

**EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON GLUCOSAMINA SOBRE LOS  
NIVELES DE EXPRESIÓN Y DE FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA AKT  
EN UN MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL**

**JULIANA QUINTERO BETANCOURT**

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

**EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON GLUCOSAMINA SOBRE LOS  
NIVELES DE EXPRESIÓN Y DE FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA AKT  
EN UN MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL**

**JULIANA QUINTERO BETANCOURT**

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

**Tutora:  
Juliana Rengifo Gómez  
MSc, PhD**

**Cotutor:  
Alejandro Vera González  
MD, MSc, candidato a doctor**

**UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
SANTIAGO DE CALI  
2014**

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	5
2.1. Planteamiento del problema .....	5
2.2. Marco teórico .....	6
2.3. Objetivos e indicadores.....	14
2.4. Metodología y matriz de marco lógico .....	15
2.4.1. Realización de microcirugías .....	15
2.4.2. Conservación de las muestras de tejido cerebral.....	16
2.4.3. Determinación de la concentración de la proteína .....	16
2.4.4. Realización de los geles para electroforesis .....	19
2.4.5. Electroforesis .....	20
2.4.6. Transferencia .....	20
2.4.7. Bloqueo e incubación de la membrana .....	21
2.4.8. Revelado .....	22
2.4.9. Stripping.....	22
2.4.10. Análisis de datos.....	22
2.5. Resultados.....	26
2.6. Discusión .....	32
2.7. Conclusiones .....	38
2.8. Recomendaciones .....	38
3. REFERENCIAS .....	40
4. ANEXOS.....	44
4.1. Anexo 1. Cálculos efectuados .....	44
4.2. Anexo 2. Prueba No-paramétrica Kruskal-Wallis para la expresión de la proteína Akt total .....	45
4.3. Anexo 3. ANOVA para la expresión de la proteína p-Akt thr 308 ....	47
4.4. Anexo 4. ANOVA para la expresión de la proteína p-Akt ser 473....	51
4.5. Anexo 5.....	55
4.6. Anexo 6. Comportamiento de la expresión de p-GSK-3 $\beta$ ser9 .....	56

## LISTA DE ILUSTRACIONES

<b>Ilustración 1.</b> Estructura secundaria de la proteína Akt/PKB.....	11
---	----

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Comportamiento de la expresión de Akt total en corteza frontoparietal de cerebros de ratas sometidas a isquemia cerebral con y sin tratamiento con glucosamina a los diferentes tiempos. ....	27
--	----

<b>Figura 2.</b> Comportamiento de la expresión de p-Akt ser473 en corteza frontoparietal de cerebros de ratas sometidas a isquemia cerebral con y sin tratamiento con glucosamina a los diferentes tiempos. ....	29
---	----

<b>Figura 3.</b> Comportamiento de la expresión de p-Akt thr308 en corteza frontoparietal de cerebros de ratas sometidas a isquemia cerebral con y sin tratamiento con glucosamina a los diferentes tiempos. ....	31
---	----

<b>Figura 4.</b> Tamaño del infarto evaluado con TTC.....	55
---	----

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Grupos experimentales después de sucedido el evento isquémico	16
---	----

<b>Tabla 2.</b> Diluciones para la realización de la curva de calibración.....	17
--	----

<b>Tabla 3.</b> Concentraciones calculadas a partir de la curva del estándar.....	18
---	----

<b>Tabla 4.</b> Cantidad de muestra, agua y buffer para servir en cada pozo de 20µL.....	19
--	----

<b>Tabla 5.</b> Componentes del gel de electroforesis.....	20
--	----

<b>Tabla 6.</b> Siembra de las muestras en el gel de electroforesis .....	20
---	----

<b>Tabla 7.</b> Orden de los anticuerpos utilizados en las membranas .....	21
--	----

<b>Tabla 8.</b> Pruebas t- student ( $p < 0,05$ ) para p-Akt thr 308 .....	47
--	----

<b>Tabla 9.</b> Pruebas t- student ( $p < 0,05$ ) para p-Akt ser 473.....	51
---	----

## LISTA DE GRAFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Curva estándar de proteína realizada por ensayo Bio-Rad con BSA a 595nm.....	18
<b>Gráfico 2.</b> Comprobación del comportamiento normal de los residuos en p-Akt 308.....	47
<b>Gráfico 3.</b> Comprobación del comportamiento normal de las varianzas en p-Akt thr 308 .....	48
<b>Gráfico 4.</b> Interacción para tratamientos y tiempos en p-Akt thr 308 .....	48
<b>Gráfico 5.</b> Interacción para tiempos y tratamientos en p-Akt thr 308 .....	49
<b>Gráfico 6.</b> Comprobación del comportamiento normal de los residuos de p-Akt ser 473.....	51
<b>Gráfico 7.</b> Comprobación del comportamiento normal de las varianzas en p-Akt ser 473.....	52
<b>Gráfico 8.</b> Interacción para tratamientos y tiempos en p-Akt ser 473.....	52
<b>Gráfico 9.</b> Interacción para tiempos y tratamientos en p-Akt ser 473.....	53
<b>Gráfico 10.</b> Caracterización de la presencia de GSK-3 $\beta$ total con los diferentes tratamientos a los diferentes tiempos.....	56
<b>Gráfico 11.</b> Caracterización de la presencia de GSK-3 $\beta$ tyr 216 con los diferentes tratamientos a los diferentes tiempos.....	57
<b>Gráfico 12.</b> Caracterización de la presencia de p- GSK-3 $\beta$ ser 9 con los diferentes tratamientos a los diferentes tiempos.....	58

## RESUMEN

La isquemia cerebral focal afecta a millones de personas en el mundo, ésta se caracteriza por una disminución en el aporte sanguíneo en un área del cerebro, lo que puede afectar el funcionamiento normal de las células cerebrales y por ende la expresión de ciertas proteínas que se encuentran principalmente relacionadas con la muerte celular y la apoptosis. La proteína Akt puede controlar procesos celulares al regular la expresión y la actividad de diferentes proteínas relacionadas con varias fases de la muerte celular, por lo tanto puede estar involucrada en el fenómeno de neuroprotección relacionado con mecanismos de supervivencia de las células. La función de esta proteína puede estar regulada por cambios conformacionales en su estructura, que permiten a las células mejorar muchos mecanismos cuando se encuentran bajo estrés, principalmente la adición de grupos fosfato o N-acetilglucosamina. Se ha comprobado que el aumento de la glicosilación (unión O-N-acetilglucosamina) en las proteínas mejora la supervivencia y ayuda a las células a adaptarse en momentos de estrés celular. De igual manera se ha confirmado que cuando se efectúa un tratamiento con glucosamina en un evento isquémico, se aumentan los niveles de glicosilación en las proteínas celulares, lo que sugiere que puede ser una estrategia de neuroprotección; sin embargo aún no se tiene claridad de la forma en que actúa la glucosamina. Por lo tanto, con el objetivo de establecer el mecanismo por el cual el tratamiento con glucosamina disminuye el tamaño del infarto cerebral, se evaluó el nivel de expresión de la proteína Akt y de dos de sus formas fosforiladas utilizando la técnica de Western Blot en las muestras extraídas de corteza frontoparietal cerebral de ratas con y sin tratamiento con glucosamina a diferentes tiempos después de ocurrida la isquémica cerebral. Se encontró que la glucosamina posee un efecto sobre la expresión de Akt en el tiempo y de igual manera en sus modificaciones post-traduccionales; la fosforilación de Akt en el residuo de treonina 308 que activa a Akt se aumenta de forma significativa en el tratamiento con glucosamina a los 105min y 36 horas de causada la isquemia cerebral. Sin embargo no se encontró cambio significativo en la fosforilación de Akt en el residuo de serina 473 por lo que se sugiere que esta modificación no está relacionada con el proceso de neuroprotección estimulado por la glucosamina. Estos resultados sugieren que dicho cambio en una de las modificaciones post-traduccionales de Akt puede estar relacionado con la disminución del tamaño del infarto cerebral generado en el tratamiento con glucosamina y con los mecanismos de neuroprotección de la glucosamina en la isquemia cerebral.

**Palabras claves:** Isquemia cerebral, Proteína Akt, glucosamina, neuroprotección, O-GlcNAcilación.

## ABSTRACT

Focal cerebral ischemia affects millions of people worldwide, it is characterized by a decrease in the blood supply to an area of the brain, which can affect the normal functioning of brain cells and thus the expression of certain proteins that are directly related to cell death and apoptosis. Akt protein regulates the expression and activity of different proteins related to various stages of cell death processes, therefore may be involved in the activation of neuroprotection mechanisms related to cell survival. The function of this protein may be regulated by conformational changes in its structure, which allow cells to improve many mechanisms when they are under stress, especially the addition of phosphate groups or N-acetylglucosamine. It has been proved that an increase in protein glycosylation (Union O-N-acetylglucosamine) improves survival and helps cells to adapt cellular stressful moments. Similarly it has been confirmed that when a treatment is performed with glucosamine in an ischemic event, protein glycosylation levels are increased, suggesting it may be a neuroprotective strategy; however the mechanisms for this neuroprotection are not clear. Therefore, with the aim to establish the mechanism by which glucosamine treatment decreases the size of cerebral infarction, the expression level of Akt protein and two of its phosphorylated forms was tested using the Western Blot technique, the samples were extracted from frontoparietal cerebral cortex of rats with and without treatment with glucosamine at different times after the occurrence of cerebral ischemia. We found that glucosamine had an effect on the expression of Akt in time and similarly in their post-translational modifications; Akt phosphorylation at threonine residue 308 that activates Akt is significantly increased in the glucosamine treatment at 105min and 36hours after the cerebral ischemia event. However, no significant change was found in the phosphorylation of Akt at serine residue 473 so it is suggested that this modification is not it related to the process of neuroprotection stimulated by glucosamine. These results suggest that this change in one of the Akt post-translational modification may be related to the decrease in brain infarct size generated by the treatment with glucosamine and therefore it may be involved in the neuroprotection mechanisms elicited by glucosamine in cerebral ischemia.

**Keywords:** cerebral ischemia (stroke), Protein Akt, glucosamine, neuroprotection, O-GlcNAc.

## 1. INTRODUCCIÓN

La isquemia cerebral focal es un fenómeno común en los accidentes cerebrovasculares (ACV) y es definida como la disminución del aporte sanguíneo en un área del cerebro hasta un nivel tan insuficiente que no permite mantener el metabolismo y el funcionamiento normal de las células cerebrales (Montaner, 2007). Cuando se presenta un fenómeno de isquemia se da una pérdida celular de forma irreversible (Montaner, 2007) y se compromete también la supervivencia celular de muchas neuronas debido a la incapacidad de sintetizar ATP por la falta de oxígeno y glucosa (Cardinali, 2007).

La muerte neuronal puede presentarse de dos maneras, muerte necrótica y muerte apoptótica, esta última también llamada muerte programada (Arango, et al. 2004). El tipo de muerte celular se diferencia dependiendo de la zona del tejido cerebral en la cual se presente el evento isquémico, las células que mueren por apoptosis son las pertenecientes a la zona de penumbra isquémica y son las células potencialmente salvables después de ocurrido un evento isquémico (Moskowitz et al., 2010); por lo tanto, a estas células van dirigidos todos los esfuerzos terapéuticos que contribuyan a una limitación del daño neuronal y por ende contribuir en el proceso de neuroprotección, atenuando los efectos tras ocurrido un evento isquémico como son la incapacidad física e incluso disminuir la alta tasa de mortalidad a causa de esta enfermedad (Lloyd-Jones et al., 2010).

La proteína Akt es una quinasa que se encuentra relacionada con los procesos de muerte celular, principalmente los causados por apoptosis; tiene como función fosforilar proteínas y así controlar procesos celulares relacionados con varias fases de la muerte celular (Kang, 1999). Siendo así una proteína antiapoptótica que protege de la muerte celular y que por ende, podría estar asociada con la supervivencia de las células neuronales después de ocurrida la isquemia cerebral focal.

Se ha demostrado que la glucosamina disminuye el daño en los tejidos de cerebros de animales sometidos a isquemia (Hwang et al., 2010), lo cual sugiere que es una estrategia de neuroprotección para esta enfermedad, pero la forma en la que actúa la glucosamina para causar dicha neuroprotección aún no se conoce en su totalidad. Con el objetivo de esclarecer los mecanismos celulares por los cuales el tratamiento con glucosamina es capaz de disminuir el tamaño del infarto cerebral, se propuso caracterizar los niveles de expresión de la proteína Akt y y dos de sus formas fosforiladas en un modelo de isquemia cerebral focal en ratas Wistar.

Este proyecto de investigación se llevó a cabo por medio de la técnica de Western Blot determinando así el nivel de expresión y las modificaciones



post-traduccionales de la proteína Akt, lo que permitió comparar de forma cualitativa la participación de la proteína en las muestras extraídas en cerebros con y sin tratamiento con glucosamina, en ratas a las cuales se les ha inducido una isquemia cerebral focal.

## 2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

### 2.1. Planteamiento del problema

Teniendo en cuenta que las enfermedades cerebrovasculares (ECV) son la tercera causa de muerte en todo el mundo (WHO, 2011); y que son la principal causa de discapacidad en el adulto; el aporte de este trabajo va encaminado a la búsqueda de nuevos agentes o estrategias farmacológicas o no farmacológicas, que sean efectivas en el manejo del daño neuronal debido a que los tratamientos clínicos actuales se han centrado en la restauración del flujo sanguíneo cerebral y no en la limitación de este daño. Y muchos de los agentes neuroprotectores se han llevado a juicio clínico sin una base pre-clínica suficientemente convincente basada en la evidencia, lo que ha conllevado a ensayos “fallidos” sin resultados satisfactorios (Ginsberg et al., 2009). En la actualidad, el único tratamiento aprobado para la restauración del flujo sanguíneo celular rompiendo el coágulo que obstruye la arteria cerebral cuando se produce la isquemia cerebral, es el activador tisular del plasminógeno (rtPA) por vía intravenosa. Se ha demostrado su seguridad y eficacia dentro de las tres primeras horas de evolución del evento isquémico; sin embargo debido a que posee una pequeña ventana terapéutica y el riesgo de hemorragia en el tejido isquémico es alto, esto hace que sea utilizado en menos del 5% de los casos (Herrera et al., 2008).

Se ha encontrado que en procesos de estrés agudo la respuesta celular es la clave para la supervivencia, y una de estas respuestas es el aumento rápido de la glicosilación del tipo O-GlcNAc de las proteínas nucleocitoplasmáticas, la glicosilación es una modificación postraduccional esencial de los residuos de serina y treonina, lo que se ve relacionado con la protección de las células (Zachara et al., 2004). La glucosamina (GlcN) aumenta este tipo de glicosilación y se ha encontrado que en un modelo isquemia efectuado mediante la oclusión de la arteria cerebral de ratas puede reducir el volumen del infarto hasta en un 70%, esto a su vez proporcionó una reducción en el deterioro motor y déficit neurológico (Hwang et al., 2010). Estos datos han sido corroborados por nuestro grupo en estudios preliminares en proceso de publicación. Sin embargo los mecanismos por los cuales la glucosamina es capaz de tener este efecto neuroprotector no se conocen completamente.

Por tanto, este proyecto tiene como fin el estudio de la proteína Akt implicada en procesos de muerte y supervivencia celular que se presentan durante la isquemia y su relación con el aumento de los niveles de O-glicosilación provocados con el tratamiento con glucosamina. Estos resultados pueden dar una guía de cómo la glucosamina actúa y de esta manera identificar cómo pueden mejorarse el resultado de dicho tratamiento en la fase clínica como un tratamiento para disminuir los efectos neuronales después de sucedido un evento isquémico.

## 2.2. Marco teórico

A pesar de que el cerebro es un pequeño órgano, que solo constituye el 2% del todo el peso corporal, se puede afirmar que es metabólicamente uno de los más activos de todos los órganos en el cuerpo y por lo tanto, recibe aproximadamente el 15% del gasto cardíaco. A su vez, los procesos que aseguran la funcionalidad del cerebro consumen aproximadamente el 25% del total de la glucosa y 20% de O<sub>2</sub> del cuerpo, cuando se encuentra en estado de reposo (Clarke & Sokoloff, 1999).

La mayor parte de este consumo de energía del cerebro se utiliza para el transporte activo de iones, y para mantener y restaurar los potenciales de membrana que se presentan durante los procesos de excitación y de conducción (Clarke & Sokoloff, 1999).

El cerebro es totalmente dependiente del metabolismo oxidativo ininterrumpido, que se requiere para el mantener su integridad funcional y estructural; debido a que el O<sub>2</sub> que es almacenado es demasiado pequeño en comparación con su tasa de utilización, por lo que requiere de su reposición por medio del flujo sanguíneo continuo. Esto hace referencia a que el flujo sanguíneo debe ser capaz de mantener una tasa promedio de aproximadamente 800mL/min para el cerebro; este valor de flujo sanguíneo cerebral no puede tener caídas y debe mantenerse en un límite bastante estrecho para de esta manera garantizar una perfusión adecuada (Clarke & Sokoloff, 1999).

Los accidentes cerebrovasculares (ACV) son una de las tres causas más frecuentes de coma cerebral y muerte; consiste en la disfunción neurológica producida debido a una reducción del flujo sanguíneo cerebral que puede presentarse como un cuadro neurológico de forma transitoria o definitiva (Cardinali, 2007). La mayor parte de estos ACV que se presentan son de tipo isquémico (85%), y son debidos a un estrechamiento gradual (aterotrombosis) o a una oclusión súbita (embolismo) de alguna de las grandes arterias cerebrales; mientras que el resto de ACV (15%) son de tipo hemorrágico, que se deben a la rotura de algún vaso sanguíneo (Bamford, et al. 1991).

