

EVALUACIÓN DEL PRECONDICIONAMIENTO HIPÓXICO COMO UN
MECANISMO PROTECTOR EN CULTIVOS PRIMARIOS NEURONALES DE
RATA WISTAR

PAULA ANDREA PIPICANO ORDOÑEZ

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2016

EVALUACIÓN DEL PRECONDICIONAMIENTO HIPÓXICO COMO UN
MECANISMO PROTECTOR EN CULTIVOS PRIMARIOS NEURONALES DE
RATA WISTAR

PAULA ANDREA PIPICANO ORDOÑEZ

Proyecto de grado para optar al título de químico farmacéutico

Tutores

Juliana Rengifo Gómez, Ph.D
Julián Arbey González Ospina, MSc

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2016

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mis padres por apoyarme económicamente durante estos 5 años y permitirme estudiar química farmacéutica en la Universidad Icesi. Gracias a eso, estoy culminando mi proceso académico con este proyecto de investigación. Por otra parte, debo agradecer al profesor Álvaro Barrera y al estudiante de doctorado Carlos Fernando Cardozo que me brindaron un valioso acompañamiento durante la parte experimental y el análisis de los resultados, ya que sin su ayuda este proyecto no hubiera sido posible. Adicionalmente, quiero reconocer el apoyo que Natalia Viña me brindó en el desarrollo experimental del proyecto. Finalmente, quiero darles las gracias a mis tutores Juliana Rengifo y Julián González, por creer en mí y confiarme este importante proyecto, además de guiarme durante proyecto de grado I y II.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....	7
2. ABSTRACT.....	8
3. INTRODUCCIÓN.....	9
4. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO	11
4.1 Planteamiento de la pregunta de investigación y justificación	11
4.2 Marco teórico y estado del arte.....	11
4.2.1 Enfermedad cerebrovascular como problema de salud pública.....	11
4.2.2 Isquemia cerebral.....	12
4.2.3 Tratamientos actuales de isquemia cerebral.....	14
4.2.4 Nuevos enfoques	15
4.2.5 Precondicionamiento hipóxico como mecanismo protector.....	17
4.2.6 Glicosilación tipo O-GlcNAc	18
4.3 Objetivos.....	19
4.3.1 Objetivo general	19
4.3.2 Objetivos específicos	19
4.4 Metodología	20
4.4.1 Equipos, materiales y reactivos.....	20
4.4.2 Métodos	21
4.5 Resultados.....	32
4.5.1 Estandarización del cultivo neuronal.....	32
4.5.3 Precondicionamiento hipóxico.....	43
4.6 Discusión de resultados.....	45
4.6.1 Estandarización del cultivo neuronal.....	45
4.6.2 Ensayo de viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia.....	46
4.7 Dificultades	52
4.8 Conclusiones	53
4.9 Recomendaciones	54
4.10 Bibliografía.....	55
ANEXOS.....	58
CARTA APROBACIÓN COMITÉ DE ÉTICA.....	58
ENSAYO MTT	59

FIGURAS

Figura 1. Principales eventos en la isquemia cerebral (Barone & Kilgore, 2006)...	14
Figura 2. Tolerancia isquémica inducida por el preconditionamiento (Tauskela, Aylsworth, Hewitt, Brunette, & Mealing, 2012).....	17
Figura 3. Esquema de la placa de 96 pozos para establecer el número de pozos a usar en el cultivo neuronal.	25
Figura 4. Esquema de la placa de 96 pozos para establecer el número de pozos a usar en el cultivo de astrocitos.....	26
Figura 5. División de la placa de 96 pozos de acuerdo a los tratamientos evaluados para las neuronas.....	26
Figura 6. División de la placa de 96 pozos de acuerdo a los tratamientos evaluados para los astrocitos.....	27
Figura 7. División de la placa de 96 pozos de acuerdo a los tratamientos evaluados para el ensayo de supervivencia celular bajo el tratamiento de preconditionamiento.....	28
Figura 8. División de la placa de 24 pozos de acuerdo a los tratamientos evaluados para el preconditionamiento (inmunocitoquímica).	28

IMÁGENES

Imagen 1. Cámara anaeróbica.....	27
Imagen 2. Montaje experimental para 120 minutos de hipoxia en la etapa de preconditionamiento.....	29
Imagen 3. Imagen de las neuronas del segundo cultivo bajo microscopio de fluorescencia con el anticuerpo NeuN para neuronas a 40X.	33
Imagen 4. Imágenes del cultivo neuronal mixto en el día in vitro 7 con adición de arabinósido de citosina bajo microscopio de fluorescencia con anticuerpo NeuN para neuronas (verde) y GFAP para astrocitos (rojo), tomadas a 40X.	34
Imagen 5. Imágenes del cultivo neuronal mixto en el día in vitro 7, sin adición de arabinósido de citosina, bajo microscopio de fluorescencia con anticuerpos NeuN para neuronas (verde) y GFAP para astrocitos (rojo), tomadas a 40X.	34
Imagen 6. Imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia para visualizar la intensidad de fluorescencia del RL2.	44
Imagen 7. Carta de aprobación del comité de ética	58
Imagen 8. Placa de 96 pozos con MTT después de incubar por 4 horas y adicionar DMSO.	60
Imagen 9. Esquema general del ensayo de viabilidad con MTT de cultivos neuronales mixtos a diferentes tiempos de hipoxia (NB= medio neurobasal; HBSS= solución salina balanceada).....	60

