechaza la hipótesis nula y se concluye que las varianzas son iguales.

Gráfica 3. Prueba de normalidad para datos de Tau total.



Debido a que el valor p es menor que 0,05 se rechaza la hipótesis nula y se concluye que los datos no presentan distribución normal; por lo tanto no se puede aplicar el ANOVA.

2. Prueba Kruskal-Wallis: Se realiza cuando el ANOVA no es aplicable, ya que es una prueba no paramétrica, es decir, no asume normalidad en los datos.

Hipótesis a probar: Ho: La mediana de las densidades con o sin tratamientos son iguales; Ha: La mediana de las densidades con o sin tratamientos no son iguales.

Se rechaza Ho si: $H > X_i^2$ donde $X_i^2(0,05, 1) = 3,8415$

Kruskal-Wallis Test on Densidad

| Tratamiento | N | Median | Ave Rank | Z |
|-------------|----|--------|----------|-------|
| con | 32 | 1,2771 | 38,2 | 2,44 |
| sin | 32 | 0,9328 | 26,8 | -2,44 |
| Overall | 64 | | 32,5 | |

H = 5,97 DF = 1 P = 0,015

Conclusión: H es mayor que X_i^2 y por tanto se rechaza Ho. Existen diferencias entre los tratamientos.

Hipótesis a probar: Ho: La mediana de las densidades a los diferentes tiempos son iguales; Ha: La mediana de las densidades a los diferentes tiempos no son iguales.

Se rechaza Ho si: $H > X_i^2$ donde $X_i^2(0,05, 3) = 7,8147$

Kruskal-Wallis Test on Densidad

| Tiempo | N | Median | Ave Rank | Z |
|---------|----|--------|----------|-------|
| 15 | 16 | 1,0337 | 32,3 | -0,05 |
| 105 | 16 | 1,1283 | 36,8 | 1,05 |
| 360 | 16 | 1,0480 | 33,9 | 0,34 |
| 2160 | 16 | 0,9201 | 27,1 | -1,35 |
| Overall | 64 | | 32,5 | |

H = 2,29 DF = 3 P = 0,515

Conclusión: H es menor que X_i^2 y por tanto no se rechaza Ho. No existen diferencias entre los diferentes tiempos.

3. Prueba Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

| Tratamiento | N | Media | Agrupación |
|-------------|----|---------|------------|
| con | 32 | 1,31066 | A |
| sin | 32 | 1,00194 | B |

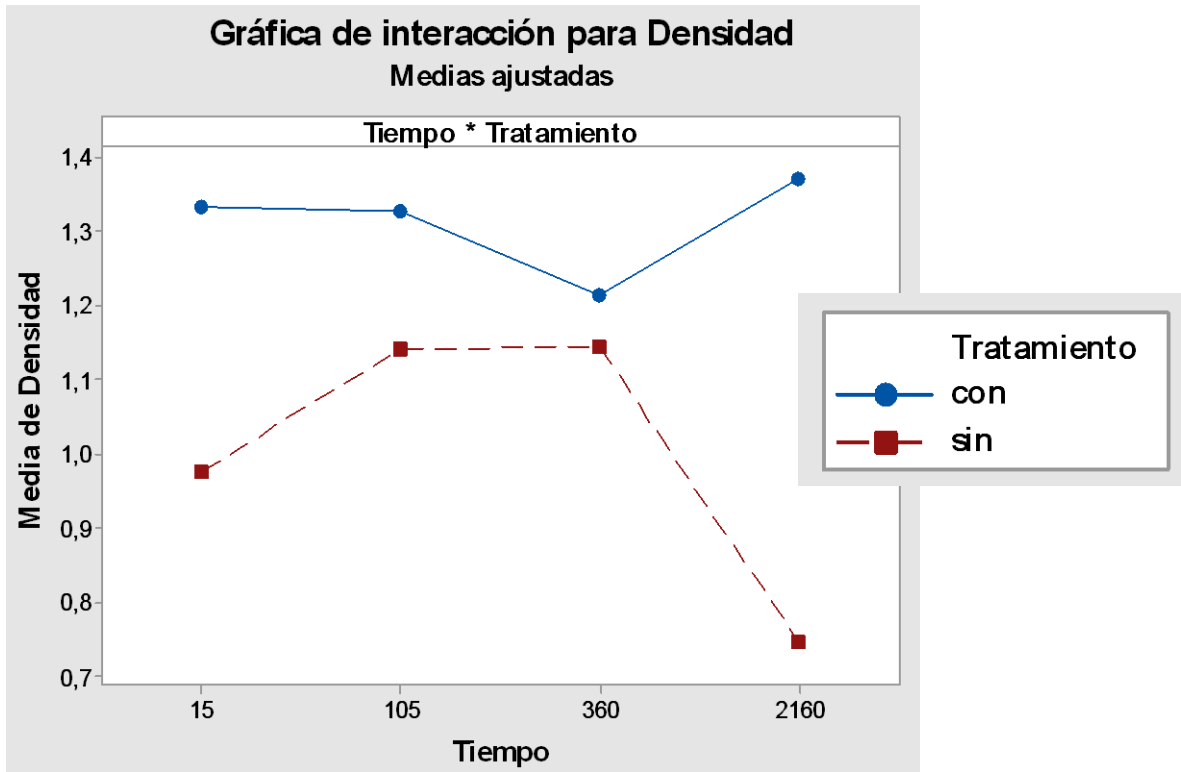
Comparaciones por parejas de Tukey:

Respuesta = Densidad, Término = Tiempo*Tratamiento

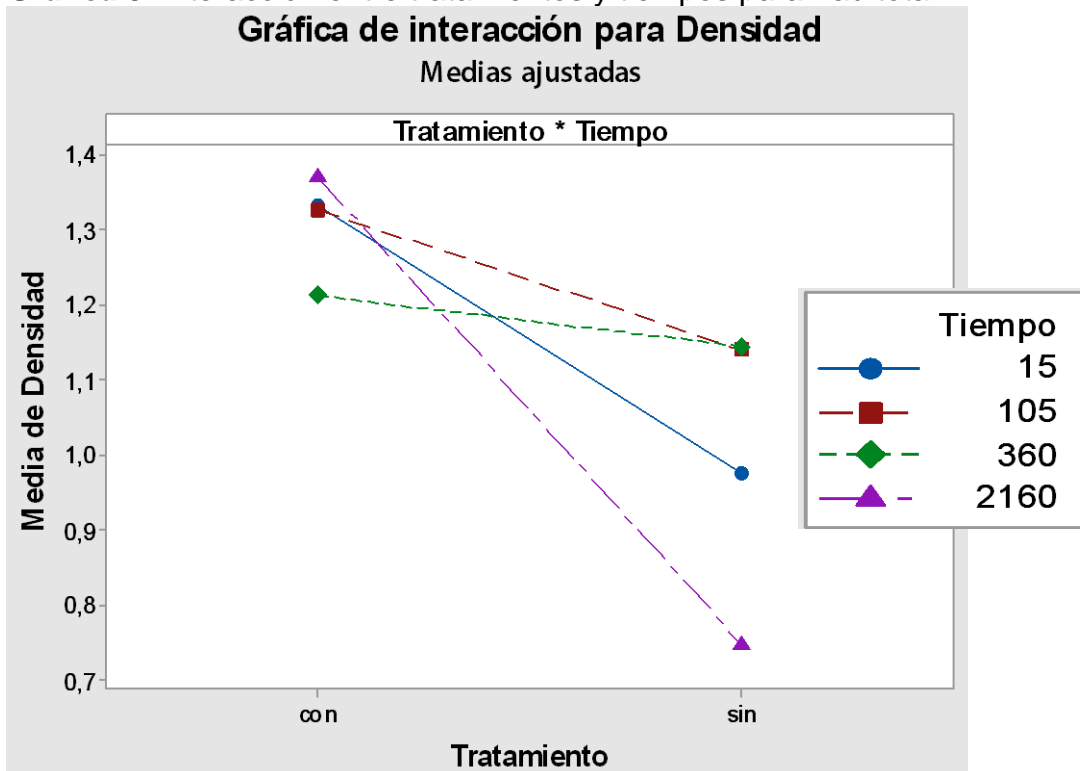
| Tiempo*Tratamiento | N | Media | Agrupación |
|--------------------|---|---------|------------|
| 2160 con | 8 | 1,37088 | A |
| 15 con | 8 | 1,33241 | A |
| 105 con | 8 | 1,32719 | A |
| 360 con | 8 | 1,21216 | A |
| 360 sin | 8 | 1,14475 | A |
| 105 sin | 8 | 1,14001 | A |
| 15 sin | 8 | 0,97597 | A |
| 2160 sin | 8 | 0,74703 | A |

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Gráfica 4. Interacción entre tiempos y tratamientos para Tau total.