Los diferentes subtipos de ACV mencionados, presentan un fenómeno común que se conoce como *isquemia cerebral*; este fenómeno se debe a la reducción del aporte sanguíneo hasta obtener niveles insuficientes del aporte energético necesario para mantener el metabolismo y funcionamiento normal de las células cerebrales (Montaner, 2007).

Este fenómeno de isquemia cerebral puede presentarse de forma global o focal; la isquemia cerebral focal puede darse de dos maneras dependientes de la duración del evento, en accidente isquémico transitorio o como infarto

cerebral (Díez-Tejedor, E, et al, 2001). Además de esto, también se conoce que cuando se presenta un fenómeno de isquemia intensa y/o prolongada, esto puede conllevar a una pérdida celular de forma irreversible que presenta una lesión a la que se le da el nombre de *infarto cerebral* (Montaner, 2007). Esta muerte neuronal se produce cuando las neuronas son incapaces de sintetizar ATP debido a que no tienen la provisión adecuada de oxígeno y glucosa y por ende, no se tienen los nutrientes necesarios para cada una de las funciones comprometiendo así, la supervivencia celular (Cardinali, 2007).

La muerte neuronal que se presenta en la isquemia puede darse de dos maneras, la *muerte necrótica* en la que hay una pérdida energética que conlleva a una pérdida de la morfología celular, lo que desencadena un proceso de lisis celular que provoca un proceso inflamatorio, y la *muerte apoptótica* o muerte celular programada. La isquemia conduce a muerte neuronal por apoptosis en ciertas áreas del cerebro, dentro de ellas la corteza cerebral, “*esta apoptosis conlleva a la activación de mecanismos intracelulares que van a depender de energía que llevan a una degradación regulada de la célula, que luego se elimina por células fagocíticas sin desencadenar una reacción inflamatoria*” (Arango, et al. 2004).

Una vez se produce un accidente cerebrovascular isquémico focal, la reducción del flujo sanguíneo no se presenta de forma homogénea en el sector afectado del cerebro, el núcleo o foco isquémico que se ve expuesto a la reducción del flujo sanguíneo de una forma más drástica, es sometido a la muerte neuronal necrótica (Arango, et al. 2004). Por otro lado, este núcleo necrótico se rodea por una zona en la que el tejido se encuentra menos afectado con un flujo sanguíneo reducido, esta zona es conocida como *penumbra isquémica* y es aquella que representa la región que puede ser salvada con terapia después de producirse la isquemia cerebral (Broughton, et al. 2009). De esta manera, en contraste con la necrosis, la apoptosis es un proceso que se da de forma ordenada en el que la muerte celular programada depende de la energía disponible en el tejido que se afecta.

Cuando se interrumpe el flujo sanguíneo en las células que se encuentran en la penumbra isquémica se da una cascada de eventos que conducen a la muerte celular, primero se desencadena una falta de oxígeno que va a afectar principalmente la fosforilación oxidativa provocando una disminución de ATP en las células. A pesar de esta disminución, la célula sigue consumiendo energía, por ende ATP, principalmente para el mantenimiento del potencial de la membrana de las mitocondrias (Robbins & Contran, 1999). También se produce un aumento en la concentración de sodio, debido a la falta de síntesis de ATP para que funcione la bomba sodio/potasio (Na<sup>+</sup>/K<sup>-</sup> ATPasa), esto conlleva a que el sodio se acumule dentro de la célula y junto con el agua, arrastra el calcio, produciendo la edematización de la célula. A su vez el potasio sale de la célula al torrente sanguíneo con mayor libertad. El aumento de calcio intracelular puede estar relacionado con daño celular debido a que induce la liberación de neurotransmisores como el

glutamato; la síntesis y liberación de radicales libres en el tejido cerebral isquémico (Moskowitz et al., 2010).

Diversas estrategias han sido desarrolladas para el tratamiento de la isquemia cerebral; estrategias tanto farmacológicas como no farmacológicas han sido evaluadas en los pacientes que son afectados por este fenómeno. Sin embargo, no han sido completamente satisfactorias, resultado que se puede observar claramente en las estadísticas mundiales que ponen a los accidentes cerebrovasculares como la primera causa de incapacidad física en el mundo y la tercera causa de muerte (Arango, et al. 2004). Estas estrategias pueden ser vistas desde dos enfoques, uno es el restablecimiento del flujo sanguíneo y el otro es la disminución del daño neuronal. Pero, los tratamientos clínicos actuales se han centrado en la restauración del flujo sanguíneo, y las terapias encaminadas a la neuroprotección estudiadas hasta ahora realizadas en modelos animales, no han dado resultados concluyentes en ensayos clínicos con pacientes (Ginsberg, 2008).

Se han estudiado diversas sustancias que actúan en diferentes puntos de la cascada que se desencadena cuando se presenta un ACV, y que pueden interferir en diversos procesos con el fin de prolongar la vida de la neurona. La neuroprotección se puede inducir de tres maneras diferentes; la neuroprotección primaria que se produce cuando se utiliza un fármaco que incrementa la resistencia de la neurona al daño isquémico. Por otro lado, la neuroprotección secundaria que hace referencia a la intervención farmacológica que interfiere con los procesos patogénicos que se desencadenan después de que se ha instaurado la lesión isquémica; estos procesos más tardíos son responsables de la muerte neuronal de forma necrótica o apoptótica. Y por último, la neuroprotección terciaria que se dirige a potenciar la capacidad de recuperación del tejido nervioso previamente lesionado, con el fin de mejorar la plasticidad neuronal y la recuperación de éste tejido (Arango, et al. 2004).

### **Tratamiento con glucosamina como citoprotector**

En la actualidad, el activador de plasminógeno tisular (tPA) es el único medicamento aprobado por la FDA para la destrucción del coágulo y restablecimiento del flujo sanguíneo en infarto cerebral (Moskowitz et al., 2010), se ha demostrado su seguridad y eficacia dentro de las tres primeras horas de evolución del evento isquémico; sin embargo debido a que posee una pequeña ventana terapéutica y el riesgo de hemorragia en el tejido isquémico es alto, esto hace que sea utilizando en menos del 5% de los casos (Herrera et al., 2008).

Lo anterior se debe a que en las investigaciones enfocadas en la neuroprotección del tejido afectado por un evento isquémico han sido fallidas en los estudios clínicos y solo han llegado a ser efectivas en los estudio

preclínico con animales, por lo que no se presenta una mejoría neurológica en los pacientes evaluados con accidentes cerebrovasculares agudos (O'Collins et al, 2006).

Uno de los tratamientos sugeridos para conseguir un efecto neuroprotector frente al proceso de daño neuronal que se desencadena durante la isquemia cerebral es el tratamiento con glucosamina. La glucosamina (2-amino-2-desoxi-D-glucosa; GlcN) es un azúcar natural que se sintetiza a partir de glucosa por prácticamente todas las células y es un componente esencial de las glicoproteínas y proteoglicanos (Hwang, et al. 2010). La GlcN ha sido utilizada para el tratamiento de la osteoartritis debido a que se cree que resulta beneficiosa con el aumento en la síntesis de proteoglicanos estructurales en el cartílago articular (Santos, et al. 2011); y actualmente se han encontrado efectos citoprotectores de GlcN en la isquemia cerebral focal, principalmente en la reducción del volumen del infarto que se comprobó utilizando un modelo de isquemia en cerebros de ratas con una disminución del 70%, que se le atribuyó a la supresión de factores pro-inflamatorios (Hwang, SY, et al, 2010). Estos datos han sido corroborados por nuestro grupo en estudios preliminares en proceso de publicación. Sin embargo los mecanismos por los cuales la glucosamina es capaz de tener este efecto neuroprotector no se conocen completamente (véase Anexo 5). Se encontró una disminución significativa del tamaño del infarto medido como porcentaje del volumen del cerebro en los grupos sin tratamiento y con tratamiento con glucosamina.

Se ha encontrado que en procesos de estrés agudo la respuesta celular es la clave para la supervivencia, y una de estas respuestas es el aumento rápido de la glicosilación del tipo O-GlcNAc de las proteínas nucleocitoplasmáticas. La glicosilación es una modificación postraduccional esencial de los residuos de serina y treonina, lo que se ve relacionado con la protección de las células. Se cree que O-GlcNAc actúa como un modulador de las funciones de las proteínas; esta adición de O-GlcNAc al esqueleto de las proteínas se da de forma dinámica y responde a factores como el ciclo celular y cambios en el metabolismo de la glucosa (Zachara et al., 2004). Incluso, en respuesta a las múltiples formas de estrés, las células aumentan rápidamente la captación de glucosa y en muchos estudios, se encontró que bloqueando tanto la glucólisis y la ruta de biosíntesis de hexosamina se produce una disminución de la supervivencia de las células (Zachara et al., 2004).

Se ha encontrado que incrementar el flujo de GlcN mejora la tolerancia frente a la isquemia mediada por un aumento de los niveles de O-GlcNAc (N-acetilglucosamina) (Hwang, SY, et al, 2010). El aumento de la infusión GlcN eleva la UDP-GlcN, un sustrato obligatorio para la transferencia de la O-GlcNAc a las proteínas por O-GlcNAc transferasa. Los cambios en el nivel de O-GlcNAc afectan la actividad de muchas enzimas o proteínas, incluyendo factores de transcripción y los componentes de la proteasoma (Hwang, et al. 2010).

Existen muchos mecanismos complejos por los cuales O-GlcNAc actúa; se ha demostrado que pueden alterar el comportamiento de algunas proteínas específicas mediante la modulación de: el tratamiento de la semivida y proteolítica de las proteínas, la localización subcelular, interacciones proteína-proteína, la unión al ADN, y la actividad enzimática o su regulación. Uno de los mecanismos que se conoce por los cuales se pueden mediar estos eventos, es por medio de la alteración de la fosforilación de las proteínas. Cabe mencionar que la fosforilación y O-GlcNAc son recíprocas en algunas proteínas; sugiriendo a su vez que la O-GlcNAc y la fosforilación pueden modularse entre sí (Zachara, et al. 2004). Además, se ha encontrado en forma experimental, que la fosforilación y la glicosilación son importantes en la regulación de las condiciones de estrés que se generan en la isquemia cerebral. Sin embargo, la competencia que se genera cuando la fosforilación y O-GlcNAc ocupan el mismo residuo en una proteína es una de las formas en las que interaccionan estas modificaciones post-traduccionales, pueden también actuar de forma competitivas o sinérgicamente dependiendo del residuo en el que se encuentren (Zeidan & Hart, 2010).

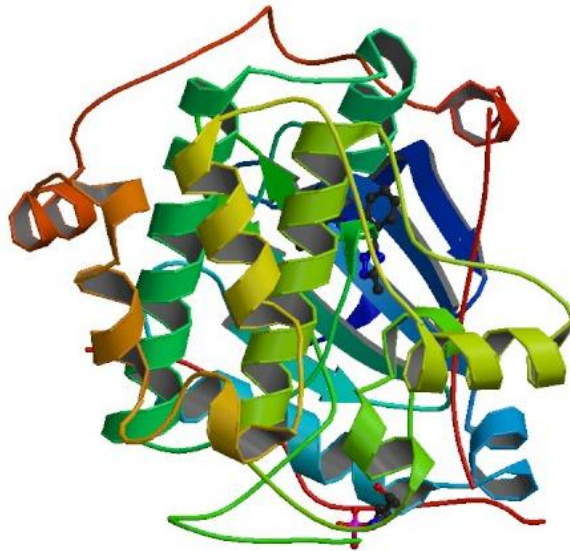
### **Proteína implicada en la muerte celular: Proteinkinasa B (Akt)**

Cuando sucede un evento isquémico como se mencionó anteriormente, la muerte celular puede darse por muerte necrótica y por muerte apoptótica; sin embargo, las células también tienen mecanismos relacionados con la supervivencia celular en los cuales pueden estar implicadas proteínas que evitan la muerte celular, siendo este el caso de la proteína Akt por medio de la cascada de regulación de (PI3K)/c-Akt (Rameh & Cantley, 1999).

La proteína Akt (proteinkinasa B), fue identificada en un inicio como un oncogén por su capacidad de transformación de las células normales en células malignas debido a que tiene como función evitar que la célula llegue a sufrir un proceso de apoptosis cuando esta lo requiera. Sin embargo, después su papel se caracterizó como la proteína anti-apoptosis que protege de la muerte celular inducida (Kang, et al. 1999). La proteína Akt participa en diversos procesos como la activación de factores de transcripción, la síntesis de proteínas, el control del metabolismo de la glucosa, el control de la apoptosis, la proliferación celular, la migración celular y la angiogénesis (Galetic, et al. 1999).

La cascada de regulación (PI3K)/c-Akt implica que la proteína PI3K active unos intermediarios celulares, como lo son las proteínas Akt/PKB, PKA, PKC (Rameh & Cantley, 1999); y al ser estas proteínas que dependen de segundos mensajeros, se dice que requieren de la fosforilación para ser activadas (Yang et al, 2002). La proteína Akt/PKB es la proteína de interés sin embargo se debe tener en cuenta que la quinasa PKB presenta tres isoformas PKB $\alpha$  (Akt1), PKB $\beta$  (Akt2) y PKB $\gamma$  (Akt3) que se diferencian en los residuos que requieren ser fosforilados para su activación (Datta et al, 1999);

La proteína Akt se encuentra formada por dos dominios, un dominio de quinasa formado por dos lóbulos (N-terminal y C-terminal), éste se encuentra ubicado en el centro de la proteína, una vez fosforilado se encarga de fosforilar residuos de serina y treonina en las proteínas blanco. El lóbulo C-terminal es el que posee el segmento de activación de la quinasa que presenta el sitio de unión a la proteína diana; y además posee un dominio hidrofóbico que es el encargado de regular la actividad de la proteína (Yang et al, 2002).



**Ilustración 1.** Estructura secundaria de la proteína Akt/PKB obtenida de PDB (3D0E)

Se ha encontrado que una diversa gama de estímulos fisiológicos puede inducir la actividad de Akt hasta en 40 veces y especialmente en la forma dependiente de PI3K; cuando se inicia la cascada de regulación, la proteína PI3K genera fosfolípidos fosforilados que se van a unir a Akt1, lo que provoca que los residuos de ser 473 y thr 308 queden disponibles debido a la translocación de la proteína desde el citoplasma a la superficie interna de la membrana plasmática para ser fosforilados por diversas quinasas. Esta activación se encarga de regular la respuesta a la apoptosis y la activación de mecanismos de supervivencia celular (Datta et al, 1999). Por lo tanto, a diferencia de otros residuos como ser-thr-124 y 450 que son basalmente fosforilados, thr-308 y ser-473 requieren estímulos extracelulares que induzcan su fosforilación.

A diferencia de la muerte celular por necrosis, la apoptosis es un proceso activo de muerte celular que requiere la activación de los genes asociados y síntesis de sus proteínas codificadas. La proteína Akt fosforila varios objetivos intermedios de la supervivencia y las vías de apoptosis, inhibiendo la muerte celular (Sun, et al. 2011); en cuanto a la expresión de genes de supervivencia, se encarga de promover la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B



por fosforilación y la activación de la quinasa I $\kappa$ B, que a su vez induce la transcripción de numerosos genes antiapoptóticos como cIAP1, cIAP2, A1 y BFL1. Y en el caso de la inhibición de la muerte celular, se encarga de desactivar proteínas como la Bad, la caspasa 9 y el factor de transcripción Forkhead. La fosforilación de la Bad permite que esta permanezca en la mitocondria e inhiba la apoptosis; la fosforilación de las caspasa 9 produce una desactivación de su función catalítica por lo que se reduce su actividad proteasa, y la fosforilación del factor de transcripción Forkhead impide la síntesis de la proteína proapoptótica, ligando de Fas (Galetic, et al. 1999).

Se ha encontrado en otros estudios, que la fosforilación de Akt se acelera de forma temporal en la corteza cerebral después de sucedido un evento isquémico cerebral transitorio, sin embargo, en el núcleo isquémico la fosforilación se ve disminuida (Noshita, et al. 2001).

Estos eventos dan una idea de cómo la fosforilación de la proteína Akt está asociada con la supervivencia de las células neuronales después de la isquemia cerebral focal provocada; sin embargo hay que tener en cuenta que, de acuerdo a ciertos estudios, se ha observado que en el núcleo isquémico el daño neuronal es extremadamente letal, por lo tanto la supervivencia de la proteína se ve afectada; mientras que cuando la lesión se presenta en la corteza en zona de penumbra, se puede promover la activación de la proteína Akt porque el daño regional es moderado, lo que indica que la diferencia puede ser causada al grado de daño celular (Noshita, et al. 2001).

### **La proteína Akt y la O-GlcNAcilación**

La serina/treonina Akt1 afecta una amplia gama de funciones celulares; su activación aumenta el transporte de glucosa, regula la transcripción de genes, y promueve la supervivencia celular, y dentro de sus sustratos se encuentra la glucógeno sintasa quinasa-3b (GSK3b) que es fosforilada por Akt1 en su residuo de ser-9 inhibiendo así la actividad de ésta (Gandy & Rountree, 2006).

Cuando se presentan situaciones de estrés como se mencionó anteriormente, las células experimentan glicosilación del tipo O-GlcNAc de forma dinámica así como la fosforilación (Zachara et al., 2004). La fuente principal de GlcNAc para el O-GlcNAc-modificación es la vía de biosíntesis de hexosamina (HBP) y se ha encontrado que muchas proteínas son modificadas después de la traducción con GlcNAc-O y esto afecta varios procesos bioquímicos, incluyendo la transducción de señales, la localización de proteínas y las interacciones proteína-proteína (Gandy & Rountree, 2006).