GRÁFICAS

Gráfica 1. Ensayo de viabilidad celular con MTT para obtener el número adecuado de células a sembrar.....	33
Gráfica 2. Promedio de absorbancias a 540nm para el cultivo mixto (neuronas/astrocitos) de 7 días in vitro \pm EEM, bajo diferentes tiempos de hipoxia de la imagen 9.	35
Gráfica 3. Promedio de absorbancia a 540nm para el cultivo de astrocitos de 7 días in vitro \pm EEM, bajo diferentes tiempos de hipoxia.....	35
Gráfica 4. Promedio de viabilidad celular normalizado contra el tratamiento control (0 min de hipoxia) \pm EEM, con un n=22 para evaluar el efecto del suplemento B-27 en esta variable, bajo diferentes tiempos de hipoxia (# = existe diferencia significativa entre esos tratamientos).....	36
Gráfica 5. Promedio de viabilidad celular normalizado contra el tratamiento control (0 min de hipoxia) \pm EEM, con un n=22 para evaluar el efecto de la presencia de glucosa en la viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia (# = existe diferencia significativa entre esos tratamientos).	37
Gráfica 6. Promedio de viabilidad celular normalizado contra el tratamiento control (0 min de hipoxia) \pm EEM con un n=22 para evaluar el efecto de factores de crecimiento y nutrientes diferentes a la glucosa en viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia (# = existe diferencia significativa entre esos tratamientos).	39
Gráfica 7. Promedio de viabilidad celular normalizado contra el tratamiento control (0 min de hipoxia) \pm EEM con un n=22 para evaluar el efecto de la deprivación simultánea de oxígeno y glucosa en la viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia en cultivos mixtos (# = existe diferencia significativa entre esos tratamientos).....	41
Gráfica 8. Promedio de viabilidad celular normalizado contra el tratamiento control (o min de hipoxia) \pm EEM con un n=7 para los tiempos 0 minutos y 120 minutos y un n=6 para los otros tiempos, para evaluar el efecto de la deprivación simultánea de oxígeno y glucosa en la viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia en cultivo de astrocitos (*= existe diferencia significativa respecto al control; # = existe diferencia significativa entre esos tratamientos).	42
Gráfica 9. Promedio de viabilidad celular normalizado contra el tratamiento control (0 min de hipoxia) \pm EEM con un n=8 para evaluar el efecto del acondicionamiento hipóxico en la viabilidad celular (*=existe diferencia significativa respecto al control; # =existe diferencia significativa entre esos tratamientos).....	43
Gráfica 10. Promedio de intensidad de fluorescencia del RL2/célula, normalizados contra el tratamiento control (0 min hipoxia) \pm EEM, para evaluar los niveles de O-GlcNAcilación después del acondicionamiento hipóxico (*= existe diferencia significativa respecto al control; # =existe diferencia significativa entre esos tratamientos).....	44

1. RESUMEN

La principal causa de mortalidad en el mundo son las enfermedades cardiovasculares, según la Organización Mundial de la Salud 3 de cada 10 muertes son causadas por esta patología, que incluye los accidentes cerebrovasculares. En Colombia, las enfermedades cerebrovasculares son la tercera causa de mortalidad con un 29,13%. Teniendo en cuenta que la isquemia cerebral es una de estas complicaciones, se han llevado a cabo diversos estudios para encontrar un tratamiento seguro y eficaz. No obstante, en todo este tiempo, no se ha encontrado un fármaco neuroprotector efectivo contra esta enfermedad. Por esta razón, recientes estudios han centrado su atención en los mecanismos de protección endógenos presentes en el cerebro, los cuales pueden conferir tolerancia al sistema nervioso central ante un episodio de isquemia cerebral letal.

Uno de los tratamientos que se ha planteado que puede generar protección ante un evento isquémico letal, es el preconditionamiento hipóxico. Este término hace referencia a la protección ante un insulto letal que produce un periodo corto de hipoxia. Por tal motivo, este proyecto buscó implementar un cultivo primario de neuronas de rata Wistar, con el objetivo de medir *in vitro* el efecto que tiene el preconditionamiento hipóxico sobre la supervivencia celular y los niveles de O-GlcNAc de proteínas, antes de un estímulo hipóxico letal.

Los principales resultados obtenidos fueron que el tratamiento de preconditionamiento hipóxico y con privación de oxígeno y glucosa (OGD) mostró ser más letal para las células (neuronas y astrocitos) que 120 minutos de hipoxia y el control (0 minutos de hipoxia), lo que indica que las vías que al parecer se activaron en las neuronas al exponerse a un OGD, fueron las apoptóticas o necróticas.

Adicionalmente, se encontró que los niveles de glicosilación O-GlcNAc están relacionados con el estrés celular, a mayor tiempo de exposición a la hipoxia mayor glicosilación se presenta, lo que indica que esta modificación post-traducciona está implicada en las vías de supervivencia activadas por estrés celular. Sin embargo, aún no es posible relacionar el preconditionamiento hipóxico con un aumento en los niveles de glicosilación de proteínas.

De esta manera, la finalidad principal de este trabajo de investigación es aportar al entendimiento del mecanismo molecular neuroprotector que favorece el preconditionamiento hipóxico, en las neuronas de rata Wistar; siendo el paso inicial para desarrollar un modelo *in vitro* que permita una posterior caracterización de las proteínas involucradas en este tipo de neuroprotección.