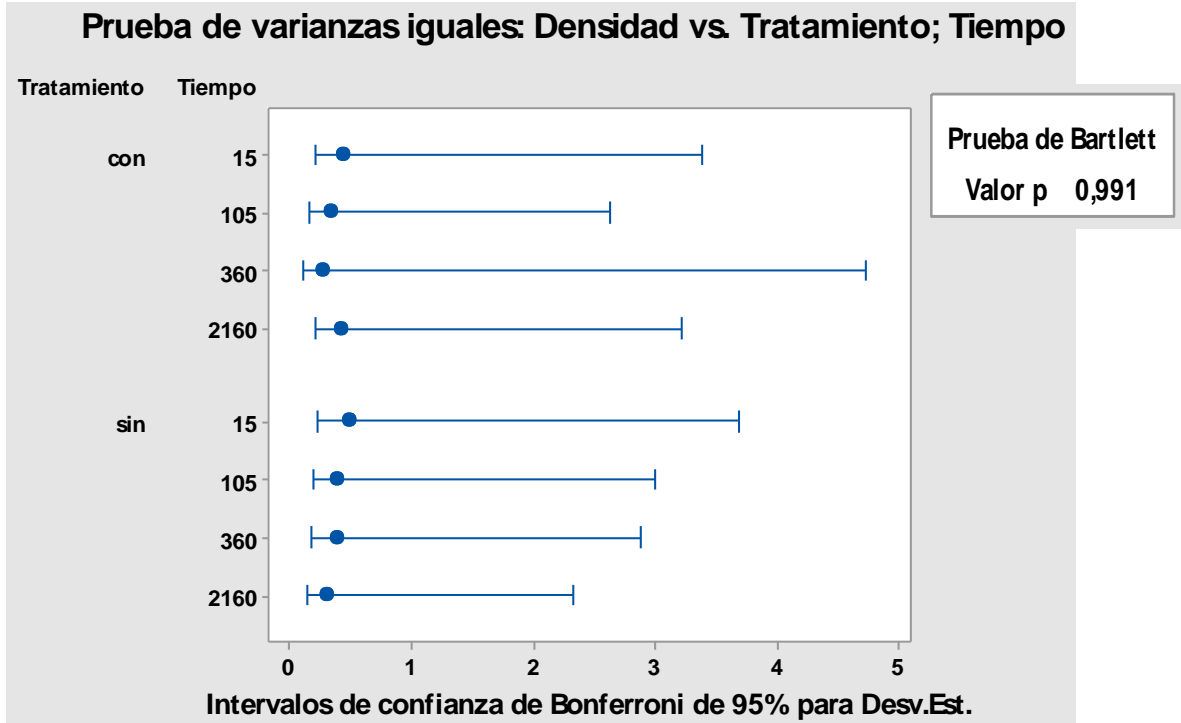


Gráfica 5. Interacción entre tratamientos y tiempos para Tau total.