En un estudio realizado en el 2006 en la Universidad de Alabama en Birmingham, se encontró que una porción citosólica de Akt1 se modificó dinámicamente con O-GlcNAc; esto se observó realizando un tratamiento de

células las SH-SY5Y con PUGNAC (O-(2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosilidene) amino-N-fenilcarbamato), que se encarga de inhibir la eliminación enzimática de O-GlcNAc a partir de proteínas (Gandy & Rountree, 2006). De igual manera, con otras investigaciones se ha encontrado que la proteína Akt es regulada con la incorporación de grupos O-GlcNAc, en una de ellas se determinó que la eliminación de la modificación de tipo O-GlcNAc aumentaba su fosforilación en células hepáticas a concentraciones fisiológicas de glucosa, sin embargo, no está claro que la proteína se regule mediante glicosilación directa o si su regulación se dé por medio de otra proteína (Soesanto et al, 2008).

Se ha encontrado que Akt puede ser modificada por O-GlcNAcilación especialmente en ser-473 y que puede haber competencia de la modificación por O-glicosilación y la fosforilación (Kang & Han, 2008), generando disminución de Akt en su forma fosforilada; sin embargo también se ha encontrado que Akt puede estar en su forma fosforilada y o-glicosilada de manera simultánea (Gandy & Rountree, 2006). Todo esto conlleva a pensar que todo depende del tipo de célula, la vía que predomine en su activación, del evento que se esté presentando en ese momento para que se dé el cambio en el tipo de modificaciones post-traduccionales.

## 2.3. Objetivos e indicadores

### Objetivo general

Evaluar la participación de la proteína Akt en el proceso de citoprotección generado por un tratamiento con glucosamina en ratas Wistar como modelo experimental de isquemia cerebral focal.

### Objetivos específicos

Comparar el nivel de expresión de la proteína Akt en el cerebro de ratas Wistar sometidas a isquemia cerebral focal, con y sin un tratamiento con glucosamina a diferentes tiempos después de ocurrido el evento isquémico.

Comparar el nivel de fosforilación de la proteína Akt en el cerebro de ratas Wistar sometidas a isquemia cerebral focal, con y sin un tratamiento con glucosamina a diferentes tiempos después de ocurrido el evento isquémico.

### Indicador

Cuantificación por densitometría de la intensidad de las bandas de Akt, p-Akt ser-473 y p-Akt thr 308, de los inmunoblots obtenidos por Western-Blot y su análisis utilizando la prueba t-Student y ANOVA, con el fin de determinar si hay diferencias significativas en la expresión y fosforilación de Akt entre los grupos experimentales.

## **2.4. Metodología y matriz de marco lógico**

### **Metodología**

El procedimiento experimental en animales fue evaluado y autorizado por el comité de ética animal conjunto entre la Universidad Icesi y el Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM)

#### **2.4.1. Realización de microcirugías**

Se realizó el acompañamiento a las microcirugías efectuadas en ratas macho albinas de la especie Wistar (*Rattus norvegicus*) con una edad entre 10-14 meses y con un peso entre 300-350 gramos; estas cirugías se realizaron bajo el modelo de isquemia cerebral focal MCAO (Middle Cerebral Arterial Occlusion) que provoca la isquemia cerebral en las ratas.

El procedimiento se realizó bajo anestesia inhalatoria con isoflurano, evaluando constantemente las funciones cardiorespiratoria, temperatura rectal y la actividad electroencefalográfica. La oclusión de la arteria cerebral media derecha se llevó a cabo mediante la técnica de inserción de un filamento intraluminal recubierto (Belayev, Alonso, Busto, Zhao, & Ginsberg, 1996; Longa, Weinstein, Carlson, & Cummins, 1989) modificada (Arango-Dávila, Pimienta, & Escobar, 2002). Se colocó el animal en una mesa quirúrgica y se realizó el procedimiento quirúrgico (Arango-Dávila et al., 2002) con algunas modificaciones. Se realizó una incisión en la línea media del cuello con el fin de localizar la arteria carótida común (ACC) utilizando un microscopio quirúrgico; ésta se separó del nervio, y se introdujo un nylon monofilamento bañado en una solución de poli-L-lisina a través del tronco de la arteria carótida común externa, este filamento se insertó hasta una longitud de 19,5mm avanzando hasta la arteria carótida interna derecha y de esta manera ocluir el flujo sanguíneo hacia la arteria cerebral media. A continuación se cierra la herida quirúrgica y se deja el extremo del nylon expuesto, y se pasa la rata a un proceso de recuperación con acceso libre a agua y alimentación, controlando su temperatura corporal de 37°C.

Las cirugías que se llevaron a cabo fueron las siguientes, con un n=4 por cada grupo:

- Grupo control: Procedimiento quirúrgico invasivo sin isquemia y sin tratamiento con glucosamina
- Procedimiento quirúrgico invasivo sin isquemia, con tratamiento con glucosamina
- Procedimiento quirúrgico invasivo con isquemia y sin tratamiento con glucosamina

- Procedimiento quirúrgico invasivo con isquemia y con tratamiento con glucosamina

A continuación se presentan los diferentes grupos experimentales con los diferentes tiempos después de ocurrida la isquemia cerebral en las ratas, además se debe tener en cuenta que se tienen cuatro individuos por cada grupo

**Tabla 1.** Grupos experimentales después de sucedido el evento isquémico

Tiempo después de la isquemia	0 min (sham)		15 min		105 min		6 horas		36 horas	
Glucosamina	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Grupo	E	F	K	L	M	N	B	D	O	P

\*Sham: Control sin producida la isquemia \*n=4

De acuerdo a cada uno de los tiempos a evaluar después de ocurrido el evento isquémico se llevó a cabo la eutanasia por parte del médico-cirujano con el fin de extraer el cerebro y de esta manera con una microdissección separar el tejido a evaluar, en este caso la corteza cerebral específicamente la corteza frontoparietal derecha.

#### **2.4.2. Conservación de las muestras de tejido cerebral**

Las muestras se homogenizan con el Buffer de Lisis con PUGNAc (inhibidor de O-GlcNAcase) inhibidor de fosfatasa e inhibidor de proteasas en una proporción 1:1000 respectivamente, con el fin de evitar la degradación y/o desfosforilación de las proteínas; se utilizó 500 µL por cada tejido, luego se llevaron a un tubo Eppendorf las muestras de los cuatro individuos por cada tubo. Se utilizó un rotor estator a velocidad media por 45 segundos para completar el homogenizado. A continuación se centrifugaron a 4°C durante 3 minutos a 13000rpm, y el sobrenadante se almacenó a -80°C (Laboratorio de fisiología animal, Universidad Icesi, procedimiento operativo estandarizado POE para extracción y conservación de cerebros de rata, versión 1).

#### **2.4.3. Determinación de la concentración de la proteína**

Para asegurar la cantidad de proteína presente en los diferentes homogenizados se realizó una curva de calibración utilizando el método de Bradford en el que se emplea un colorante hidrófobo que al encontrarse al interior de la proteína origina un color azul intenso fácilmente medible (Kruger, 1994); por lo tanto de

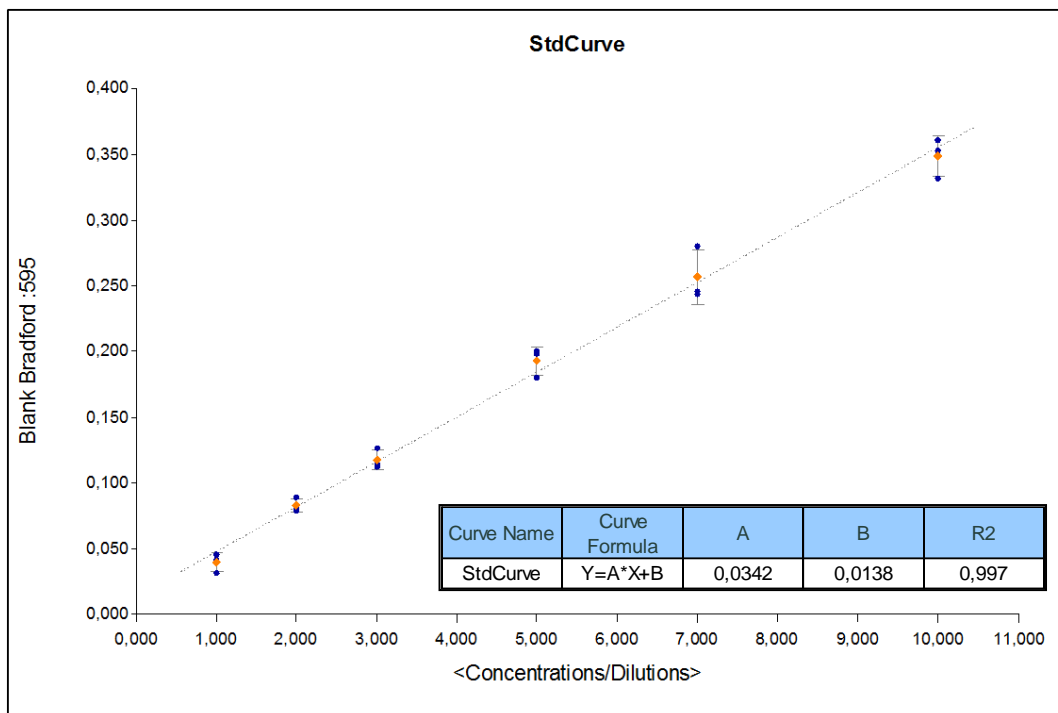
acuerdo a la concentración de la proteína el reactivo cambia su color e intensidad. Hay que tener en cuenta que esta reacción es dependiente del tiempo, por lo tanto se realizó dentro de los rangos especificados.

La curva estándar se efectuó con diferentes diluciones de un stock de albumina de suero de bovino (BSA) de 0,125  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en buffer fosfato salino (PBS) 1X. Se tuvo en cuenta que el proveedor del reactivo de coloración Bradford reportó que el rango de concentración era entre 1.2 a 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se efectuaron las siguientes diluciones:

**Tabla 2.** Diluciones para la realización de la curva de calibración

<b>Concentración (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b>Volumen de stock BSA (0,125<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b>Volumen de PBS 1X (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Volumen de reactivo Bradford (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
1	8	792	200
2	16	784	200
3	24	776	200
5	40	760	200
7	56	744	200
8	80	720	200

Después de la realización de las anteriores diluciones con el reactivo, se dejó pasar 25 minutos y se leyó por triplicado en un lector de microplacas (Synergy™ H1) cuyo error en exactitud es menor al 2% y precisión menor al 0,5%. La curva del estándar fue la siguiente:



**Gráfico 1.** Curva estándar de proteína realizada por ensayo Bio-Rad con BSA a 595nm

Para realizar la curva de las muestras homogenizadas se realizó el siguiente tratamiento:

1. Se tomó 1 $\mu$ L de la muestra y se diluyó en 1000  $\mu$ L de PBS 1X
2. Se tomó de lo anterior 500  $\mu$ L y se diluyó en 300  $\mu$ L de PBS 1X y en 200  $\mu$ L de reactivo de Bradford (dilución total 1:2000)
3. Se leyó en lector de placas después de 25 minutos

**Tabla 3.** Concentraciones calculadas a partir de la curva del estándar

Grupo	Absorbancia (nm)	Concentración de proteína con dilución ( $\mu$ g/mL)
F	0,162	8616
L	0,206	11174
N	0,236	12919
B	0,173	9256
P	0,186	10012

E	0,176	9430
K	0,162	8616
M	0,342	19081
D	0,165	8791
O	0,340	18965

Una vez obtenidas las concentraciones calculadas a partir de la curva del estándar (*veáse cálculo en Anexo 1*) se calculó la cantidad de muestra que debió servirse en cada uno de los pozos estableciéndose 30µg por cada pozo.

**Tabla 4.** Cantidad de muestra, agua y buffer para servir en cada pozo de 20µL

Grupo	F	L	N	B	P	E	K	M	D	O
<b>cantidad µg</b>	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
<b>volumen µL</b>	3,48	2,68	2,32	3,24	3,00	3,18	3,48	1,57	3,41	1,58
<b>volumen muestra µL</b>	3,48	2,69	2,32	3,24	2,99	3,18	3,48	1,57	3,41	1,59
<b>volumen buffer 2X µL</b>	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
<b>volumen de agua µl</b>	6,52	7,32	7,68	6,76	7,00	6,82	6,52	8,43	6,59	8,42
<b>volumen total µl</b>	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

#### 2.4.4. Realización de los geles para electroforesis

Para llevar a cabo la electroforesis, se prepararon geles de poliacrilamida al 8%, con 12 pozos y se almacenaron por un día en nevera a 9°C. Los componentes del gel y sus cantidades fueron las siguientes:



**Tabla 5.** Componentes del gel de electroforesis

<b>Componentes</b>	<b>Running</b>	<b>Stacking</b>
Agua destilada	11,5mL	4,1mL
Mezcla acrilamida 30%	6,7mL	1,0mL
TRIS 1,5M	(pH 8,8) 6,3mL	(pH 6,8) 750µL
SDS al 10%	250µL	60µL
Persulfato de amonio al 10%	250µL	60µL
TEMED	15µL	6µL

#### **2.4.5. Electroforesis**

Se llevó a cabo la electroforesis realizando el montaje adecuado, y utilizando los geles preparados anteriormente que contienen doce pozos cada uno, diez para las muestras de los diferentes grupos experimentales y los otros dos (exactamente el primero y el quinto) en donde se sembró el marcador de peso molecular. La cantidad de muestra se diluyó hasta alcanzar 10µL y se adicionaron 10µL de buffer de carga Laemmli 2x, luego se calentaron por cinco minutos a 95°C y se centrifugaron por 30 segundos aproximadamente.

**Tabla 6.** Siembra de las muestras en el gel de electroforesis

<b>No. pozo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>Grupo</b>	MP	F	L	N	B	P	MP	E	K	M	D	O

MP: Marcador de peso molecular\*

Una vez sembradas las muestras y el marcador de peso molecular se encendió la fuente de poder con un voltaje de 150V, una corriente de 0,12A por un tiempo de 1 hora y cuarenta minutos.

#### **2.4.6. Transferencia**

Una vez obtenida la electroforesis se procedió con la transferencia, en la cual se pretendió pasar las proteínas que se separaron mediante la electroforesis a una membrana de PVDF (fluoruro de polivilideno); esta membrana se activó

previamente con metanol. A continuación se armó el sándwich utilizando un casete, de la siguiente manera:

España/ papel/ gel/ membrana/ papel/ esponja

Se armaron los dos geles en dos casetes diferentes que luego se ubicaron en el montaje para la transferencia de tal forma que las proteínas se acomodan para migrar del gel a la membrana de transferencia, y se utilizó un buffer de transferencia. Se encendió la fuente de poder con un voltaje de 150V, una corriente de 0,6A, un tiempo de dos horas y quince minutos, y se tuvo bajo refrigeración constante a través de una bomba de agua fría.

#### 2.4.7. Bloqueo e incubación de la membrana

Una vez terminada la transferencia se realizó el bloqueo de la membrana utilizando una solución de TBST + BSA al 3% (Tris-Buffer Salino y Tween 20 y albumina de suero bovino, respectivamente) con el fin de evitar la unión no específica de los anticuerpos primarios y/o secundarios a la membrana, durante una hora utilizando un shaker a temperatura ambiente, con una velocidad de 13rpm y un ángulo de 15°.

Una vez la membrana fue bloqueada se incubó con los siguientes anticuerpos primarios:

**Tabla 7.** Orden de los anticuerpos utilizados en las membranas

Orden	Anticuerpo	Dilución	Hospedador
1	AKT 1/2/3 H-136	1:500	Rabbit
2	B- actina	1:500	Mouse
3	p- Akt thr 308	1:500	Rabbit
4	p- Akt ser 473	1:500	Rabbit
5	RL2	1:500	Mouse

Cada anticuerpo se diluyó con solución de bloqueo (TBST+BSA 3%) y con azida de sodio. Las incubaciones se hicieron durante toda la noche a 4°C con agitación constante. Al día siguiente, se realizaron cinco lavados con TBST 1X con el fin de retirar el anticuerpo y cada uno durante cinco minutos. Posteriormente se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo secundario anti-hospedero (rabbit o mouse) que se encuentra conjugado con peroxidasa de rábano en una dilución 1:3000 con TBST+BSA 3% durante una hora a

temperatura ambiente. Por último se retiró el anticuerpo secundario realizando cinco lavados con TBST 1X cada uno durante cinco minutos.

#### **2.4.8. Revelado**

Debido a que los anticuerpos secundarios se encuentran conjugados con peroxidasa de rábano, esto permite que por medio de una reacción de oxidación del luminol se genere una quimioluminiscencia capaz de sensibilizar una película fotográfica. Se empleó un kit de quimioluminiscencia con el que se incubó las membranas durante cinco minutos. En el cuarto oscuro se procedió al revelado de las membranas poniéndolas en contacto con una película fotográfica en un tiempo determinado que permitió que después de pasar la película a través de la máquina de revelado se obtuviera una radiografía en donde se visualizaron las bandas correspondientes a la proteína.

A continuación, las películas se ubican en un transiluminador para tomarles fotos que son tratadas digitalmente con el programa gratuito *Image J*, desarrollado por el Instituto Nacional de Salud (NIH) en Estados Unidos, que permite un análisis densitométrico de las imágenes. En la imagen, se selecciona un área rectangular fija capaz de abarcar cada una de las bandas en su totalidad, lo que permite obtener un análisis de la intensidad de las bandas que se mide en número de pixeles. Los datos obtenidos de densidad óptica se exportan para realizar el análisis estadístico.

#### **2.4.9. Stripping**

Con el fin de utilizar de nuevo las membranas con diferentes anticuerpos se debe realizar un lavado que se conoce como stripping, compuesto por los siguientes pasos:

1. 3 lavados con solución de Stripping ((SDS 10%, Tween 20, buffer de glicina pH 2) durante 10 minutos cada uno
2. 2 lavados con PBS 1X, durante 10 minutos cada uno
3. 1 lavado con TBST 1X durante 5 minutos
4. Retomar el paso de bloqueo de la membrana durante una hora

#### **2.4.10. Análisis de datos**

Una vez se tuvieron los datos de densidad óptica para las bandas correspondientes a Akt total y Akt en sus dos formas fosforiladas (p-Akt thr 308 y p-Akt ser 473) se procedió a normalizar los datos con la intensidad obtenida para la proteína control de carga  $\beta$ - actina y por el control sham F realizando un promedio de los cuatro datos obtenidos con cada grupo

experimental, con el error estándar de la media y de esta manera confirmar el comportamiento normal de los residuos con la prueba de Kosmogorov y de las varianzas utilizando la prueba de Levene y Bartlett, con una significancia del 0,05 (valor  $p < 0,05$ ).