Palabras claves: hipoxia, neuroprotección, cultivo primario, O-GlcNAc.

2. ABSTRACT

The leading cause of death worldwide is cardiovascular disease, according to the World Health Organization 3 out of 10 deaths are caused by this disease, including stroke. In Colombia, cerebrovascular diseases are the third cause of mortality with 29.13%. Given that cerebral ischemia is one of these complications, several studies have been developed to find a treatment. However, in all this time, it has not been found an effective neuroprotective agent in this disease. For this reason, recent studies have focused on endogenous protective mechanisms in the brain, which can confer tolerance to the central nervous system before a lethal episode of cerebral ischemia.

One treatment that has arisen that can generate protection against a lethal ischemic event is hypoxic preconditioning. This term refers to the protection against a lethal insult of hypoxia produced by a previous short period of hypoxia. Therefore, this project sought to implement a primary culture of Wistar rat cerebral cells, in order to measure in vitro the effect of hypoxic preconditioning on cell survival and levels of protein O-GlcNAc before a hypoxic stimulus lethal.

The main results were that treatment of hypoxic preconditioning and oxygen glucose deprivation (OGD) proved more lethal to cells (neurons and astrocytes) than the lethal stimulus (positive control) and the positive control, indicating that apparently the pathways that were activated in neurons when exposed to OGD were apoptotic or necrotic.

Additionally, it was found that levels of O-GlcNAc glycosylation are related to cell stress, the longer the exposure to hypoxia as glycosylation occurs, indicating that this post-translational modification is involved in survival pathways activated by cellular stress. However, it is still not possible to relate the hypoxic preconditioning with increased levels of protein glycosylation.

Thus, the main purpose of this research is to contribute to the understanding of the molecular mechanism that promotes neuroprotective hypoxic preconditioning in Wistar rat neurons; it is the initial step to develop an in vitro model that allows further characterization of the proteins involved in this type of neuroprotection.

Keywords: hypoxia, neuroprotection, primary culture, O- GlcNAc.

3. INTRODUCCIÓN

Una de las principales causas de muerte en el mundo son las enfermedades cerebrovasculares, entre las que se destaca la isquemia cerebral. En Colombia, estas patologías ocupan el tercer lugar en la lista de causas de mortalidad con un 29,31% (Centro de Innovación Fundación Santa Fe de Bogotá, 2009).

La isquemia cerebral es un trastorno neurológico focal no convulsivo que persiste más de 24 horas y es causada por la obstrucción de la circulación de una región del cerebro. Esta disminución en el flujo sanguíneo, evita que se genere una adecuada liberación de oxígeno, glucosa y otros nutrientes, que puede incrementar el riesgo de infarto, es decir causar la muerte de las neuronas, células gliales y otras células como las vasculares (Sharp, y otros, 2004).

Debido al gran impacto sobre la calidad de vida que presenta esta patología, se han tratado de desarrollar terapias farmacológicas que mitiguen o prevengan su aparición. No obstante, los esfuerzos no han tenido buenos resultados y todavía no se cuenta con fármacos neuroprotectores efectivos. Por tal motivo, se ha centrado la atención en investigar los mecanismos neuroprotectores endógenos presentes en el cerebro que permitan combatir esta enfermedad (Lehotsky, Burda, Danielisová, Gotlieb, & Saniová, 2009).

Diferentes estudios han demostrado que cortos periodos de hipoxia, horas antes de una exposición letal a hipoxia, pueden conferir una neuroprotección significativa en animales de experimentación. Por lo que el preconditionamiento hipóxico se plantea como un tratamiento que favorece el mecanismo protector celular ante un estímulo letal (Jones & Bergeron, 2004).

Existen otros tipos de preconditionamiento que han sido estudiados en diferentes órganos, y consisten en exponer las células a cortos periodos de un estímulo no letal para que, posteriormente, las células desarrollen tolerancia a este estímulo. Entre estos se encuentran: hipotermia, hipertermia, preconditionamiento químico por bloqueo de la cadena respiratoria o el ciclo de Krebs, entre otros (Sharp, y otros, 2004). Sin embargo, el principal enfoque se ha centrado en la hipoxia, puesto que es el factor más frecuente asociado a lesión celular en el sistema nervioso central y produce alteración en el funcionamiento metabólico celular, falla en la bomba sodio potasio ATPasa, que causan un cúmulo de líquido en las neuronas, células gliales y endoteliales (Pimienta & Escobar, 2008).

Por lo anterior, este trabajo pretendió evaluar el preconditionamiento hipóxico como mecanismo protector en un cultivo de neuronas de rata wistar, antes de un evento hipóxico letal. Para esto se midió el efecto de este tratamiento sobre la supervivencia celular.

Por otra parte, la glicosilación de proteínas es una modificación post-traducciona l de proteínas nucleares, citoplásmicas y mitocondriales, la cual es esencial en numerosos procesos biológicos y en las vías de señalización celular. Se ha

observado que O-GlcNAc actúa como una señal inducida por estrés con efectos de supervivencia celular. Además, en miocardio, el preconditionamiento isquémico puede incrementar los niveles de O-GlcNAc (Jensen, Johnsen, Kristiansen, Zachara, & Botker, 2013), pero no se ha determinado si en cerebro el preconditionamiento hipóxico y este tipo de modificación están relacionados. Es por esto que se evaluó el efecto del preconditionamiento hipóxico sobre los niveles de O-GlcNAc en neuronas de rata wistar, mediante inmunofluorescencia.