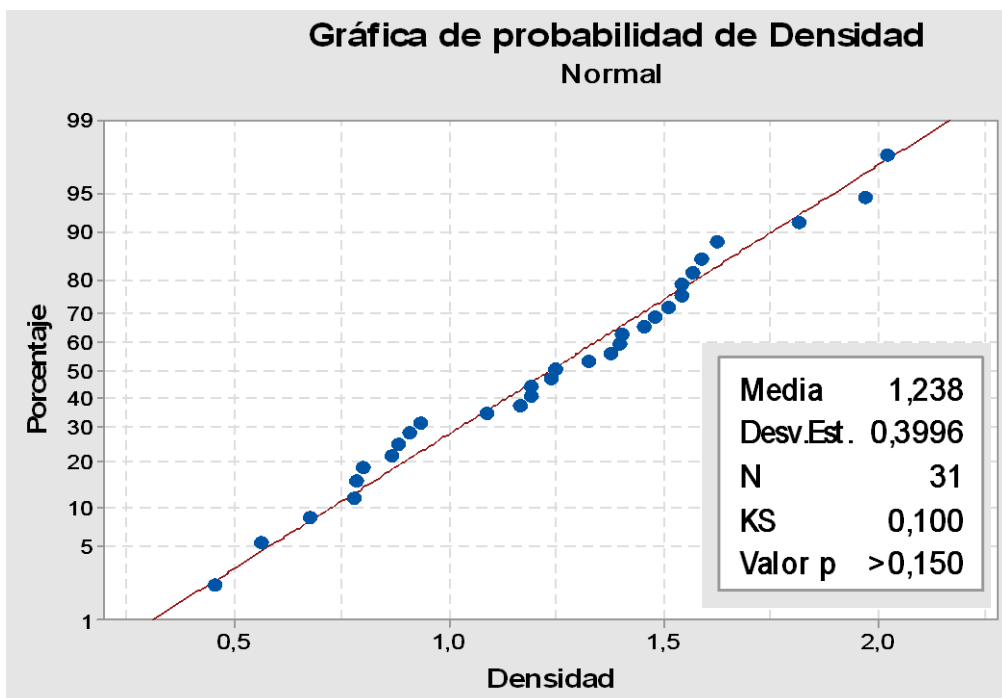


Anexo 7. Resultados análisis estadístico para p-Tau ser 214.

Gráfica 6. Prueba de varianzas iguales para datos de p-Tau ser 214.



Gráfica 7. Prueba de normalidad para datos de p-Tau ser 214.



Conclusión: En ninguna de las dos pruebas se rechaza H_0 debido a que el valor p es mayor a 0,05, por lo tanto los datos obtenidos de p -Tau ser 214 cumplen los dos supuestos y se puede aplicar el anova.

Datos arrojados por el ANOVA

Información del factor

| Factor | Tipo | Niveles | Valores |
|-------------|------|---------|--------------------|
| Tiempo | Fijo | 4 | 15; 105; 360; 2160 |
| Tratamiento | Fijo | 2 | con; sin |

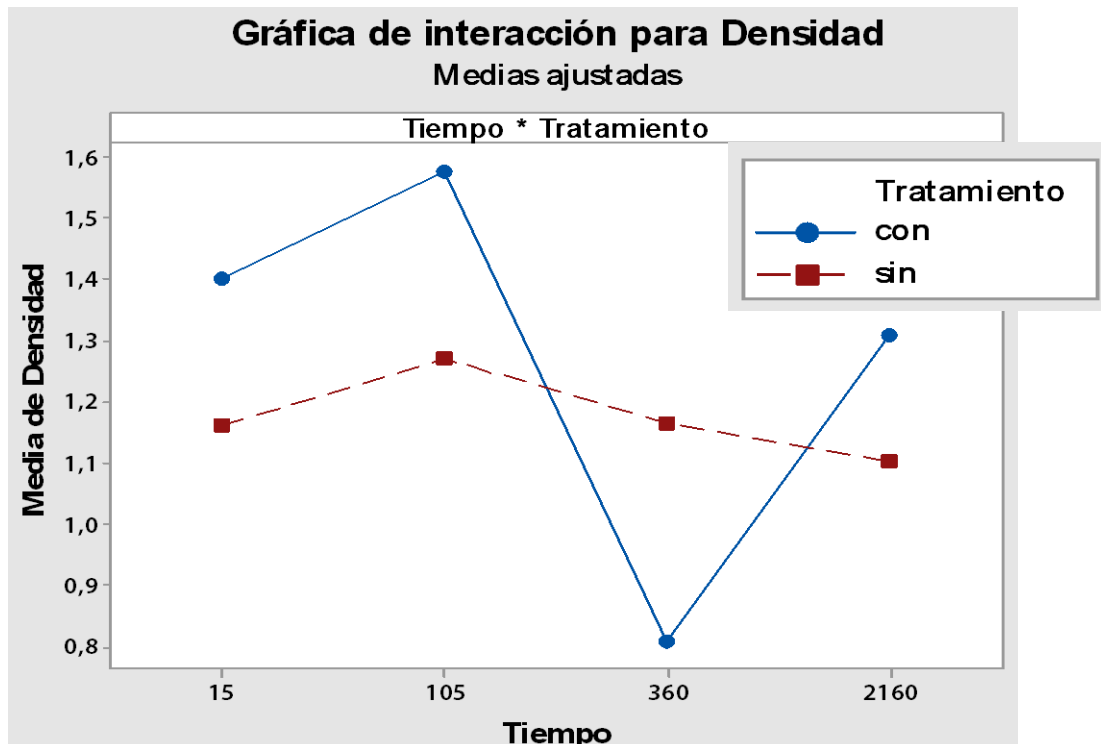
Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Tiempo | 3 | 0,73259 | 0,24420 | 1,59 | 0,218 |
| Tratamiento | 1 | 0,07608 | 0,07608 | 0,50 | 0,488 |
| Tiempo*Tratamiento | 3 | 0,50117 | 0,16706 | 1,09 | 0,373 |
| Error | 23 | 3,52625 | 0,15332 | | |
| Total | 30 | 4,78937 | | | |