Se compararon los datos normalizados entre los grupos experimentales a través de un ANOVA y la prueba t-Student de dos colas, apareada, con una significancia de 0,05 (valor  $p < 0,05$ ) y para los datos que no cumplieron los supuestos de normalidad se efectuó una prueba No paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida para una prueba Tukey.

## Matriz de marco lógico

<b>Objetivo general</b>	Evaluar la participación de la proteína Akt en el proceso de citoprotección generado por un tratamiento con glucosamina en ratas Wistar como modelo experimental de isquemia cerebral focal.		
<b>Objetivos específicos</b>	<b>Actividad</b>	<b>Indicador</b>	<b>Supuesto</b>
Comparar el <i>nivel de expresión</i> de la proteína Akt en el cerebro de ratas Wistar sometidas a isquemia cerebral focal, con y sin un tratamiento con glucosamina a diferentes tiempos.	<p>Homogenización de la muestra.</p> <p>Determinación de la concentración de proteínas.</p> <p>Separación de las proteínas por electroforesis en gel.</p> <p>Transferencia de proteínas del gel a la membrana</p> <p>Incubación de las proteínas con anticuerpos específicos (western blot)</p> <p>Estimación de la cantidad de proteína expresada por los cerebros de las ratas en los diferentes tratamientos experimentales.</p>	<p>Utilizar el método de Bradford para obtener la concentración de proteínas en los homogenizados de cerebro.</p> <p>Obtener el gel con la separación de las proteínas utilizando la electroforesis.</p> <p>Utilizar la quimioluminiscencia para obtener una película fotográfica.</p> <p>Utilizar la densitometría para comparar la intensidad de las bandas para la proteína Akt obtenida por Western Blot en cada uno de los tratamientos a los diferentes tiempos.</p>	<p>Disponibilidad del tejido proveniente de las Ratas wistar con y sin tratamiento con glucosamina.</p> <p>Conseguir los anticuerpos específicos para identificación del nivel de expresión de la proteína Akt.</p> <p>Disponibilidad de equipos y materiales</p>
Comparar el <i>nivel de fosforilación</i> de la proteína Akt en el cerebro de ratas wistar sometidas a isquemia cerebral focal, con y sin un tratamiento con glucosamina a diferentes tiempos.	<p>Homogenización de la muestra.</p> <p>Determinación de la concentración de proteínas.</p> <p>Separación de las proteínas por electroforesis en gel.</p>	<p>Utilizar el método de Bradford para obtener la concentración de proteínas en los homogenizados de cerebro.</p> <p>Obtener el gel con la separación de las proteínas utilizando la</p>	<p>Disponibilidad del tejido proveniente de las Ratas wistar con y sin tratamiento con glucosamina.</p> <p>Conseguir los anticuerpos específicos para identificación de la</p>

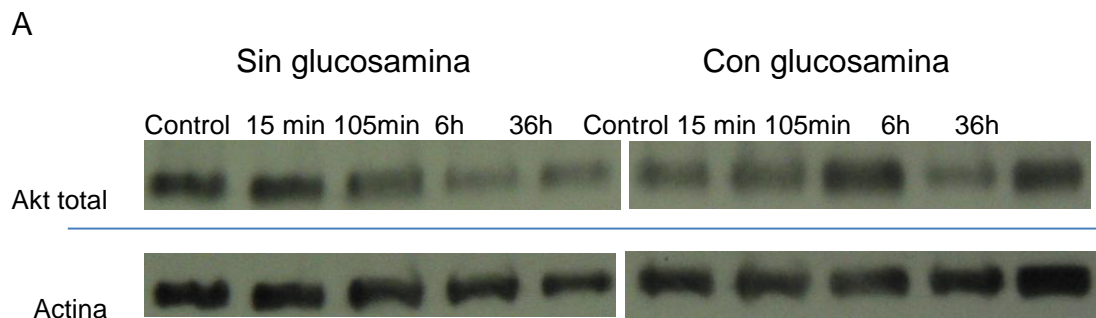
	<p>Transferencia de proteínas del gel a la membrana</p> <p>Tinción de las proteínas con anticuerpos específicos (western blot)</p> <p>Identificación de la modificación pos-traducciona expresada por los cerebros de las ratas en los diferentes tratamientos experimentales.</p>	<p>electroforesis.</p> <p>Utilizar la quimioluminiscencia para obtener una película fotográfica.</p> <p>Utilizar la densitometría para comparar la intensidad de las bandas para la proteína Akt obtenida por Western Blot en cada uno de los tratamientos a los diferentes tiempos.</p>	<p>proteína Akt fosforilada.</p> <p>Disponibilidad de equipos y materiales.</p>
--	--	--	---

## 2.5. Resultados

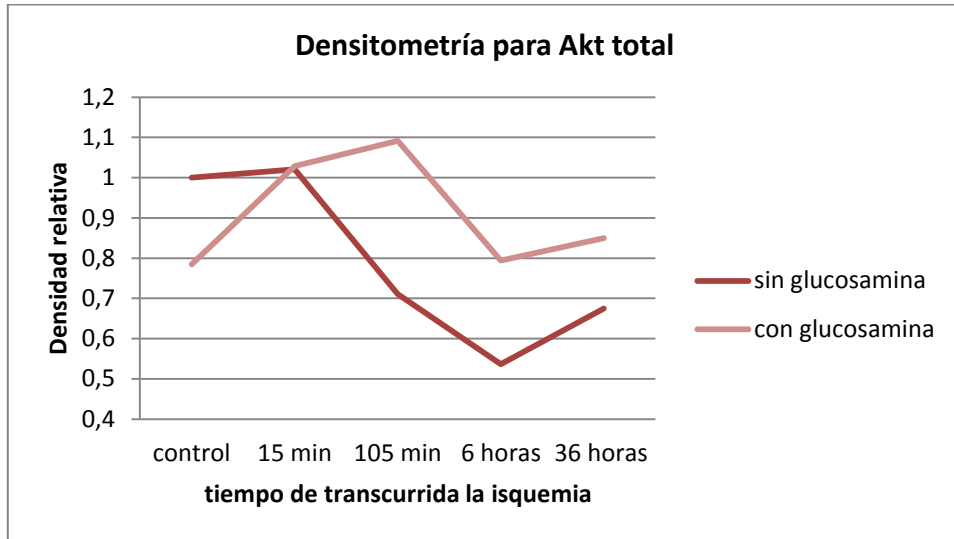
Utilizando la densitometría se normalizaron los resultados de la expresión de la proteína y sus formas fosforiladas con respecto a su control de carga con  $\beta$ -actina. A continuación se presentarán los inmunoblots obtenidos y su densitometría teniendo claro que cada resultado se obtuvo por cuadruplicado. El análisis de dichos resultados se realizó por la prueba no-paramétrica de Kruskal-Wallis para los datos que no cumplieron supuestos de normalidad y ANOVA para los datos que si comprobaron los supuestos de normalidad. La prueba t-student con una confianza del 95% se usó para la comparación por pares entre los diferentes datos (véase *anexo 2*).

### Expresión de la proteína Akt total

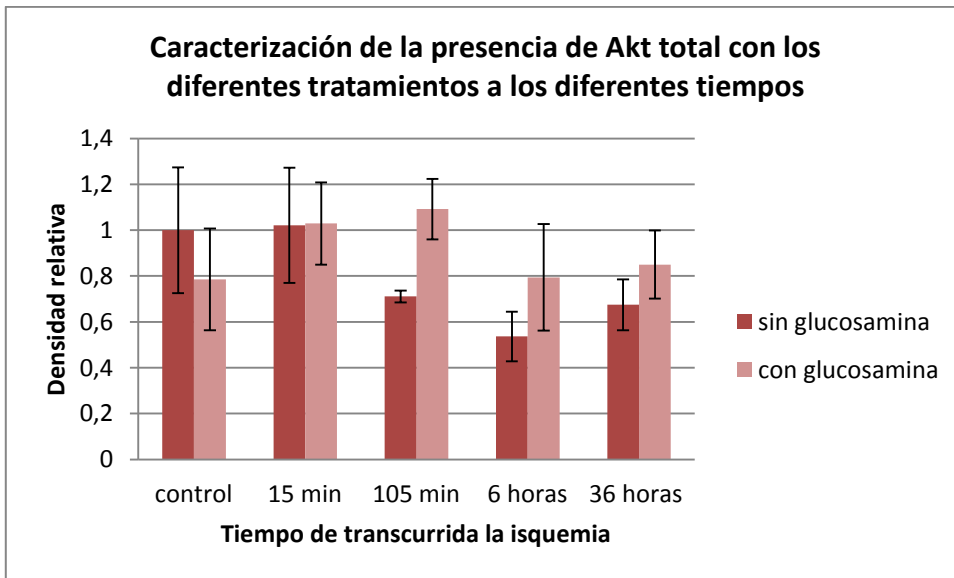
Para la expresión de la proteína Akt total cuyo supuesto de normalidad no se cumplió, se especificó un modelo no paramétrico para el análisis de varianza utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. En este caso para la comparación de la densidad con el tratamiento se planteó una hipótesis nula de la igualdad de las medianas de las densidades con o sin tratamiento con glucosamina. No se observaron diferencias significativas en cuanto a la relación densidad vs tiempo, sin embargo si se halló diferencia en la relación densidad vs tratamiento, debido a que se obtuvo un valor p menor al nivel de significancia de 0,05 para esta prueba. Se realizó la Prueba Tukey para identificar las posibles diferencias sin embargo no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos en cada una de los tiempos.



B



C



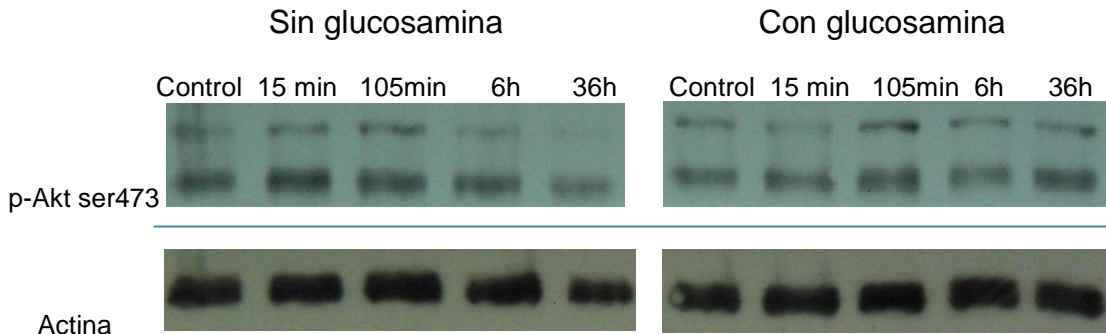
**Figura 1. Comportamiento de la expresión de Akt total en corteza frontoparietal de cerebros de ratas sometidas a isquemia cerebral con y sin tratamiento con glucosamina a los diferentes tiempos.** (A) Inmunoblot de Akt total y  $\beta$ -actina como control de carga. (B) Gráfica de la densitometría de los promedios de los inmunoblot que muestra la tendencia de la expresión de Akt total en los diferentes tratamientos a cada tiempo evaluado con n=4 (C) Comparación por pares, con y sin tratamiento con glucosamina de los resultados de la densitometría a los diferentes tiempos mostrados como promedio +/- error estándar de la media (SEM).



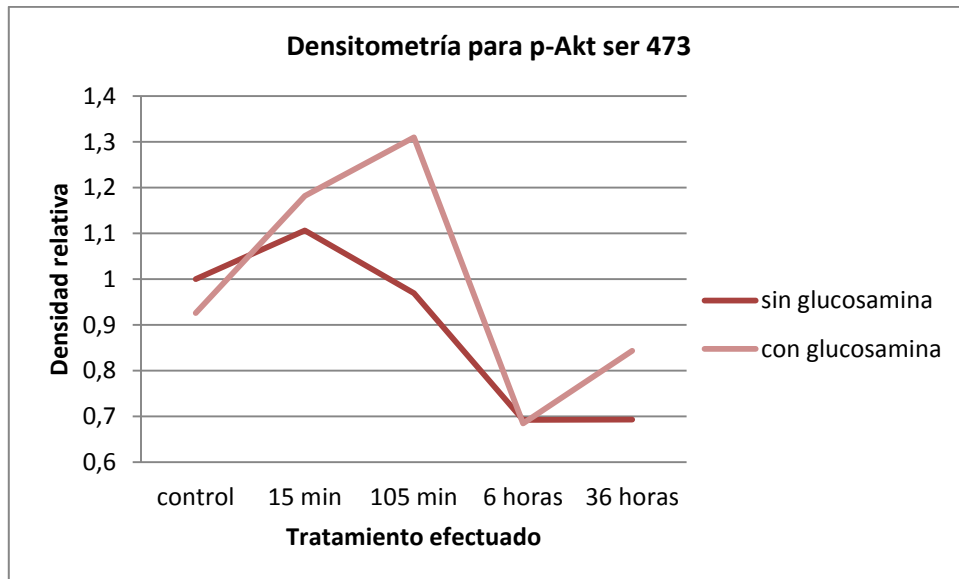
## Caracterización de p-Akt serina 473

Se evaluaron inicialmente los supuestos de normalidad y de igualdad de varianzas que se cumplieron satisfactoriamente. Seguidamente se utilizó ANOVA y se encontró que a un nivel de confianza de 95% hay diferencias significativas entre tiempos, observándose una mayor densidad a los 15 y 105 minutos frente a 6 y 36 por lo tanto la mayor expresión de la proteína con esta modificación post-traducciona se observa a los 15 y 105 minutos.

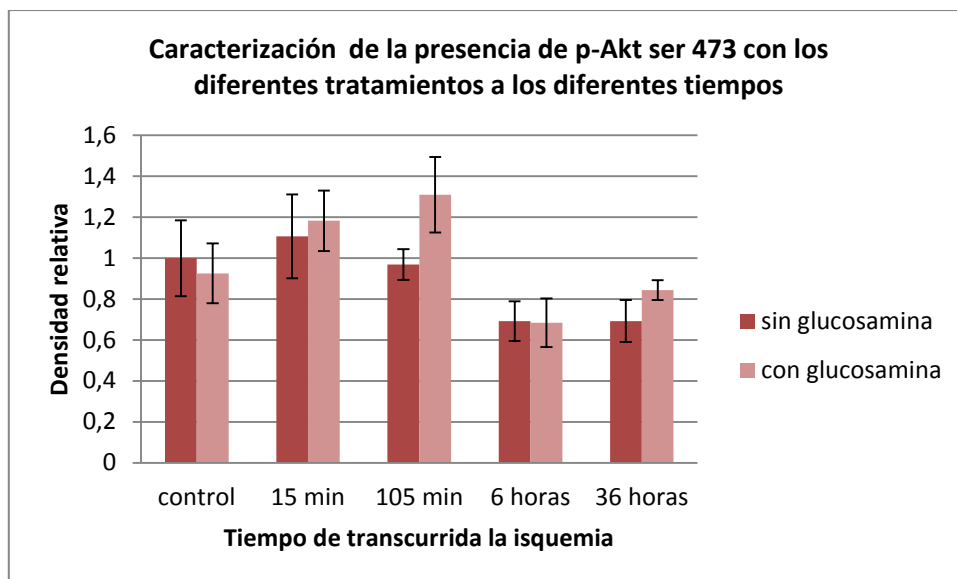
A



B



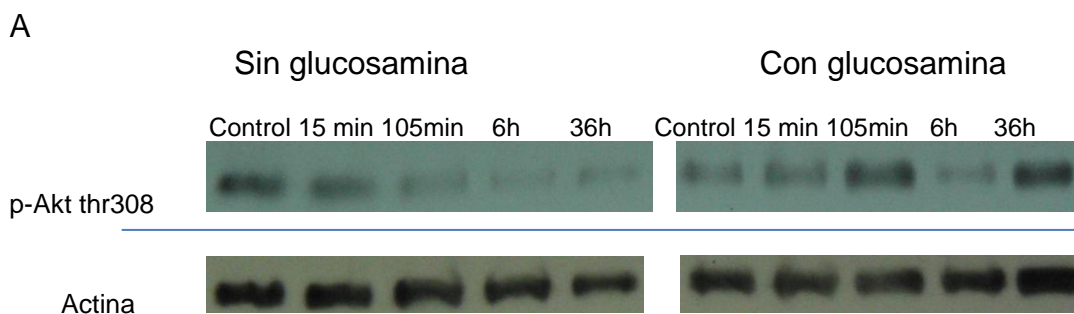
C



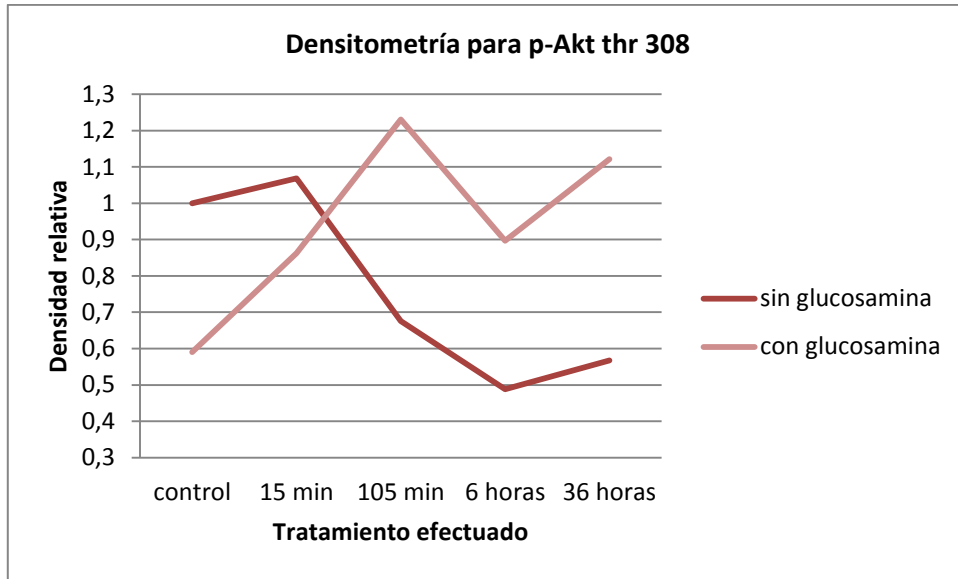
**Figura 2. Comportamiento de la expresión de p-Akt ser473 en corteza frontoparietal de cerebros de ratas sometidas a isquemia cerebral con y sin tratamiento con glucosamina a los diferentes tiempos.** (A) Inmunoblot de p-Akt ser473 y  $\beta$ -actina como control de carga. (B) Gráfica de la densitometría de los promedios de los inmunoblot que muestra la tendencia de la expresión de p-Akt ser473 en los diferentes tratamientos a cada tiempo evaluado con n=4 (C) Comparación por pares, con y sin tratamiento con glucosamina de los resultados de la densitometría a los diferentes tiempos mostrados como promedio  $\pm$  error estándar de la media (SEM).