La metodología que se llevó a cabo consta de dos partes: la primera consistió en desarrollar y estandarizar el método de cultivo primario de neuronas de rata wistar, para posteriormente, implementar la segunda parte, que es un protocolo de preconditionamiento hipóxico y un estímulo hipóxico letal, en el que se evaluó el efecto de este tratamiento sobre la supervivencia celular y los niveles de O-GlcNAc. Para desarrollar el modelo *in vitro*, a partir de ratas recién nacidas se aislaron células cerebrales y se sembraron en placas de 96 pozos en un medio de cultivo neuronal, que permitió el crecimiento óptimo de estas células.

Los cultivos se mantuvieron por 7 días, en los que se les realizaron tres cambios del medio, para garantizar el buen estado de las células. En el día *in vitro* 7, se efectuó un ensayo de viabilidad celular con MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), bajo diferentes tiempos de hipoxia, con el objetivo de evaluar el efecto de estos sobre la viabilidad celular, poder establecer los tiempos de estímulo no letal y letal, que fueron usados en la segunda parte de la metodología.

Por otra parte, el preconditionamiento hipóxico se efectuó con base en los resultados de tiempos de hipoxia y la revisión bibliográfica, en donde se escogieron a 30 minutos como estímulo no letal y 120 minutos como letal. El procedimiento consistió en exponer un cultivo en el día *in vitro* 7, a 30 minutos de hipoxia, seguido de 1 hora de recuperación (condiciones de normoxia), luego 120 minutos de hipoxia y, finalmente, a las 24 horas se evaluaron la supervivencia celular y los niveles de O-GlcNAc. Para el primer parámetro, se utilizó el ensayo de MTT, como indicador de la viabilidad celular; y para los niveles de glicosilación de proteínas, se usó un anticuerpo específico que detecta la glicosilación tipo O-GlcNAc e inmunofluorescencia.

Los principales resultados obtenidos fueron que el tratamiento de preconditionamiento hipóxico y con deprivación de oxígeno y glucosa (OGD) mostró ser más letal para las células (neuronas y astrocitos) que el estímulo letal de 120 minutos (control positivo) y el control negativo. Adicionalmente, se encontró que los niveles de glicosilación O-GlcNAc están relacionados con la viabilidad celular, a mayor supervivencia mayor glicosilación se presenta. Sin embargo, aún no es posible relacionar el preconditionamiento hipóxico con un aumento en los niveles de glicosilación de proteínas.

4. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO

4.1 Planteamiento de la pregunta de investigación y justificación

De acuerdo a la Organización Panamericana de la Salud en su reporte de indicadores para Colombia entre los años 2008-2010, las enfermedades cardiovasculares fueron la primera causa de muerte en la población general (enfermedad isquémica 83,7 defunciones por 100.000 habitantes y enfermedad cerebrovascular 42,6). Para el 2009, la mortalidad por enfermedades cerebrovasculares en personas de 45 y más años de edad fue de 13.113 defunciones por 100.000 habitantes, lo que pone de manifiesto la importancia que tienen, en la salud pública, las enfermedades cerebrovasculares.

Desde hace 5 años el grupo de investigación Natura ha desarrollado estudios que ayuden a entender el mecanismo molecular involucrado en la isquemia cerebral, una de las patologías cerebrovasculares que más aqueja a la población, con el objetivo de plantear estrategias para contrarrestar los efectos de esta enfermedad. Es por esto que este proyecto se centró en estudiar un tratamiento que permita a las células neuronales responder ante un estímulo letal, al estimular un mecanismo neuroprotector endógeno. Este tratamiento se denomina preconditionamiento, pues consiste en exponer las células de un tejido a un estímulo no letal, antes de un insulto letal, lo que generará una protección frente a ese mismo estímulo.

Este trabajo de investigación se enfocó en el preconditionamiento hipóxico como tratamiento neuroprotector, el cual fue evaluado *in vitro* en cultivos primarios de neuronas y astrocitos de rata Wistar, con el fin de establecer el efecto que tiene este tratamiento, en la protección celular endógena, midiendo el porcentaje de supervivencia celular después de un estímulo hipóxico letal.

Con este proyecto se logró aportar a la estandarización del modelo *in vitro* de preconditionamiento hipóxico, siendo el paso inicial para una posterior caracterización de las proteínas involucradas en los mecanismos de neuroprotección endógena en el cerebro de rata Wistar, lo cual generará mayor conocimiento sobre los posibles tratamientos de la isquemia cerebral.

4.2 Marco teórico y estado del arte

4.2.1 Enfermedad cerebrovascular como problema de salud pública

La Organización Mundial de la Salud, define la enfermedad cerebrovascular como el rápido desarrollo de signos focales o globales de compromiso de la función cerebral, con síntomas de veinticuatro horas o más de duración o que lleven a la

muerte, sin otra causa que el origen vascular (WHO, 2015). La importancia de la enfermedad cerebrovascular se basa en su alta tasa de recurrencia, el impacto sobre la calidad de vida de las personas, la discapacidad que produce y el alto índice de mortalidad.