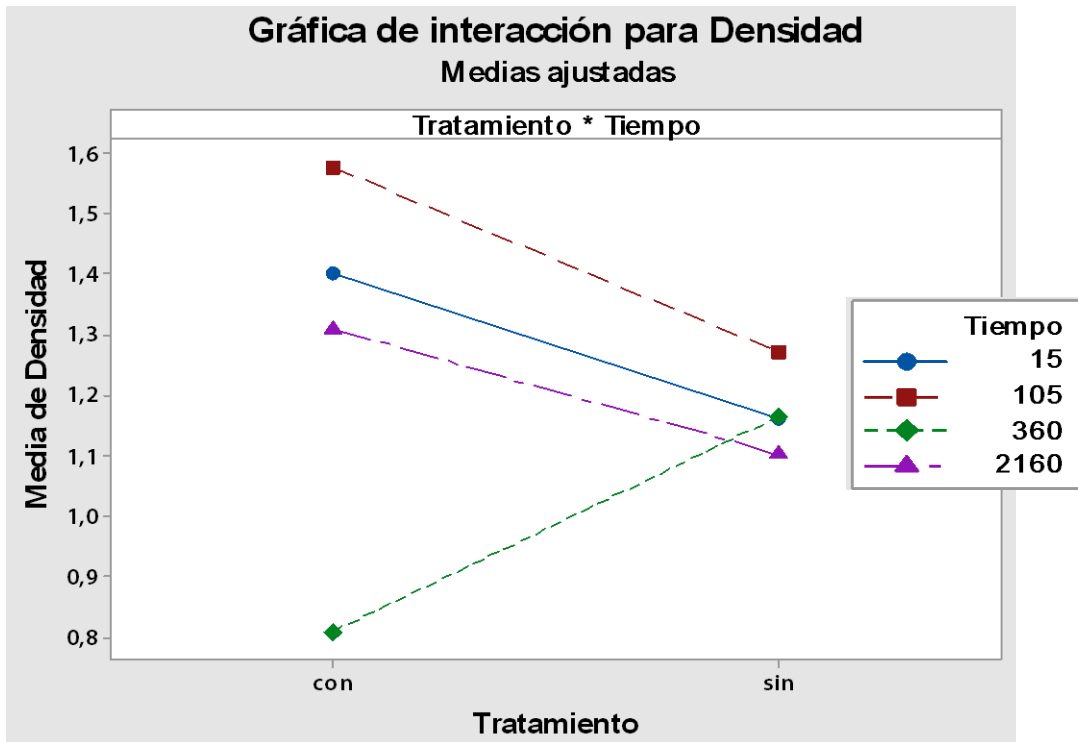
Resumen del modelo

| S | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|----------|---------|--------------------|----------------|
| 0,391555 | 26,37% | 3,97% | 0,00% |

Gráfica 8. Interacción entre tiempos y tratamientos para p -Tau ser 214.