### Caracterización de p-Akt treonina 308

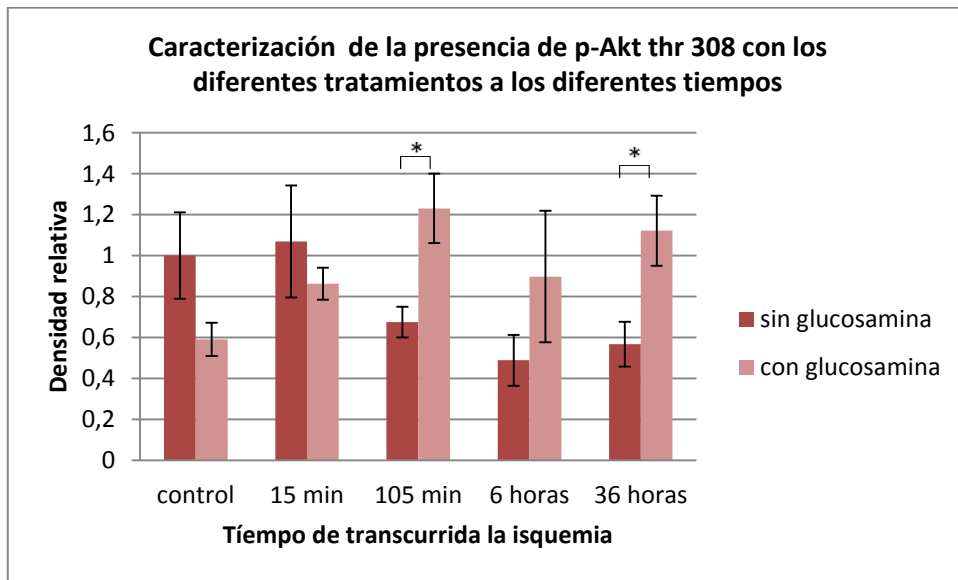
Se evaluaron en primer lugar los supuestos de normalidad y de igualdad de varianzas los cuales se cumplieron satisfactoriamente. Seguidamente se utilizó ANOVA y se encontró que a un nivel de confianza de 95% hay diferencias significativas entre tratamientos, observándose una mayor densidad con tratamiento con glucosamina frente a sin tratamiento; por lo tanto, la mayor expresión de la proteína con esta modificación post-traduccional se observa en la condición con tratamiento con glucosamina.



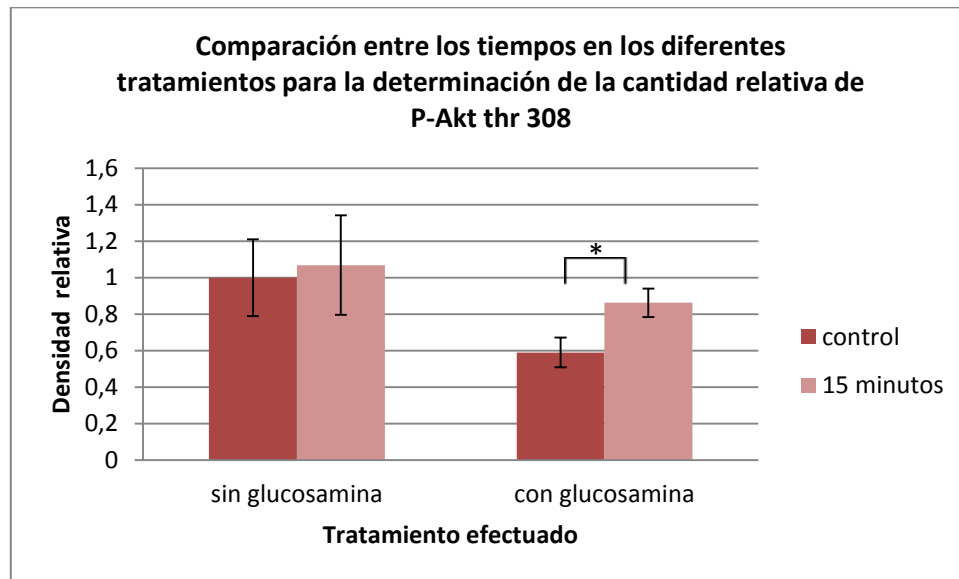
B



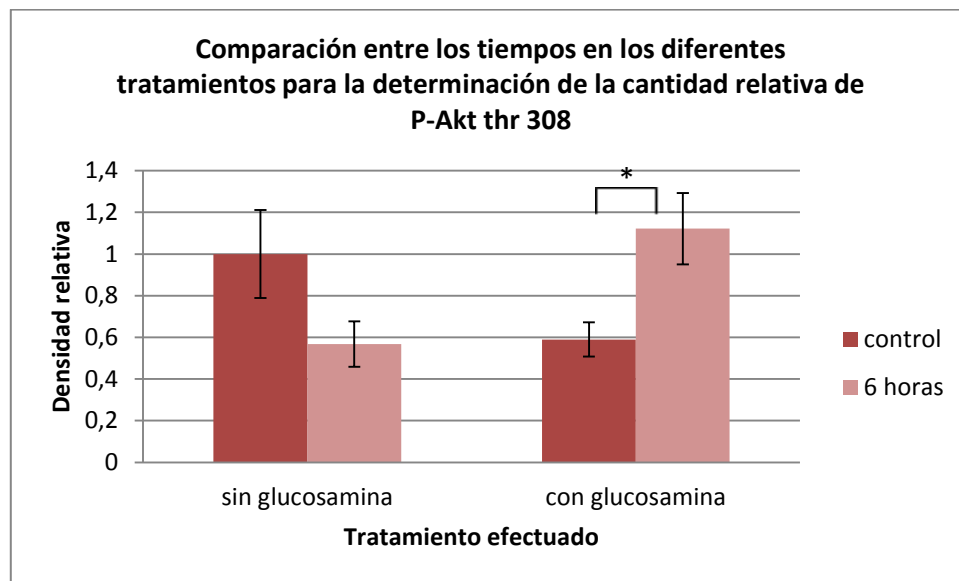
C



D



E



**Figura 3. Comportamiento de la expresión de p-Akt thr308 en corteza frontoparietal de cerebros de ratas sometidas a isquemia cerebral con y sin tratamiento con glucosamina a los diferentes tiempos.** (A) Inmunoblot de p-Akt thr308 y  $\beta$ -actina como control de carga. (B) Gráfica de la densitometría de los promedios de los inmunoblot que muestra la tendencia de la expresión de p-Akt thr308 en los diferentes tratamientos a cada tiempo evaluado con  $n=4$  (C) Comparación por pares, con y sin tratamiento con glucosamina de los resultados de la densitometría a los diferentes tiempos mostrados como promedio  $\pm$  error estándar de la media (SEM) a través de la prueba t-student ( $p<0,05$ ) (D) Comparación de la cantidad relativa de p-Akt thr 308 entre el control (0 min) y el primer tiempo evaluado (15min) por la prueba t- student ( $p<0,05$ ) (E) Comparación de la cantidad relativa de p-Akt thr 308 entre el control (0 min) y 6h por la prueba t- student (\*.  $p<0,05$ ).

## 2.6. Discusión

Durante un evento isquémico se produce una reducción del aporte sanguíneo cerebral hasta obtener niveles insuficientes del aporte energético necesario para mantener el metabolismo y funcionamiento normal de las células cerebrales (Montaner, 2007) lo que conlleva a muerte neuronal, ya sea de tipo necrótica o de tipo apoptótica. Sin embargo, esta reducción del flujo sanguíneo no se presenta de forma homogénea en el sector afectado; y es el área de *penumbra isquémica* la que representa la región que puede ser salvada con terapias o medicamentos en donde las células se mantienen estables por cierto tiempo lo que permitirá que se disminuya el proceso apoptótico que aquí se desencadena después de producirse la isquemia cerebral (Broughton, et al. 2009).

Se tienen dos tipos de estrategias farmacológicas cuando se produce un evento isquémico; por un lado el restablecimiento del flujo sanguíneo cerebral, destruyendo el coágulo que obstruye la arteria cerebral, y por otro lado la limitación del daño neuronal contribuyendo a un proceso de neuroprotección, disminuyendo los efectos neurológicos después del evento isquémico (Lloyd-Jones et al., 2010). Se ha encontrado que la glucosamina fue capaz de disminuir el tamaño del infarto en un 70% en ratas sometidas a isquemia cerebral atribuido a la supresión de factores pro-inflamatorios (Hwang et al., 2010). En nuestro grupo de investigación se comprobó una disminución del 50% del tamaño del infarto (véase Anexo 5) y de igual manera una mejora de los resultados en las pruebas comportamentales con glucosamina después de la isquemia cerebral (Viveros, 2014). Sin embargo como los mecanismos por los cuales la glucosamina es capaz de tener este efecto neuroprotector no se conocen completamente, en este estudio se evaluó la proteína Akt y su posible implicación en el proceso de supervivencia celular que se produce durante la isquemia cerebral.

La proteína Akt se encuentra implicada en procesos de muerte y supervivencia celular, fosforila varios objetivos intermedios de la supervivencia y las vías de apoptosis, inhibiendo la muerte celular (Sun, et al. 2011). En el presente trabajo se estudió la proteína Akt que es activada cuando es fosforilada en los residuos de treonina 308 y serina 473.

### **Caracterización de Akt total**

Utilizando la prueba No-paramétrica de Kruskal-Wallis no se observaron diferencias significativas en cuanto a la relación densidad-tiempo, sin embargo en la relación densidad-tratamiento se rechaza la hipótesis nula por lo tanto es un indicador de por lo menos una posible diferencia entre los datos. Seguidamente se efectuó la prueba de Tukey, sin embargo no se encontraron diferencias significativas aunque se observa que hay una mayor densidad relativa con tratamiento con glucosamina frente a sin tratamiento

(véase Anexo 2), lo que puede llevar a pensar que hay una posible tendencia a aumentar el nivel de expresión de la proteína al efectuarse el tratamiento con glucosamina. Esta tendencia a aumentar también puede observarse en la comparación por pares con y sin tratamiento a los diferentes tiempos (Figura 1C), donde la expresión de la proteína después de los 15 minutos tiene a aumentar frente a sin tratamiento, lo que podría atribuirse a un aumento de la supervivencia celular, lo que indica que menos células están muriendo después de producido el evento isquémico debido al tratamiento efectuado. También se observó que la expresión de la proteína Akt cuando no se efectuó el tratamiento con glucosamina presentó tendencia a disminuir después de los 15 minutos de ocurrida la isquemia posiblemente debido a que la pérdida celular comenzó a ser mayor. En otro estudio realizado en el 2001 (Janelidze, 2001), se encontró que la expresión de la proteína Akt después de producida la isquemia cerebral en ratas presenta una tendencia a disminuir en las primeras horas, y una disminución significativa a las 24 horas después de producida la isquemia, hecho que se atribuye a la translocación de la proteína a la membrana; datos corroborados en el presente estudio.

Un aumento en la expresión de la proteína Akt con el tratamiento con glucosamina se podría relacionar directamente con el mecanismo de neuroprotección que se le atribuye, debido a que la proteína Akt al aumentar su expresión puede fosforilar proteínas implicadas en muerte celular. En este estudio detectamos una tendencia a este aumento en expresión, más no estadísticamente significativo por la prueba Tukey.

### **Caracterización de p-Akt ser473**

Al analizar la fosforilación en el residuo de serina 473 para la proteína Akt, fosforilación que también se encarga de activar dicha proteína, utilizando la prueba t-student no se encontraron cambios significativos entre los datos obtenidos (véase anexo 4). Sin embargo utilizando ANOVA se encontró que hay diferencias significativas entre tiempos, observándose una mayor densidad en los primeros minutos frente a las últimas horas después de ocurrida la isquemia. Por lo tanto la mayor expresión de la proteína con esta modificación post-traducciona se observa a los 15 y 105 minutos (Figura 2C).

En otros estudios se ha encontrado que la fosforilación en este residuo se ve aumentada significativamente después de una hora de ocurrido un evento isquémico inducido en ratas en corteza cerebral, sin embargo este aumento se ve disminuido drásticamente y significativamente alrededor de las 24 horas después (Janelidze, 2001). En nuestro modelo, se puede observar el mismo patrón aunque no de forma significativa; se observa una tendencia a aumentar y luego a disminuir después de las 6 horas de ocurrida la isquemia (Figura 2C). En el tratamiento con glucosamina, en este caso no se observa ninguna repercusión sobre el aumento o disminución de la fosforilación de

Akt en este residuo con respecto al control no tratado, lo que lleva a pensar que no se presenta algún tipo de interacción entre la glucosamina y la fosforilación en este residuo de serina.

### **Caracterización de p-Akt thr308**

Al analizar la fosforilación en el residuo de treonina 308 para la proteína Akt, fosforilación que se encarga de activar dicha proteína, utilizando la prueba t-student se encontraron cambios significativos a los 105 minutos (N y M) y a las 36 horas (P y O) observándose un aumento significativo en el tratamiento con glucosamina (véase *Anexo 3*). Además después de analizar por pares, se obtuvo una diferencia significativa en el tratamiento con glucosamina entre el control y los 15 minutos, y entre el control y las 6 horas.

Por otro lado, utilizando ANOVA, se encontró que hay diferencias significativas entre tratamientos, observándose una mayor densidad relativa en tratamiento con glucosamina frente a sin tratamiento, obteniendo que la mayor expresión de la proteína con esta modificación post-traducciona se observa con tratamiento de glucosamina (Figura 3C).

En el estudio mencionado anteriormente en el que se analizó la proteína Akt, también se estudiaron sus fosforilaciones después de inducir isquemia cerebral en ratas, y se evidenció que el nivel de p-Akt thr 308 disminuyó de forma significativa después de transcurridas 1, 4 y 24 horas de efectuada la isquemia cerebral (Janelidze, 2001), dato que fue comprobado con el presente estudio donde se observó una tendencia a la disminución de la fosforilación en el residuo de treonina 308.

Con este hallazgo se puede comprobar que cuando se aplica glucosamina en un evento isquémico moderado a severo, se aumenta la fosforilación de la proteína Akt en el residuo de treonina 308, modificación que se mantiene en un nivel significativamente alto en cada uno de los tiempos evaluados después de producida la isquemia cerebral, lo que conlleva a afirmar que el tratamiento con glucosamina está relacionado con un aumento de la fosforilación de p-Akt thr 308. Se ha encontrado que la fosforilación de este residuo está relacionado con supervivencia celular ante estímulos de estrés metabólico que son mantenidos por un tiempo prolongado (Gao et al., 2013), como es el caso de nuestro estudio, en el que se produce una isquemia de 90 minutos y en donde los tiempos de muestreo para evidenciar el tamaño del infarto se realizan hasta las 36 horas después de sucedido el evento. En el caso del estudio mencionado (Gao et al., 2013), células cancerígenas se sometieron a privación de glucosa transitoria entre 2 y 4 horas, y prolongada por 16 horas y se observó en el caso del estrés prolongado que el aumento de la supervivencia celular estuvo directamente relacionado con un aumento de la fosforilación de p-Akt thr 308 lo que conlleva a pensar que las células que no aumentan la fosforilación en este residuo, mueren más rápidamente. Por lo tanto esto la convierte en una fosforilación selectiva dependiente del

tiempo que puede elevarse hasta entre 20-30 veces de la fosforilación normal de la proteína (Gao et al., 2013). En condiciones normales en cuanto a suministro de glucosa y oxígeno, la proteína Akt requiere de la fosforilación en sus dos residuos para ser activada; sin embargo de acuerdo a este artículo ya mencionado y a lo que se observó en el presente estudio, la activación parcial y selectiva de la Akt, en este caso con la fosforilación en treonina 308, llevaría consigo la activación de otras vías que no se expresan en condiciones de normalidad y que van a llevar a un aumento de la supervivencia celular.

En la vía normal de fosforilación de la proteína Akt, se requiere de una cascada que se inicia con el acoplamiento de un sustrato (IRS) al receptor de insulina lo que provoca la autofosforilación de dicho receptor; esto provoca que el IRS reclute a su vez a PI3K que este a su vez se encarga de producir fosfolípidos fosforilados, fosforila a PIP2 (fosfatidil inositol 3,4 difosfato), convirtiéndolo en PIP3 (fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato) que se van a unir a Akt, lo que va a provocar que sus residuos queden disponibles debido a la translocación de la proteína desde el citoplasma a la superficie interna de la membrana plasmática para ser fosforilados por diversas quinasas (Pinzón et al., 2009). En el residuo de thr 308 se produce la fosforilación por PDK1 y se cree que es una activación parcial de Akt necesaria para funciones como la activación de proteínas relacionadas con la supervivencia celular, sin embargo para las funciones relacionadas con la vía de señalización de insulina o del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-I) se requiere de la segunda fosforilación por parte del complejo mTORC2 en el residuo de ser 473.