En todo el mundo, el 42% de las defunciones por enfermedades cardiovasculares están relacionadas con la cardiopatía isquémica, 34% con enfermedades cerebrovasculares, 7% con enfermedad hipertensiva y 2% con cardiopatía reumática. En Colombia, de las defunciones debidas a la enfermedad cardiovascular, el 56,3% se debieron a enfermedad cardiaca isquémica, 30,6% a enfermedad cerebrovascular, 12,4% a enfermedad hipertensiva (Instituto Nacional de Salud, 2013). Es por esto que se presenta un gran interés por estudiar la enfermedad cerebrovascular y todos los eventos patológicos que esta conlleva.

El estudio de la enfermedad cerebrovascular se ha dirigido a entender tanto los mecanismos moleculares y fisiopatológicos de la isquemia cerebral y la muerte neuronal, su recuperación y estrategias de intervención farmacológica, así como el comportamiento clínico y epidemiológico. Colombia ha sido uno de los países pioneros en los estudios poblacionales de la enfermedad cerebrovascular en Latinoamérica. Sin embargo, aunque se ha podido profundizar en el conocimiento poblacional de esta enfermedad y en el aporte de nuevas estrategias terapéuticas agudas y de mantenimiento, aún no se logra un cambio sustancial en la frecuencia de la enfermedad y en la discapacidad generada en la población (Silva, y otros, 2006).

Uno de los principales avances que se han logrado sobre el comportamiento epidemiológico de la enfermedad cerebrovascular es determinar los principales factores de riesgo, los cuales se enfocan principalmente en enfermedades vasculares (Haight, y otros, 2015). Sin embargo, algunas enfermedades como dislipidemia, obesidad, hipertensión, diabetes mellitus y migraña, son consideradas como factores de riesgo, los cuales dependen de la locación geográfica y el criterio de diagnóstico usado (Tarazona, y otros, 2010).

Anteriormente se pensaba que la enfermedad cerebrovascular afectaba principalmente a personas mayores de 75 años, no obstante se han desarrollado estudios que muestran que del 5-15% de los pacientes se encuentran por debajo de los 50 años. Lo anterior, implica que esta enfermedad reduce la calidad de vida de estas personas, causando discapacidad en la mayoría de los pacientes que sobreviven a un episodio de isquemia cerebral (Tarazona, y otros, 2010).

4.2.2 Isquemia cerebral

La enfermedad cerebrovascular es un grupo heterogéneo de condiciones patológicas, cuya característica común es la disfunción focal del tejido cerebral por un desequilibrio entre el aporte y los requerimientos de oxígeno, y otros

substratos. Puede incluir el infarto cerebral, ataque isquémico transitorio y la isquemia cerebral instaurada como tal (Muñoz C, 1997).

Es importante tener en cuenta que la isquemia cerebral es un evento patológico clave en varios estados de enfermedad; entre los más comunes están: el accidente cerebrovascular, paro cardíaco, y trauma cerebral. En donde el accidente cerebrovascular es una de las principales causas de muerte en el mundo y la principal causa de discapacidad neurológica a largo plazo (Ouyang, Xu, Yue, Liu, & Giffard, 2014).

El pronóstico de los pacientes con enfermedad cerebrovascular depende de la extensión de la lesión o la severidad de la isquemia, y los mecanismos lesivos fisiopatológicos posteriores. Una interrupción del flujo sanguíneo cerebral y por ende, la carencia de oxígeno y glucosa, genera la activación de vías metabólicas algunas protectoras y otras lesivas en las neuronas, que pueden terminar en muerte celular (Arango D, Escobar B, Cardona G, & Pimienta J, 2004). La necrosis y muerte neuronal se produce cuando hay una reducción en el flujo sanguíneo por debajo de 10mL/100 g/min. El área afectada de manera irreversible, denominada centro necrótico, se rodea por una zona en la que la isquemia cerebral es menos marcada; ésta se conoce como zona de penumbra. Aunque las neuronas en esta zona se encuentran en un “silencio eléctrico”, pueden recuperarse, y son el objetivo directo de las estrategias terapéuticas actuales, que por medio de la neuroprotección buscan disminuir el tamaño del centro necrótico impidiendo la muerte neuronal en la zona de penumbra (Silva, y otros, 2006).

Se ha observado que la isquemia cerebral desencadena una secuencia de fenómenos celulares a corto y largo plazo. Los primeros cambios en el territorio comprometido por la isquemia están precedidos por una disminución del ATP celular, lo que lleva a la activación de la glucólisis anaerobia, la acidosis y la falla de las bombas de intercambio iónico dependientes de ATP. Las neuronas y las células gliales se despolarizan exageradamente por la entrada de sodio, cloro, calcio y agua al citoplasma (Arango D, Escobar B, Cardona G, & Pimienta J, 2004).

El fracaso energético y los cambios iónicos asociados ocasionan un incremento de la liberación de glutamato, una hiperexcitación de los receptores glutamatérgicos de N-metil-D-aspartato (NMDA) ionotróficos y metabotróficos, y de los receptores del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), lo que converge en un incremento aun mayor de la concentración de calcio intracelular (Doyle, Simon, & Stenzel-Poore, 2008). El incremento de calcio, junto con la acidosis y la despolarización, contribuyen a la iniciación del daño; más tarde, la inflamación y la activación de fenómenos apoptóticos favorecen el incremento de la lesión.