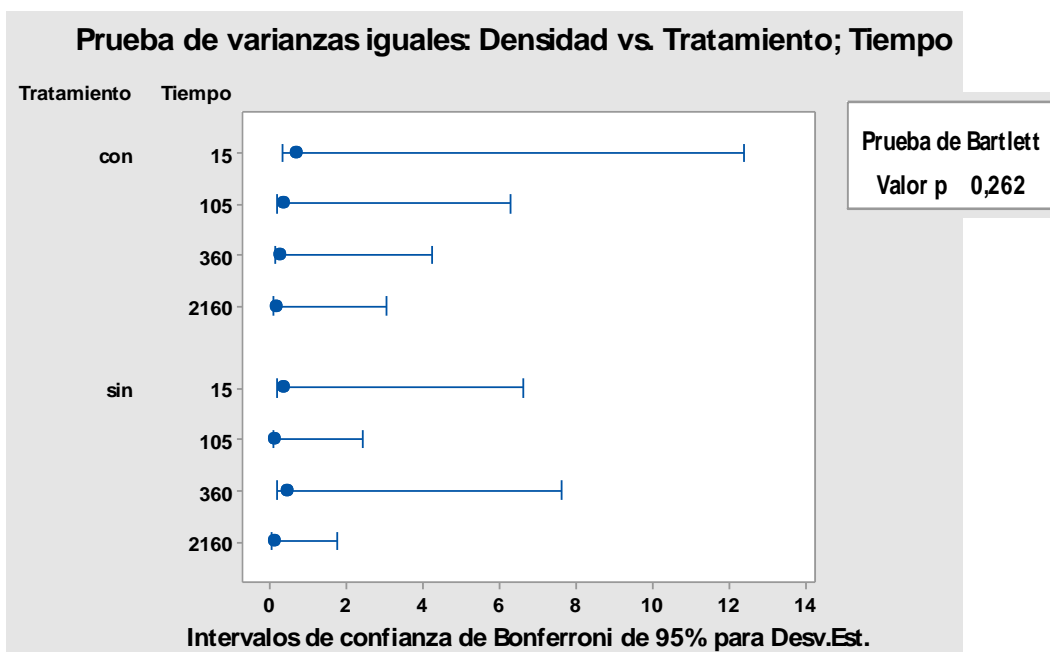
Gráfica 9. Interacción entre tratamientos y tiempos para p-Tau ser 214.



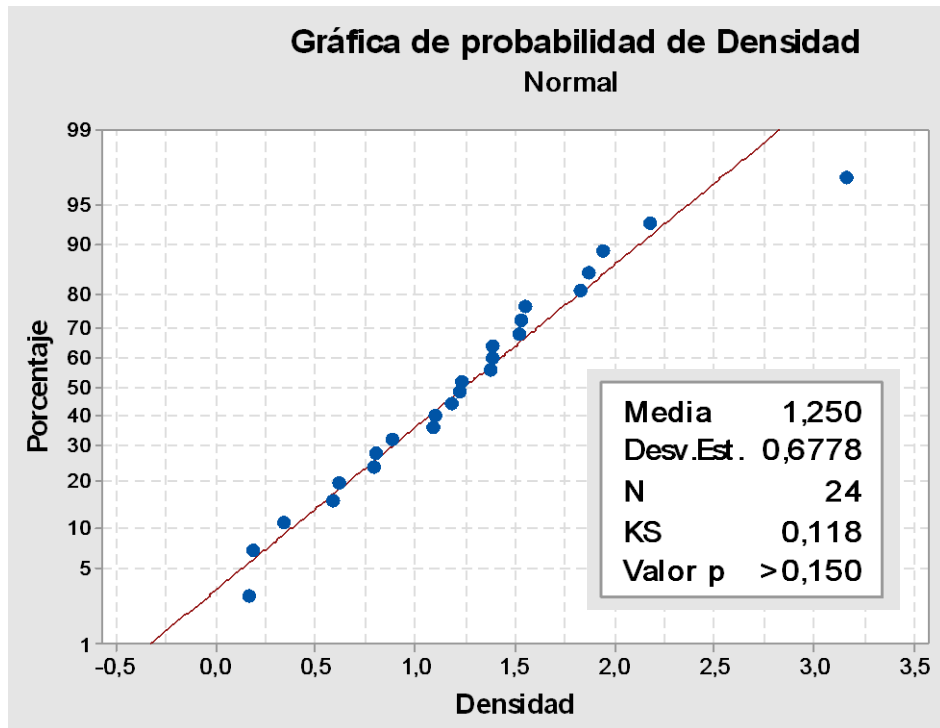
Anexo 8. Resultados análisis estadístico para p-Tau ser 396.

1. ANOVA

Gráfica 10. Prueba de varianzas iguales para datos de p-Tau ser 396.



Gráfica 11. Prueba de normalidad para datos de p-Tau ser 396.