Se plantean dos posibles explicaciones para la activación selectiva de la proteína Akt. Por un lado se observó que se requiere de un dominio PH intacto de Akt para la fosforilación selectiva de p-Akt thr 308 durante la privación prolongada de glucosa, pero no se observó la localización de la proteína Akt en la membrana celular, lo que conlleva a pensar, que una de las posibles razones para que esto suceda es que en condiciones de estrés prolongado, no se requiere dicha translocación a la membrana plasmática, mientras en condiciones normales, como se mencionó anteriormente, se requiere de PI3K para facilitar la fosforilación de Akt (Gao et al., 2013). Mientras que por otro lado, otra de las posibles explicaciones de la activación de Akt inducida por la privación prolongada de glucosa, se basa en que se requiere de la activación de PI3K para que se produzca la asociación entre PDK1 con Akt en la membrana, y se cree que la privación de glucosa estabiliza el complejo Akt-PDK1, debido posiblemente a GRP78 y otras proteínas de andamiaje que se unen a dicho complejo, contribuyendo a que se dé la fosforilación selectiva de p-Akt thr308 y no de p-Akt ser 473 (Gao et al., 2013).

Se propuso entonces que cuando las células se encuentran bajo estrés metabólico transitorio la primera línea de defensa contra la muerte celular



implica la fosforilación de Akt en sus dos residuos; sin embargo, cuando el estrés se presenta de forma prolongada y se requieren mecanismos más fuertes de supervivencia, esta primera línea de defensa puede quedarse corta y ya que los niveles de ATP son cada vez más bajos, se aumenta de forma selectiva la fosforilación en el residuo de treonina 308 proporcionando de esta manera una segunda línea de defensa (Gao et al., 2013).

### **Proteína Akt y su relación con otras proteínas**

La proteína Akt es una quinasa encargada de fosforilar diferentes proteínas ya sea para inhibirlas o para activarlas dependiendo de la función de cada una de estas. La proteína GSK-3 (glucógeno sintasa quinasa 3) es una proteína clave en la fosforilación de la glucógeno sintasa, proteína implicada en el metabolismo del glucógeno. Esta proteína presenta dos isoformas, GSK-3 $\alpha$  y GSK-3 $\beta$ , la isoforma GSK-3 $\beta$  se encuentra en todo el cerebro, incluyendo la corteza, por lo tanto, no solo participa en el metabolismo del glucógeno sino también en las respuesta de señalización celular acopladas a distintos receptores, dentro de ellos los receptores de la familia Frizzled, receptores tirosinquinasa y receptores acopladas a proteínas G (Woodgett, 2003) lo que la implica en procesos de apoptosis celular, donde una serie de vías de señalización se relacionan con su activación y por ende su inhibición se considera una forma de neuroprotección.

Una forma de regulación de la proteína GSK-3 $\beta$ , es mediante su inhibición por fosforilación en el residuo de serina 9 mientras que el aumento de su actividad quinasa se relaciona con la fosforilación en el residuo de tirosina 216. Durante el desarrollo del presente proyecto de investigación se quiso determinar la participación de algunas de las quinasas corriente debajo de la proteína Akt, principalmente de la GSK-3 $\beta$ , por lo que se hizo un análisis de la expresión total de esta proteína y de sus dos formas fosforiladas (véase *Anexo 6*) ; y se encontró por medio de la prueba de t-student que el tratamiento con glucosamina influye en la expresión de GSK-3 $\beta$ , aumentándola a los 105 minutos de ocurrido un evento isquémico en corteza cerebral. En cuanto a la fosforilación en la serina 9 se encontró que a los 15 minutos hay una diferencia significativa en los tratamientos, la mayor cantidad relativa de la proteína p- GSK-3 $\beta$  ser9 se encuentra en el tratamiento con glucosamina sobre la condición sin glucosamina (Gráfico 10). Y por último se encontró que en cuanto a la fosforilación en tirosina 216 lo que logra el tratamiento con glucosamina es que el aumento de p-GSK-3 $\beta$  tyr216 a los 15 minutos no sea significativo con respecto al control no tratado.

Una de las cascadas que inhibe a la proteína GSK-3 $\beta$  es la vía ya mencionada de PI3K/AKT que puede ser activada por diferentes estímulos, en donde la proteína Akt al ser activada por la fosforilación en sus residuos de serina 473 y treonina 308 tiene la capacidad de fosforilar a GSK3- $\beta$  en su residuo de serina 9, en este caso para inhibir su actividad (Pinzón et al.,

2009). Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente trabajo para la proteína Akt tienen relación directa con los obtenidos para la proteína GSK-3 $\beta$ . Se observa un aumento de la fosforilación de la proteína Akt específicamente p-Akt thr308 y un aumento en la fosforilación de GSK3- $\beta$  ser9; además se observa que con el tratamiento con glucosamina a los diferentes tiempos la fosforilación de GSK3- $\beta$  tiende a aumentar frente a los controles sin el tratamiento.

Por lo tanto, con estos resultados se puede confirmar que el tratamiento con glucosamina tiene un efecto neuroprotector después de ocurrido un evento isquémico, en donde está implicada la proteína Akt específicamente en un aumento en la fosforilación en su residuo de treonina 308 que favorece el proceso de supervivencia celular y un aumento en la fosforilación del residuo de serina 9 de la proteína GSK-3 $\beta$  que se relaciona con la inhibición del proceso de apoptosis celular; sin embargo, se debe tener en cuenta que ambos aumentos en las fosforilaciones de cada una de las proteínas no se efectúan a los mismos tiempos, lo que es un indicador que además de la vía de activación por PI3K/AKT para la proteína GSK3- $\beta$  en procesos de estrés metabólico, se activan otras vías como que inhiben a GSK-3 $\beta$ , algunas de ellas son las vías que implican las MAPKAP-K1 (proteína activadora de mitógenos- proteína quinasa activada 1), la PKA (proteína quinasa A) y la PKC (proteína quinasa C). (Doble & Woodgett, 2003).

## 2.7. Conclusiones

- La proteína Akt puede estar implicada en los mecanismos de neuroprotección que se observan con la aplicación de glucosamina en isquemia cerebral focal en ratas Wistar.
- El tratamiento con glucosamina en el modelo de isquemia y reperfusión en la rata Wistar modifica el nivel de fosforilación de la proteína Akt específicamente en su residuo de treonina 308.
- La fosforilación de Akt en el residuo de treonina 308, que es una de las modificaciones post-traduccionales que activa a Akt y por lo tanto a vías que promueven la supervivencia celular, se aumenta de forma significativa en el tratamiento con glucosamina a los 105min y 36 horas de causada la isquemia cerebral. Este cambio en esta modificación post-traduccional de Akt puede estar relacionado con la disminución del tamaño del infarto cerebral generado en el tratamiento con glucosamina.
- La fosforilación de GSK-3 $\beta$  en el residuo de serina-9, que es la modificación post-traduccional que inhibe a GSK-3 $\beta$ , se aumenta significativamente en el tratamiento con glucosamina a los 15 minutos de causada la isquemia cerebral, lo que puede contribuir a la disminución del daño cerebral. Sin embargo está ocurriendo a tiempos más tempranos que el aumento en la fosforilación de Akt por lo que no podemos asegurar que este sea el mecanismo de neuroprotección cascada abajo que activa la glucosamina.

## 2.8. Recomendaciones

- Se sugiere realizar espectrometría de masas u otros análisis más específicos para determinar la existencia de una relación entre la glicosilación y la fosforilación en la proteína Akt, en alguna de sus regiones, y afirmar con seguridad que el tratamiento con glucosamina está directamente implicado en el aumento en la fosforilación de Akt.
- Se sugiere realizar esta misma caracterización con los mismos tiempos y condiciones para proteínas sustrato de la proteína Akt implicadas en los mecanismos de supervivencia celular, como es el caso de Bad, la caspasa 9 y el factor de transcripción Forkhead y de

esta manera aclarar mejor los mecanismo de neuroproteccion cascada  
abajo que activa la glucosamina al aumentar la fosforilacion de Akt

### 3. REFERENCIAS

- Arango-Davila, C., Escobar-Betancourt, M., Cardona-Gómez, G. P., & Pimienta-, H. (2004). Fisiopatología de la isquemia cerebral focal: aspectos básicos y proyección a la clínica. *Rev. Neurol*, 39(2), 156-65.
- Bamford J, Sandercock P, Dennis M, Burn J & Warlow C. (1991) Classification and natural history of clinically identifiable subtypes of cerebral infarction. En: Science Direct. The Lancet, 337(8756), 1521-1526.
- Broughton, B. R., Reutens, D. C., & Sobey, C. G. (2009). Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*, 40(5), e331-e339.
- Cardinali, D. (2007) Los componentes del sistema nervioso y su comunicación, Accidentes cerebrovasculares. En: Neurociencia aplicada: fundamentos. 1ra Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana. 2007. Pp 18-20.
- Clarke DD, Sokoloff L. (1999) Regulación de la tasa metabólica cerebral. En: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al, editores. Neuroquímica básica: Molecular, Celular y Aspectos Médicos. 6ª edición. 1999.
- Datta, S.R., Brunet, A., & Greenber, M.E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes and Development*. 13, 2905-2927.
- Díaz, V. P. (2009). Errores estadísticos frecuentes al comparar dos poblaciones independientes. *Revista chilena de nutrición*, 36(4), 1136-1138.
- Díez-Tejedor, E., Del Bruto, O., Alvarez Sabín, J., Muñoz, M., & Abiusi, G. (2001). Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares. Sociedad Iberoamericana de Enfermedades Cerebrovasculares. *Rev Neurol*, 33(5), 455-464.
- Doble, B. W., & Woodgett, J. R. (2003). GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *Cell Science* , 1175-1186.
- Galetic, I., Mirjana, A., Meier, R., Brodbeck, D., Park, J., & Hemmings, B. A. (1999). Mechanism of protein kinase B activation by insulin/insulin-like growth factor-1 revealed by specific inhibitors of phosphoinositide 3-kinase—significance for diabetes and cancer. *Pharmacology & therapeutics*, 82(2), 409-425.
- Gandy, J., & Rountree, A. (2006). Akt1 is dynamically modified with O-GlcNAc following treatments with PUGNAc and insulin-like growth factor-1. *FEBS Lett.*, 3051–3058.

Gao, M., Liang, J., Lu, Y., Guo, H., German, P., Bai, S. & Ding, Z. (2013). Site-specific activation of AKT protects cells from death induced by glucose deprivation. *Oncogene*, 33(6), 745-755.

Ginsberg, M. D. (2009). Current status of neuroprotection for cerebral ischemia synaptic overview. *Stroke*, 40(3 suppl 1), S111-S114.

Hwang, S. Y., Shin, J. H., Hwang, J. S., Kim, S. Y., Shin, J. A., Oh, E. S., ... & Han, I. O. (2010). Glucosamine exerts a neuroprotective effect via suppression of inflammation in rat brain ischemia/reperfusion injury. *Glia*, 58(15), 1881-1892.

Herrera, M., Gállego, J., Muñoz, R., Aymerich, N., & Zandio, B. (2008). Reperfusion in acute ischaemic stroke: present and future. *An. Sist. Sanit. Navar*, 31(Suplemento 1).

Instituto Nacional de Salud, Observatorio Nacional de Salud, Segundo Informe ONS: Mortalidad 1998-2011 y situación de salud en los municipios de frontera terrestre en Colombia. (2013) Imprenta Nacional de Colombia, Bogotá, D.C.

Janelidze, S., Hu, B., Siesjo, P., Siesjo, B. (2001) Alterations of Akt1 (PKBa) and p70S6K in Transient Focal Ischemia. *Neurobiology of Disease* 8, 147–154.

Kang, S. S., Kwon, T., & Do, S. I. (1999). Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 274(19), 13085-13090.

Kang, E-S., Han, D., Park, J., Kwak, T.K., Oh, M-A., Lee, S-A., Choi, S., Park, Z.Y., Kim, Y. & Lee, J.W. (2008). O-GlcNAc modulation at Akt1 Ser473 correlates with apoptosis of murine pancreatic  $\beta$  cells. *Experimental Cell Research*. 314, 2238-2248.

Kruger, N. J. (1994). The Bradford method for protein quantitation. In *Basic protein and peptide protocols* (pp. 9-15). Humana Press.

Lloyd-Jones, D., Adams, R. J., Brown, T. M., Carnethon, M., Dai, S., & De Simone, G. (2010). Heart Disease and Stroke Statistics 2010 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 121, e46-e215.

Montaner, J. (2007) Fisiopatología básica: de la oclusión arterial a la muerte neuronal. Fisiopatología de la isquemia cerebral. 1ra Edición. Barcelona, España. ICG Marge, SL. Pp 13-14.

Moskowitz, M.A., Lo, E.H., & Ladecola, C. (2010). The science of stroke: Mechanisms in search of treatment. *Neuron*. 67, 181-198.

Noshita, N., Lewén, A., Sugawara, T., & Chan, P. H. (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.

O'Collins, V. E., Macleod, M. R., Donnan, G. A., Horky, L. L., van der Worp, B. H., & Howells, D. W. (2006). 1,026 Experimental Treatments in Acute Stroke. *Ann Neurol*, 59, 467 – 477.

Pérez, H. M. G. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico*, 1(2), 31-4.

Pinzón, C. E., et al. (2009). Papel de la vía fosfatidilinositol 3 (PI3K/Akt) en humanos. *Cienc. Salud. Bogotá*, 47-66.

Rameh, L.E. & L.C. Cantley. (1999). The role of phosphoinositide- 3-kinase lipid products in cell function. *The Journal of Biological Chemistry*. 274, 8347–8350.

Robbins, & Contran. (1999). *Patología estructural y funcional 7 edición*. España: Mcgraw-Hill.

Santos, F. A., Ochoa, D., & García, A. G. (2011). Actualización de la eficacia de condroitín sulfato y sulfato de glucosamina en el tratamiento de la artrosis. *Actualidad en farmacología y terapéutica*, 9, 97-108.

Soesanto, Y.A., Luo, B., Jones, D., Taylor, R., Gabrielsen, S., Parker, G. & McClain, D.A. (2008). Regulation of Akt signaling by O-GlcNAc in euglycemia. *Journal of Physiology Endocrinology Metabolism*. 295, E974-E980.

Sun, B., Chen, L., Wei, X., Xiang, Y., Liu, X., & Zhang, X. (2011). The Akt/GSK-3 $\beta$  pathway mediates flurbiprofen-induced neuroprotection against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Biochemical and biophysical research communications*, 409(4), 808-813.

Viveros, E. Caracterización de los niveles de expresión de la proteína gsk-3 $\beta$  en un modelo animal de isquemia cerebral focal en tratamiento con glucosamina. Trabajo de grado para optar al título de pregrado de Química Farmacéutica. Cali. Universidad Icesi. Departamento de ciencias naturales. (2014).

Woodgett, B. (2003). GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *Journal of Cell Science*, 116, 1175–1186.

Yang, J., Cron, P., Thompson, V., Good, V.M., Hess, D., Hemming, B.A., & Barford, D. (2002). Molecular mechanism for the regulation of Protein Kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation. *Molecular Cell*. 4, 1227-1240.

Zachara, N. E., O'Donnell, N., Cheung, W. D., Mercer, J. J., Marth, J. D., & Hart, G. W. (2004). Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress A survival response of mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(29), 30133-30142.

Zeidan, Q. & Hart, G.W. (2010). The intersection between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. *Journal of Cell Science*. 123, 13-32.

Universidad Icesi, procedimiento operativo estandarizado POE para extracción y conservación de cerebros de rata, versión 1.