Asimismo, durante la isquemia se generan radicales libres, entre los que se incluye el monóxido de nitrógeno (NO) (White, y otros, 2000). Estas moléculas

altamente reactivas se producen en los estados iniciales y tardíos de la isquemia cerebral mediante mecanismos fisiopatológicos diferentes: en primer lugar, se producen especies reactivas de oxígeno por el metabolismo del ácido araquidónico y la NO sintasa neuronal (nNOS); en estados intermedios, los radicales libres de oxígeno son el aporte correspondiente a la infiltración de neutrófilos en el área isquémica, y en estados más tardíos interviene la síntesis y activación de las enzimas NO sintasa inducible (iNOS) y la cicloxigenasa-2 (COX-2) (Barone & Kilgore, 2006).

La isquemia cerebral desencadena una serie compleja de sucesos moleculares, entre los cuales se encuentra la activación y expresión de genes. Algunos de estos fenómenos parten de la reacción inmediata de la neurona al daño, otros se asocian a procesos celulares que determinan el destino próximo de la neurona afectada y otros coordinan los mecanismos de reparación de la neurona y los tejidos (Li, Chopp, Powers, & Jiang, 1997).

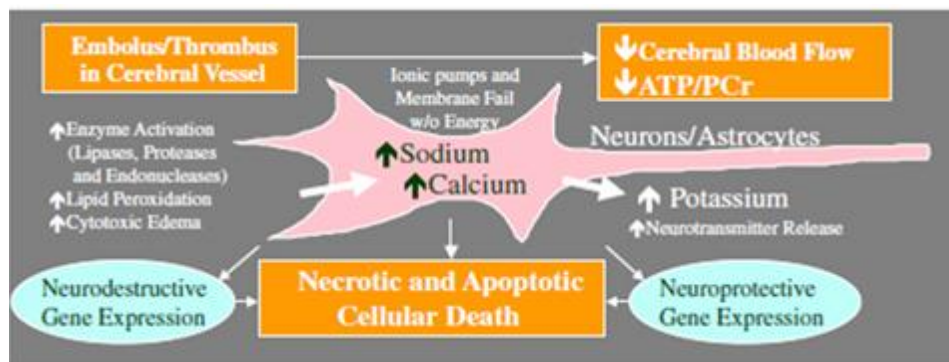


Figura 1. Principales eventos en la isquemia cerebral (Barone & Kilgore, 2006).

A pesar de los considerables avances logrados en el conocimiento del accidente cerebrovascular isquémico, esta sigue siendo una de las áreas de enfoque de las investigaciones cardiovasculares actuales, debido a sus limitadas opciones terapéuticas (Lv, Fang, Geng, Li, & Sha, 2011).

4.2.3 Tratamientos actuales de isquemia cerebral

Después de realizarse diversos ensayos clínicos para mitigar los efectos del accidente cerebrovascular, el único tratamiento eficaz hasta la fecha es la trombólisis (Blakeley & Llinas, 2007). Del mismo modo, el tratamiento clínicamente eficaz para la lesión cerebral, como resultado de un paro cardíaco y reanimación, se limita a la hipotermia (Holzer, 2002).

La trombólisis con activador tisular del plasminógeno (rt -PA) fue aprobada en 1996 por la FDA para el tratamiento del ictus isquémico. Aunque esta terapia conduce a la supervivencia temporal de las células cerebrales en la región isquémica, mediante la recuperación del suministro de oxígeno y de nutrientes,

una deficiencia secundaria, a menudo se produce después de la recuperación de la isquemia (Eltzsching & Eckle, 2011). Además, debido a la estrecha ventana terapéutica de este tratamiento (entre 3 y 6 horas), a los estrictos criterios de exclusión e inclusión y las complicaciones que se pueden generar al usarlo, los pacientes beneficiados son muy pocos y sus restricciones son bastantes (Doyle, Simon, & Stenzel-Poore, 2008).

Los beneficios de esta terapia son menores cuando la oclusión ocurre en una arteria de largo calibre como la arteria carótida interna, el origen de la arteria cerebral media o el tronco de la arteria basilar. Por lo tanto, se han implementado terapias endovasculares como la intervención neurovascular, la cual ha mostrado eficacia y seguridad en gran cantidad de pacientes. Estas terapias incluyen: trombólisis intra-arterial, angioplastia con stent y disrupción mecánica y extracción del coágulo. La principal desventaja de estas intervenciones es que requieren una mayor complejidad organizativa y técnica, y hay muy pocos centros que pueden ofrecerlas (Cruz Culebras, y otros, 2010).

Es por esto que se ha hecho énfasis en la necesidad de encontrar fármacos neuroprotectores o terapias seguras y efectivas, que puedan superar las fases de estudios clínicos y ser utilizados para tratar la isquemia cerebral.

4.2.4 Nuevos enfoques

Teniendo en cuenta que los procesos fisiopatológicos de la isquemia cerebral son el resultado de la secuencia de fenómenos celulares y moleculares a corto y largo plazo, que confluyen en dos modalidades de muerte: la primera, relacionada directamente con el déficit energético, o muerte necrótica, y la segunda, que requiere de un adecuado suministro energético de la neurona y corresponde a la muerte celular programada o apoptosis, se han tratado de evaluar diferentes moléculas que actúan en diferentes puntos de las cascadas de muerte por necrosis o por apoptosis y que interfieren con estos procesos, prolongando la vida de las neuronas (Arango D, Escobar B, Cardona G, & Pimienta J, 2004). Estos fármacos parecen promisorios como estrategia de neuroprotección y son el sustrato para estudios en animales de experimentación y estudios clínicos en seres humanos. No obstante, no se han obtenido resultados concluyentes hasta el momento.