Conclusión: En ninguna de las dos pruebas se rechaza H_0 debido a que el valor p es mayor a 0,05, por lo tanto los datos obtenidos de p-Tau ser 396 cumplen los dos supuestos y se puede aplicar el anova.

Datos arrojados por el ANOVA

Información del factor

| Factor | Tipo | Niveles | Valores |
|-------------|------|---------|--------------------|
| Tiempo | Fijo | 4 | 15; 105; 360; 2160 |
| Tratamiento | Fijo | 2 | con; sin |

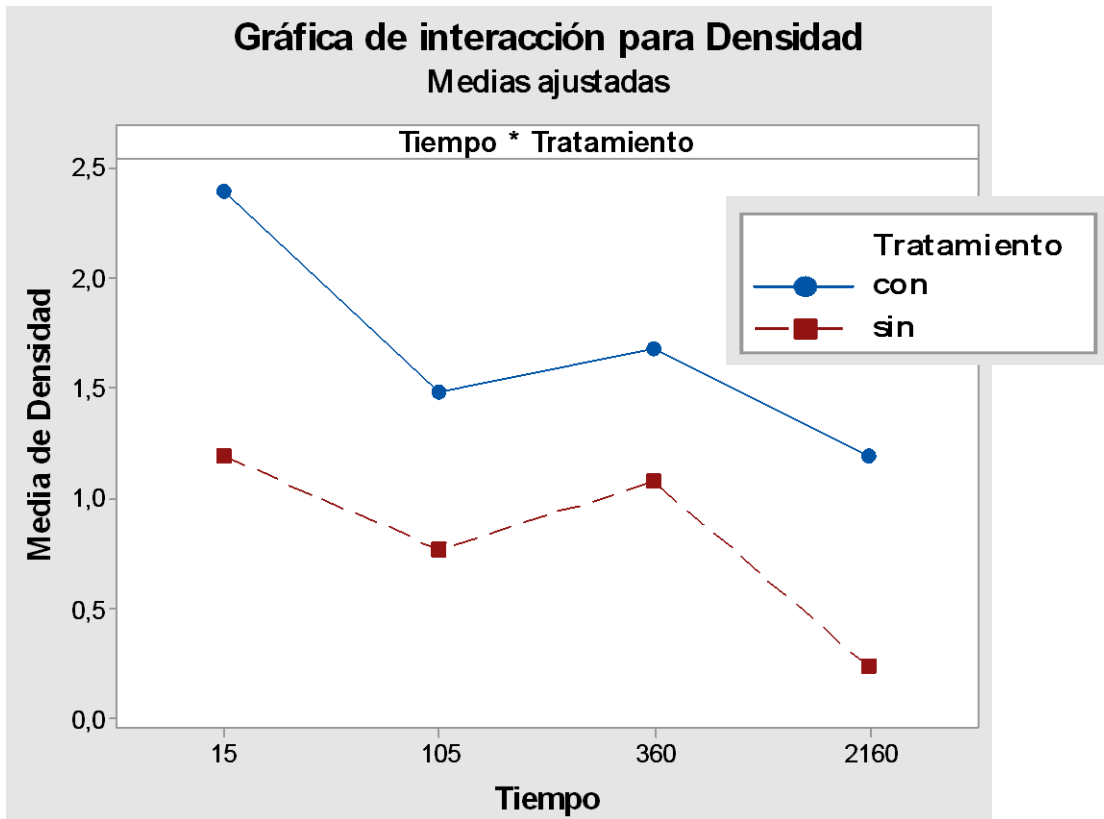
Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Tiempo | 3 | 3,6581 | 1,2194 | 9,48 | 0,001 |
| Tratamiento | 1 | 4,5279 | 4,5279 | 35,21 | 0,000 |
| Tiempo*Tratamiento | 3 | 0,3247 | 0,1082 | 0,84 | 0,491 |
| Error | 16 | 2,0573 | 0,1286 | | |
| Total | 23 | 10,5680 | | | |

Resumen del modelo

| S | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|----------|---------|--------------------|----------------|
| 0,358581 | 80,53% | 72,02% | 56,20% |

Gráfica 12. Interacción entre tiempos y tratamientos para p-Tau ser 396.



Gráfica 13. Interacción entre tratamientos y tiempos para p-Tau ser 396.