## 4. ANEXOS

### 4.1. Anexo 1. Cálculos efectuados

#### **Cálculo para determinar las concentraciones de proteína utilizando la curva de calibración**

Muestra de cálculo (grupo N)

$$y = mx + b$$

$$y = 0,0342x + 0,0138$$

$$x = \frac{y - b}{m} = \frac{y - 0,0138nm}{\frac{0,0342nm}{\mu g/mL}}$$

$$x = \frac{0,236nm - 0,0138nm}{\frac{0,0342nm}{\mu g/mL}} = \frac{6,497 \mu g/mL}{1/2000} = 12919 \mu g/mL$$

#### **Cálculo para determinar la cantidad de muestra a servir en cada pozo**

Muestra de cálculo (grupo N)

$$\frac{30\mu g \text{ proteína a servir}}{12919\mu g/mL} = 0,00232mL \text{ muestra} * \frac{1000\mu L}{1mL} = 2,32\mu L$$

$$10\mu L \text{ buffer} + 2,32\mu L \text{ muestra} = 12,32\mu L$$

$$20\mu L \text{ totales} - 12,32\mu L = 7,68\mu L \text{ agua}$$

## 4.2. Anexo 2. Prueba No-paramétrica Kruskal-Wallis para la expresión de la proteína Akt total

### Prueba de Kruskal-Wallis: densidad vs. tratamiento

Prueba de Kruskal-Wallis en densidad

tratamiento	N	Mediana	Clasificación del promedio	Z
con	15	0,7796	19,4	2,02
sin	16	0,6800	12,8	-2,02
General	31		16,0	

H = 4,06 GL = 1 P = 0,044

### Prueba de Kruskal-Wallis: densidad vs. tiempo

Prueba de Kruskal-Wallis en densidad

tiempo	N	Mediana	Clasificación del promedio	Z
15	8	0,8237	21,4	1,94
105	8	0,7797	18,9	1,04
360	7	0,5506	9,7	-2,08
2160	8	0,6875	13,3	-0,99
General	31		16,0	

H = 7,67 GL = 3 P = 0,053

### Comparaciones para densidad

### Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = densidad, Término = tratamiento

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

tratamiento	N	Media	Agrupación
con	15	0,939420	A
sin	16	0,735804	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ICs simultáneos de 95% de Tukey

### **Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = densidad, Término = tiempo**

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

tiempo	N	Media	Agrupación
15	8	1,02507	A
105	8	0,90137	A
2160	8	0,76237	A
360	7	0,66550	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### **ICs simultáneos de 95% de Tukey**

### **Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = densidad, Término = tratamiento\*tiempo**

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

tratamiento*tiempo	N	Media	Agrupación
con 105	4	1,09193	A
con 15	4	1,02905	A
sin 15	4	1,02109	A
con 2160	4	0,85006	A
con 360	3	0,79438	A
sin 105	4	0,71081	A
sin 2160	4	0,67468	A
sin 360	4	0,53663	A

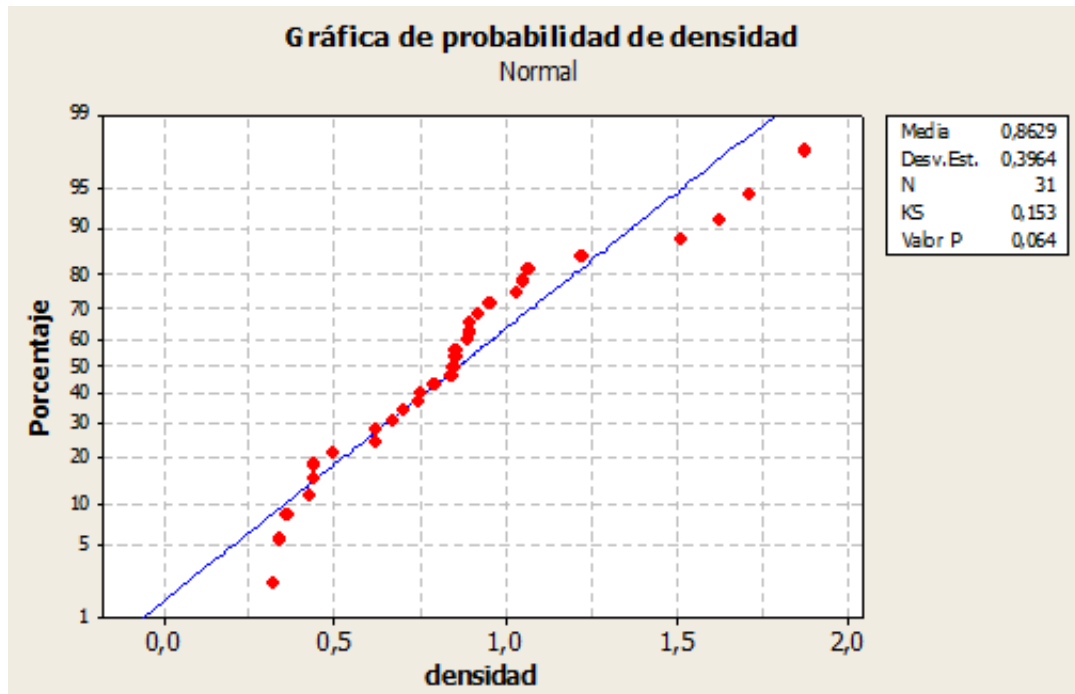
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### **ICs simultáneos de 95% de Tukey**

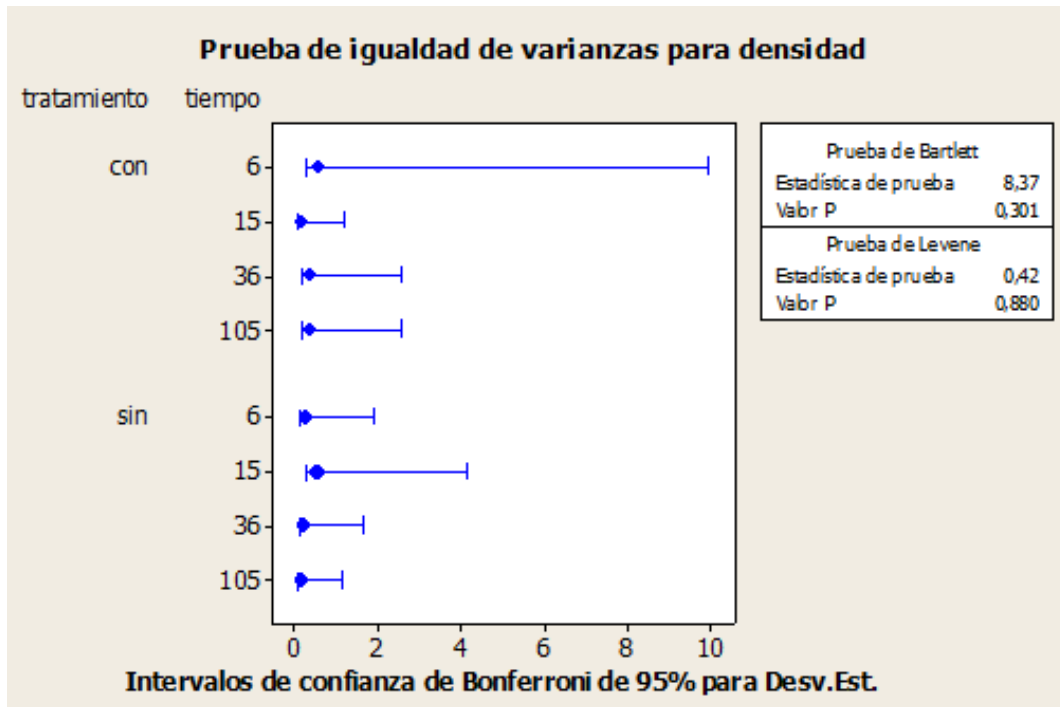
#### 4.3. Anexo 3. ANOVA para la expresión de la proteína p-Akt thr 308

**Tabla 8.** Pruebas t- student ( $p < 0,05$ ) para p-Akt thr 308

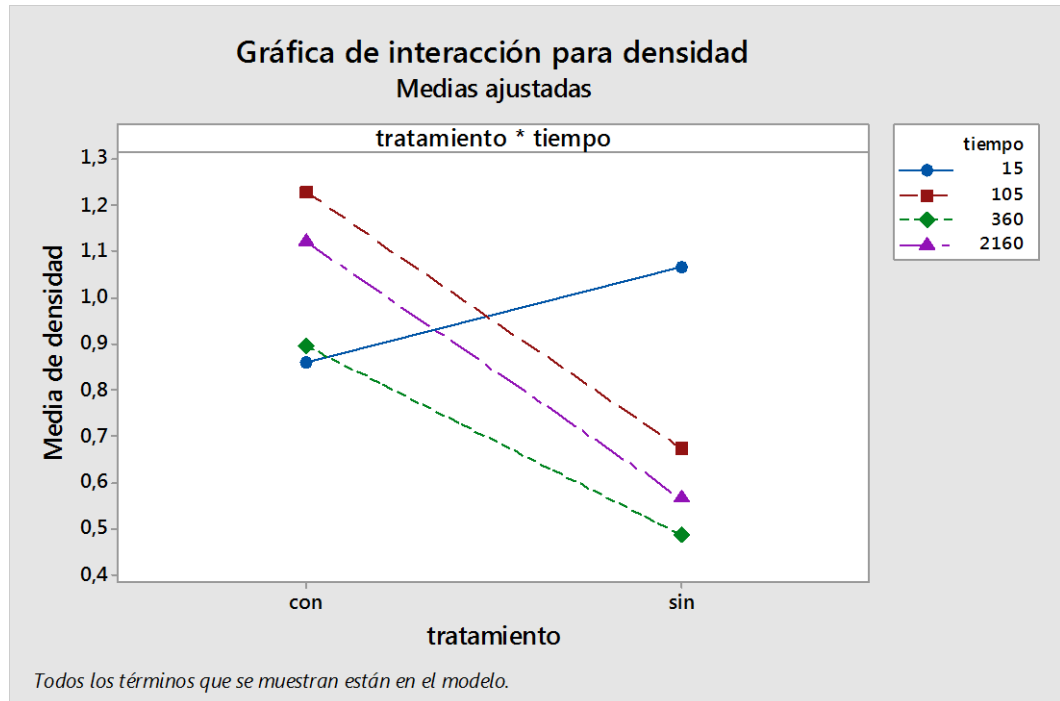
comparación de grupos	Prueba t
F (sin) vs E (con) Controles*	0,119
L (sin) vs K (con)	0,494
N (sin) vs M (con)	0,024
B (sin) vs D (con)	0,239
P (sin) vs O (con)	0,034



**Gráfico 2.** Comprobación del comportamiento normal de los residuos en p-Akt 308



**Gráfico 3.** Comprobación del comportamiento normal de las varianzas en p-Akt thr 308



**Gráfico 4.** Interacción para tratamientos y tiempos en p-Akt thr 308

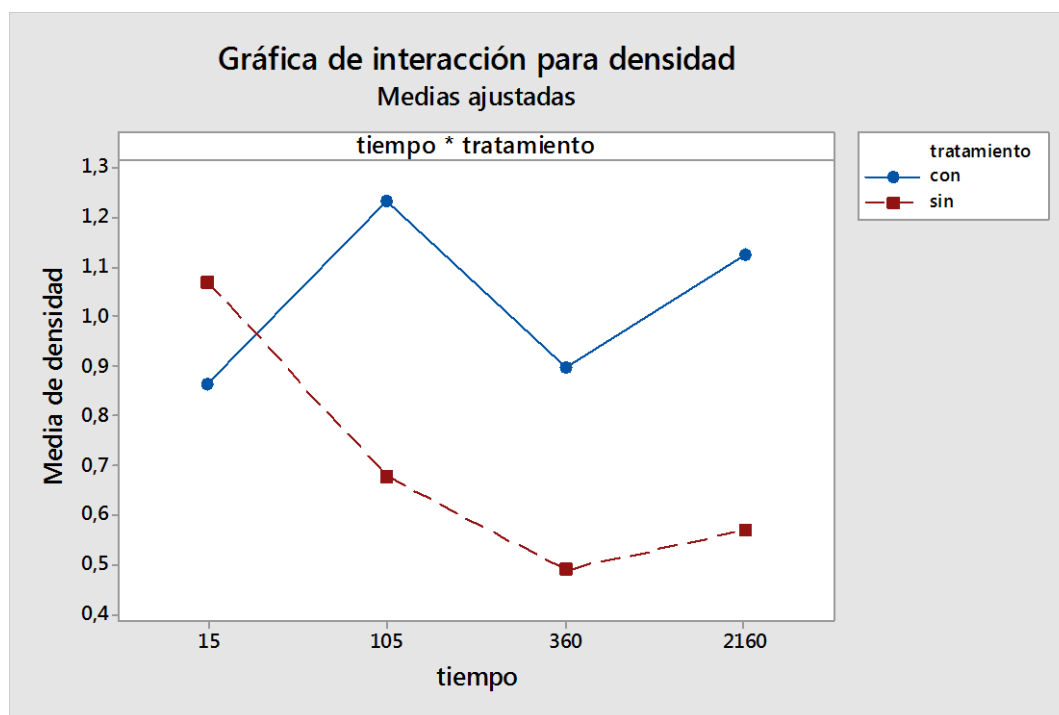


Gráfico 5. Interacción para tiempos y tratamientos en p-Akt thr 308

### **Modelo lineal general: densidad vs. tratamiento; tiempo**

Método

Codificación de factores (-1; 0; +1)

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
tratamiento	1	0,8265	0,8265	7,09	0,014
tiempo	3	0,3490	0,1163	1,00	0,412
tratamiento*tiempo	3	0,7876	0,2625	2,25	0,109
Error	23	2,6820	0,1166		
Total	30	4,7152			

Resumen del modelo

		R-cuad.	R-cuad.
S	R-cuad.	(ajustado)	(pred)
0,341482	43,12%	25,81%	0,00%

### **Comparaciones para densidad**

#### **Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = densidad, Término = tratamiento**

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

tratamiento	N	Media	Agrupación
con	15	1,02504	A
sin	16	0,70000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ICs simultáneos de 95% de Tukey

#### **Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = densidad, Término = tiempo**

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

tiempo	N	Media	Agrupación
15	8	0,965792	A
105	8	0,952925	A
2160	8	0,844620	A
360	7	0,686748	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ICs simultáneos de 95% de Tukey

#### 4.4. Anexo 4. ANOVA para la expresión de la proteína p-Akt ser 473

Tabla 9. Pruebas t- student ( $p < 0,05$ ) para p-Akt ser 473

comparación de grupos	Prueba t
F (sin) vs E (con) Controles*	0,763
L (sin) vs K (con)	0,775
N (sin) vs M (con)	0,138
B (sin) vs D (con)	0,961
P (sin) vs O (con)	0,232

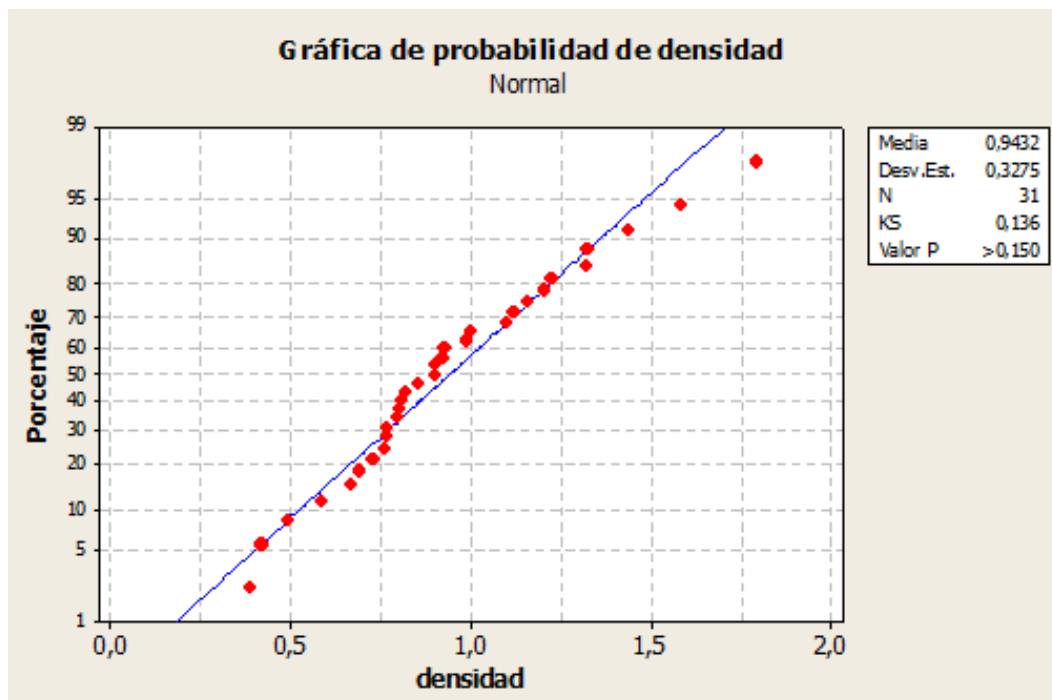
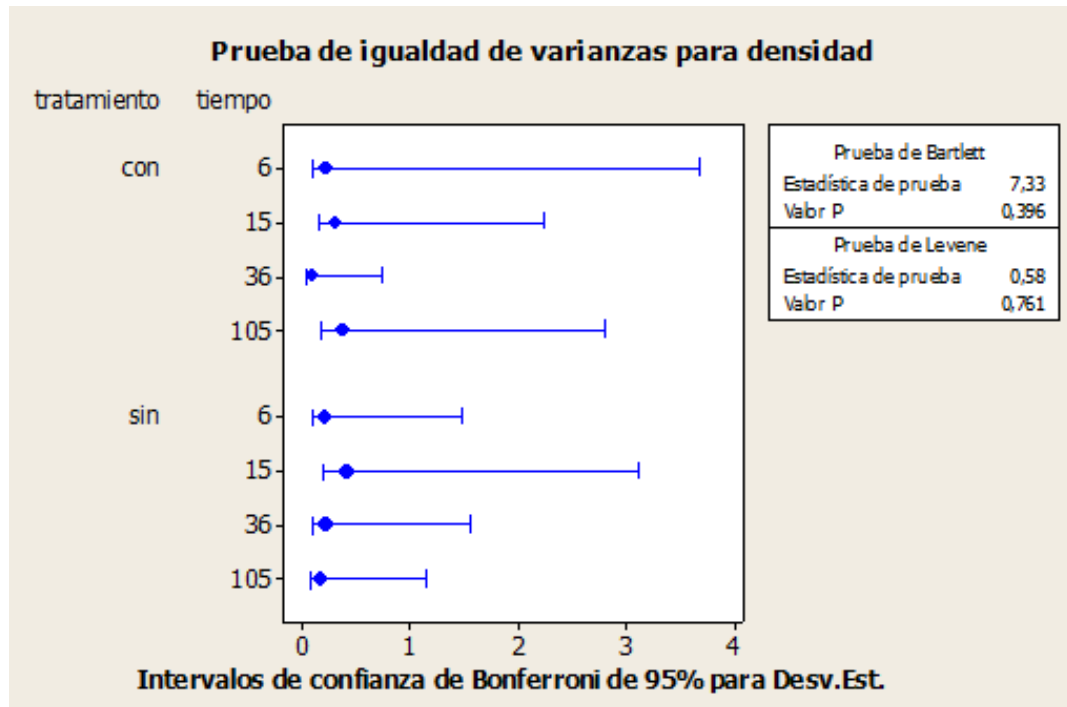
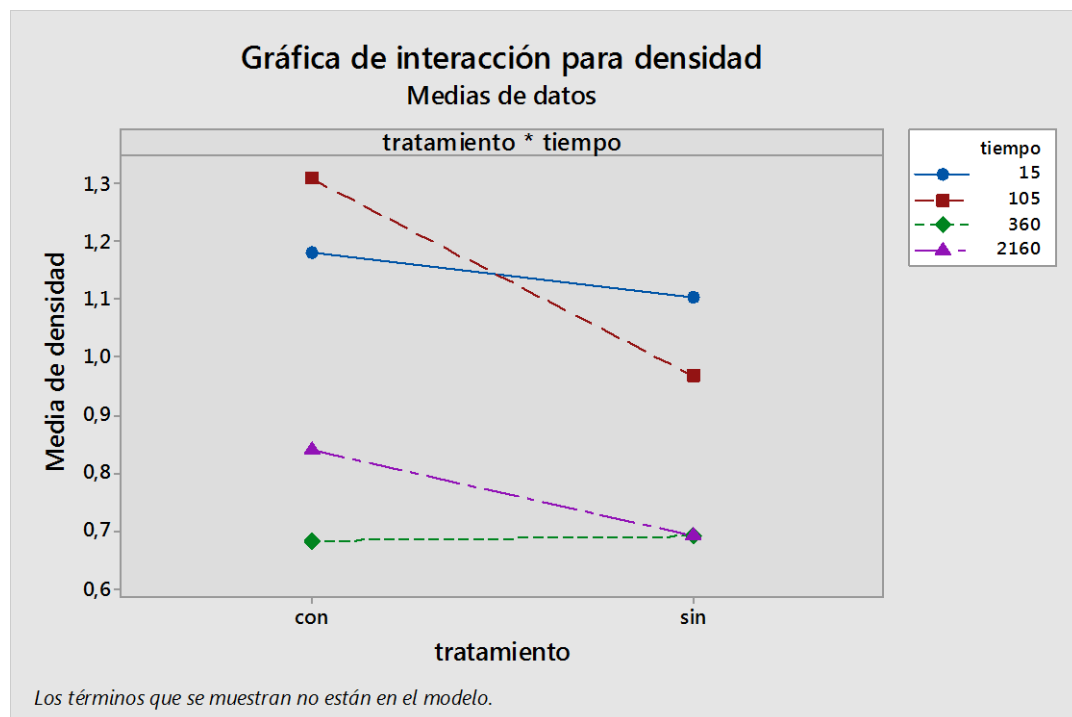