Adicionalmente, en los últimos años se han evaluado diferentes tratamientos de neuroprotección y neuroreparación, los cuales influyen en los mecanismos de excitotoxicidad (liberación de glutamato y activación del receptor), entrada de calcio, "barrido" de ROS, producción de óxido nítrico, reacciones inflamatorias y apoptosis. La neuroprotección se define como cualquier estrategia que se enfoca directamente al parénquima cerebral, con el objetivo de antagonizar los eventos moleculares y celulares nocivos, responsables del daño isquémico, permitiendo

que las células neuronales sobrevivan a la reducción del flujo sanguíneo y estabilizar la penumbra (Moretti, Ferrari, & Villa, 2015).

La neuroprotección es un mecanismo endógeno que se puede presentar como respuesta al estrés celular, y como se ha estudiado para tratar la isquemia cerebral, se le ha denominado tolerancia isquémica. Esta tolerancia puede ser inducida por diferentes tratamientos que se muestran en la tabla 1. La mayoría de estos mecanismos son potencialmente dañinos para el cerebro, pero cuando son administrados en dosis insuficientes para causar daño permanente, pueden estimular una respuesta de protección celular que reduce el daño causado por eventos isquémicos posteriores (Zemke, Smith, Reeves, & Majid, 2004).

La tolerancia que las células pueden generar a ciertos estímulos, no es un fenómeno desconocido; por el contrario, se sabe que ciertos animales son capaces de sobrevivir bajo condiciones de perfusión sanguínea extremadamente bajas, lo que se denomina hibernación. Es más, la tolerancia isquémica puede ser considerada como una forma conservada evolucionariamente de plasticidad cerebral (Lehotsky, Burda, Danielisová, Gotlieb, & Saniová, 2009).

Tabla 1. Algunos tratamientos de neuroprotección que se han estudiado (Jones & Bergeron, 2004).

Clase	Tratamiento	Mecanismos	Referencias
Anti excitotoxicidad	Sulfato de magnesio	Disminución en la liberación de glutamato; bloqueo de los canales iónicos de NMDA; bloqueo de los canales de calcio; hipotermia	Mayer et al. (1984); Kang et al. (2011); Song et al. (2013)
Antioxidante	Edavarone, Ebselen	“Scavenger” de ROS	Lapchak & Zivin (2003); Banno et al. (2005); Parnham & Sies (2013)
	Ácido úrico	“Scavenger” de ROS	Ames et al. (1981); Yu et al. (1998)
Factores de crecimiento hematopoyético	G-CSF, EPO	Reducción de la excitotoxicidad inducida por glutamato; antiinflamatorio; favorece angiogénesis y neurogénesis	Villa et al. (2003); Hasselblatt et al. (2006); England et al. (2009)
No farmacológico	hipotermia	Reducción de la demanda metabólica; preservación de reservas energéticas; disminución de lactato, glutamato y ROS	Karibe et al. (1994); Erecinska et al. (2003); Campos et al. (2012); Yenary & Han (2012)
Medicina regenerativa	Terapia basada en células	Producción de factores tróficos; angiogénesis; inmunomodulación; antiinflamatorio	Zheng et al. (2010); Oki et al. (2012); Tornero et al. (2013); Obokata et al. (2014)
Reparación endógena	Pre-Post condicionamiento	Múltiples dianas, incluyendo: inflamación, post-traducciona; mecanismos epigenéticos	Hoyte et al. (2006); Tang et al. (2006); Dirnagl et al. (2009);

A los tratamientos mencionados en la tabla 1, se les ha denominado neuroprotectores (Jones & Bergeron, 2004). Uno de estos tratamientos es denominado preconditionamiento, entre los que se encuentran: hipotermia, hipertermia, hipoxia, isquemia subletal y exposición a inhibidores metabólicos.

La hipoxia se puede usar para preconditionar cultivos neuronales *in vitro*, en una técnica llamada privación de oxígeno-glucosa (Jones & Bergeron, 2004). En general, el preconditionamiento activa una respuesta al estrés celular o una vía de señalización, lo que significa que teóricamente, este tratamiento puede ser más efectivo que los tratamientos exógenos tradicionales, pues genera un fenotipo neuroprotector endógeno (Tauskela, Aylsworth, Hewitt, Brunette, & Mealing, 2012).