Gráfico 6. Comprobación del comportamiento normal de los residuos de p-Akt ser 473

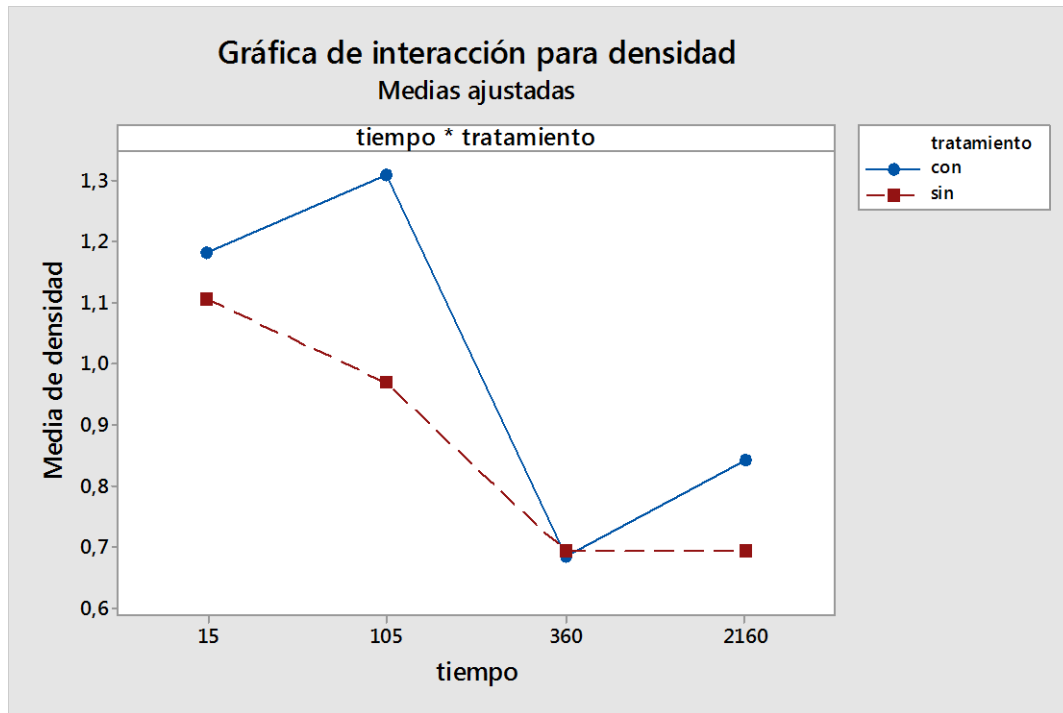




**Gráfico 7.** Comprobación del comportamiento normal de las varianzas en p-Akt ser 473



**Gráfico 8.** Interacción para tratamientos y tiempos en p-Akt ser 473



**Gráfico 9.** Interacción para tiempos y tratamientos en p-Akt ser 473

### **Modelo lineal general: densidad vs. tratamiento; tiempo**

Información del factor

Factor	Tipo	Niveles	Valores
tratamiento	Fijo	2	con; sin
tiempo	Fijo	4	15; 105; 360; 2160

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
tratamiento	1	0,1502	0,15024	2,16	0,155
tiempo	3	1,3242	0,44140	6,36	0,003
tratamiento*tiempo	3	0,1267	0,04223	0,61	0,616
Error	23	1,5962	0,06940		
Total	30	3,2174			

Resumen del modelo

R-cuad. R-cuad.

S	R-cuad.	(ajustado)	(pred)
0,263442	50,39%	35,29%	10,55%

**Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = densidad, Término = tratamiento**

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

tratamiento	N	Media	Agrupación
con	15	1,01054	A
sin	16	0,86521	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ICs simultáneos de 95% de Tukey

**Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = densidad, Término = tiempo**

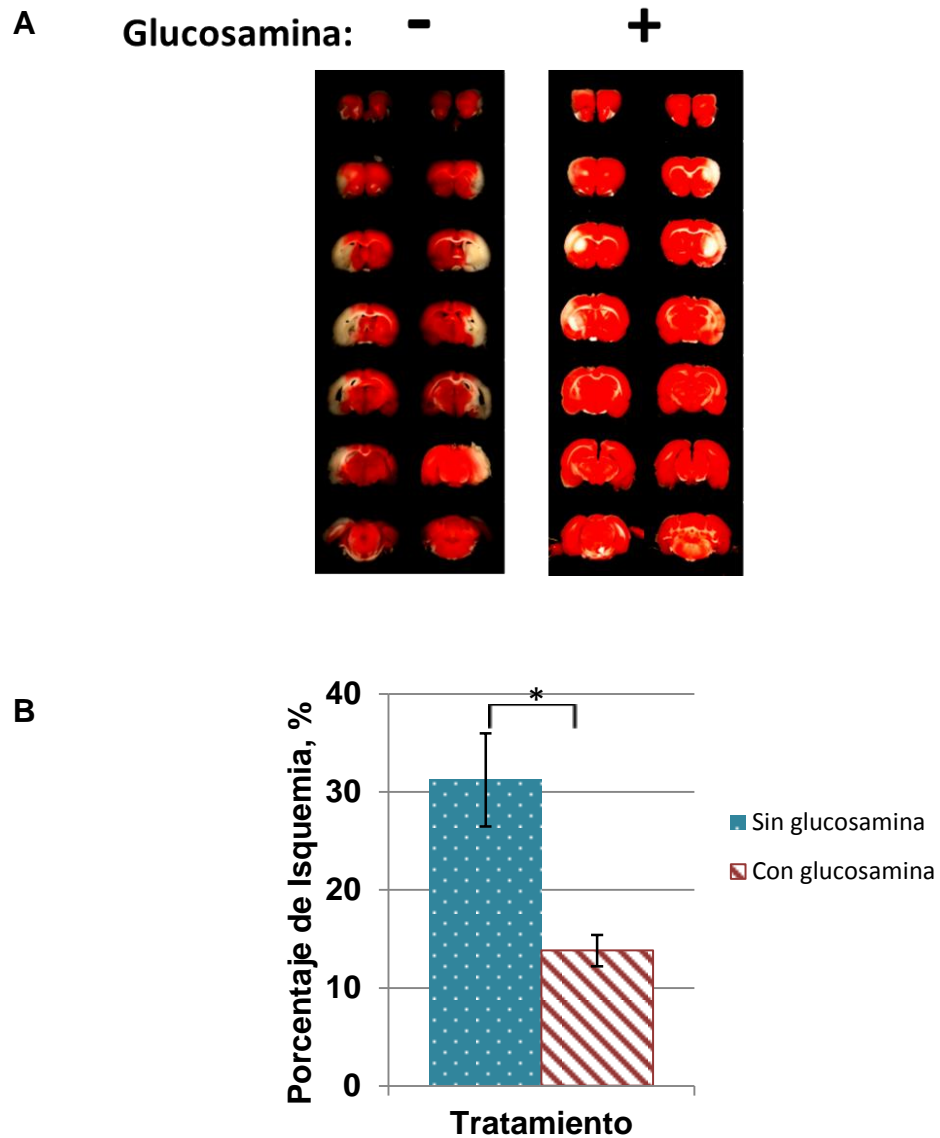
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

tiempo	N	Media	Agrupación
15	8	1,14451	A
105	8	1,13975	A
2160	8	0,76785	B
360	7	0,69940	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

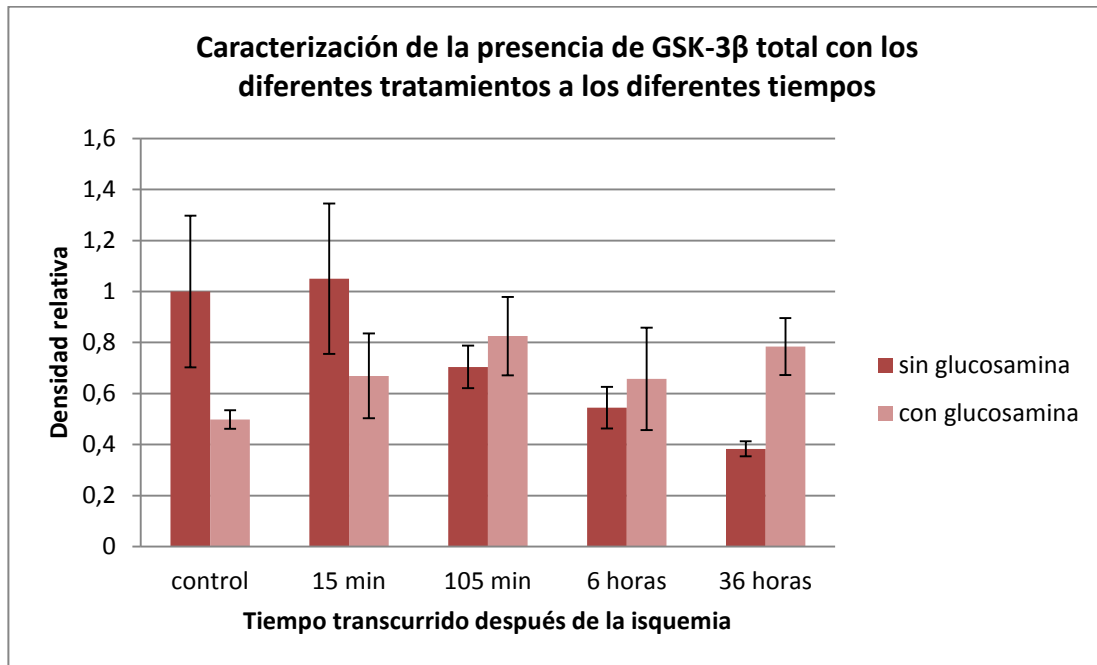
ICs simultáneos de 95% de Tukey

#### 4.5. Anexo 5.

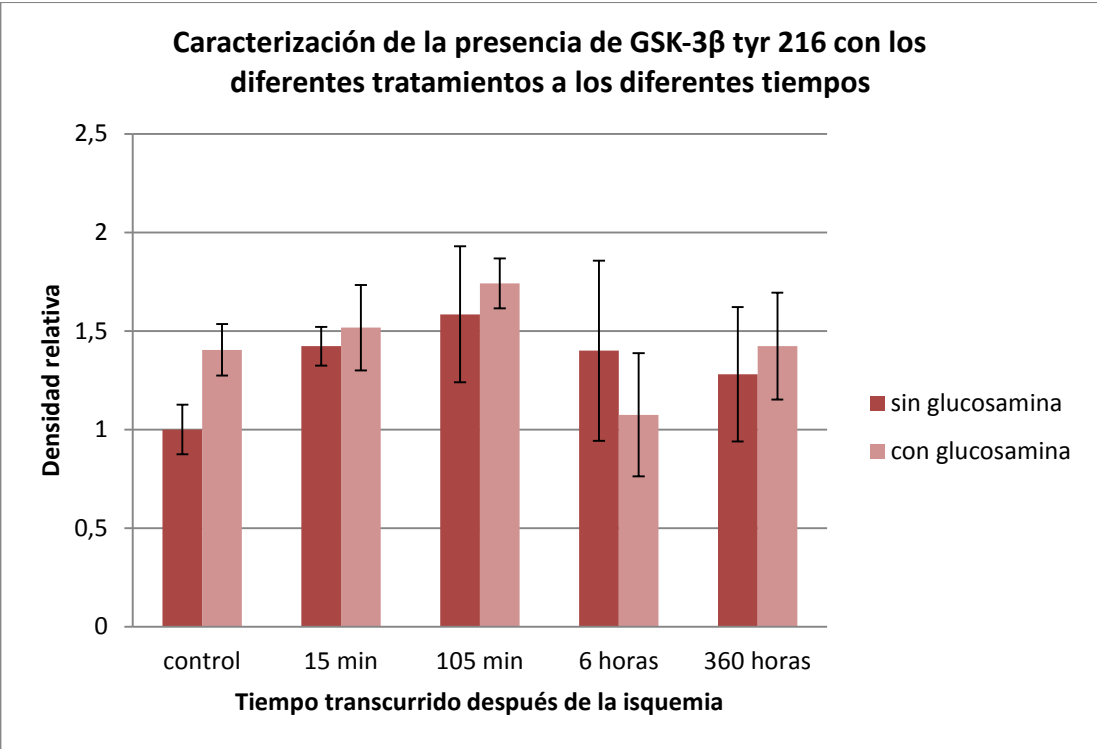


**Figura 4. Tamaño del infarto evaluado con TTC.** TTC como reactivo con el que se destaca en blanco el tejido muerto que no se tiñe de rojo, a las 24 horas de inducida la isquemia en el modelo de isquemia cerebral focal en ratas Wistar MCAO (Middle cerebral artery occlusion). (A) Tinción con TTC de 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).

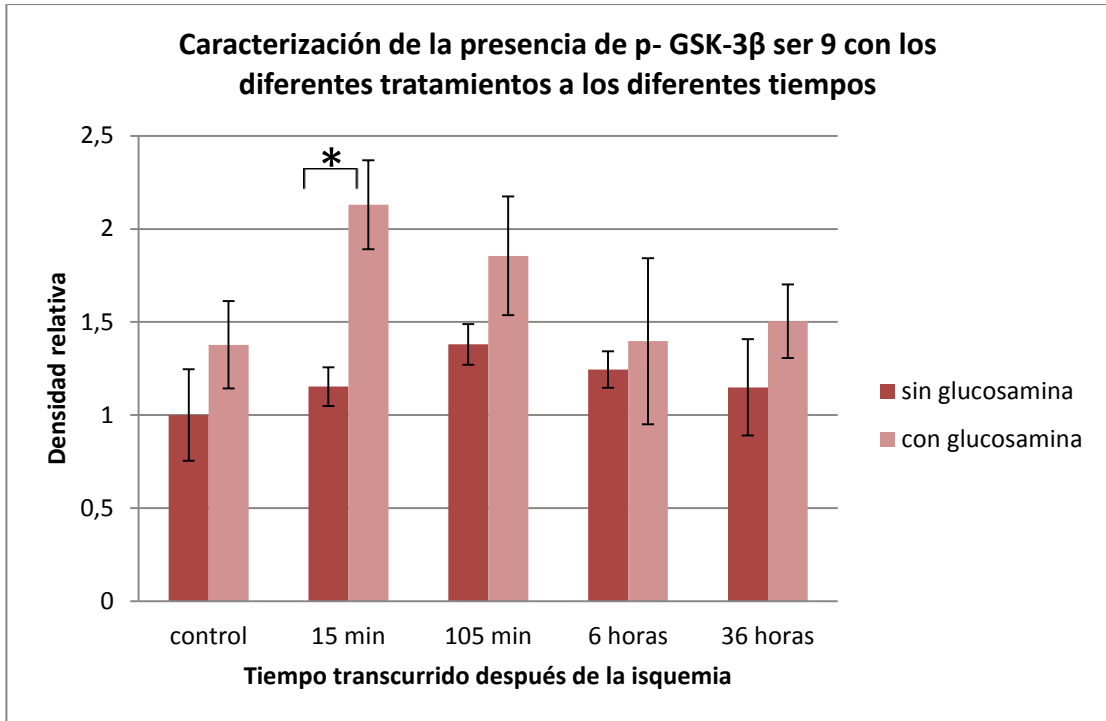
#### 4.6. Anexo 6. Comportamiento de la expresión de p-GSK-3 $\beta$ ser9



**Gráfico 10. Caracterización de la presencia de GSK-3 $\beta$  total con los diferentes tratamientos a los diferentes tiempos**



**Gráfico 11. Caracterización de la presencia de GSK-3 $\beta$  tyr 216 con los diferentes tratamientos a los diferentes tiempos**



**Gráfico 12. Caracterización de la presencia de p- GSK-3 $\beta$  ser 9 con los diferentes tratamientos a los diferentes tiempos**