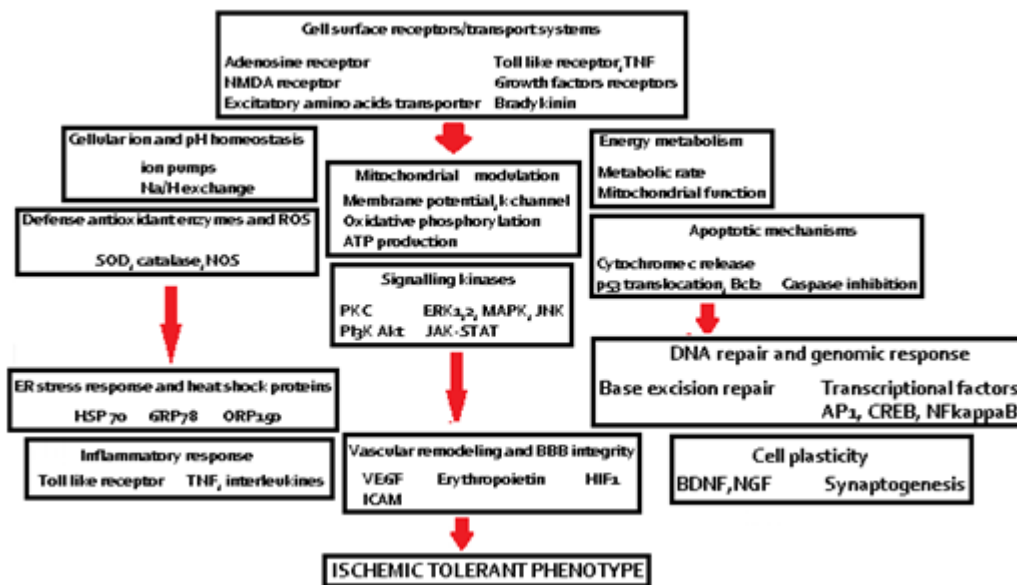


Figura 2. Tolerancia isquémica inducida por el preconditionamiento (Tauskela, Aylsworth, Hewitt, Brunette, & Mealing, 2012).

4.2.5 Preconditionamiento hipóxico como mecanismo protector

El preconditionamiento hipóxico consiste en exponer las células de un tejido, a cortos periodos de hipoxia, con el objetivo de generar una protección contra estímulos letales posteriores. Este tratamiento se ha estudiado en diferentes órganos, puede ocurrir tanto en el cerebro, como en otros tejidos. Cabe mencionar que el cerebro puede ser preconditionado para resistir a daños agudos, tales como la isquemia cerebral, isquemia/hipoxia neonatal, daño cerebral quirúrgico, trauma, y a agentes que son usados en modelos de enfermedades neurodegenerativas (Stetler, y otros, 2014).

La importancia del preconditionamiento hipóxico radica en la hipoxia, el fenómeno que ocasiona la disminución de la concentración de oxígeno en el tejido o en sus

alrededores, debido a que esta falta de oxígeno, disminuye el aporte de glucosa y otros nutrientes, lo cual puede generar muerte celular.

El preconditionamiento hipóxico ha despertado especial interés, ya que ha demostrado proteger al corazón y al cerebro contra la isquemia, al igual que proteger al cerebro contra varios tipos de daños, incluyendo: isquemia, convulsiones y edema. Finalmente, muchas de las moléculas implicadas en otros tipos de preconditionamiento también son inducidas por la hipoxia, lo que podría generar una protección cruzada (Sharp, y otros, 2004).

En cultivos celulares neuronales, el preconditionamiento hipóxico utilizando reducción del contenido de oxígeno o una combinación de privación de oxígeno y glucosa, ha demostrado proporcionar protección efectiva contra daño por estrés hipóxico. Algunos estudios han mostrado que el preconditionamiento puede rescatar a las neuronas del daño celular o apoptosis, estimulada por insultos severos (Wang, y otros, 2010).

No obstante, a pesar de toda la información que se ha obtenido sobre el efecto del preconditionamiento sobre la supervivencia celular, la ruta molecular por la cual este tratamiento tiene lugar, no se ha dilucidado aún. Sin embargo, existen algunas teorías que conectan el preconditionamiento con diversas vías de señalización y moléculas clave como MAPKs, PI3/Akt y el factor inducible por hipoxia 1 (HIF1), siendo el último el que presenta mayor interés, debido al importante papel que juega en la homeostasis del oxígeno (Giusti & Fiszer de Plazas, 2012).

Estudiar el preconditionamiento permite ampliar el conocimiento sobre las vías de protección endógena y así poder evaluar posibles dianas farmacológicas para contrarrestar los efectos de la isquemia cerebral.

4.2.6 Glicosilación tipo O-GlcNAc

La glicosilación es una de las modificaciones postraduccionales de las proteínas más comunes y complejas en eucariotas. La que más se presenta es la modificación de residuos de serina/treonina con monosacáridos de O-linked β -N-acetilglucosamina (O-GlcNAc), que se concentra principalmente en proteínas nucleares, citoplásmicas y de la matriz extracelular. Se cree que esta modificación regula la función de las proteínas de una manera análoga a la fosforilación y que está implicada en la regulación de la transcripción, el ciclo celular y la respuesta al estrés celular (Zachara, 2012).

Esta modificación es dinámica y responde a numerosas señales incluyendo hormonas, ionomicina, concentración extracelular de Glucosa, el ciclo celular y estrés celular. Ciertas proteínas reguladoras claves son modificadas por O-GlcNAc, y los cambios en su estado de modificación, están implicados en la

regulación del proteosoma, la vía de señalización de la insulina y MAP quinasa, el ciclo celular y la respuesta al estrés celular. Se ha observado que la depleción de la O-GlcNAc transferasa, la enzima que adiciona O-GlcNAc en los residuos de serina/treonina, es letal en mamíferos y plantas, lo cual resalta la importancia de O-GlcNAc en las funciones de regulación celular (Shafi, y otros, 2000). Adicionalmente, la pérdida de la regulación de O-GlcNAc puede estar relacionada con la etiología de la diabetes tipo II, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas (Zachara, 2009).

A nivel de miocardio, se han realizado estudios que muestran que los niveles de O-GlcNAc se incrementan cuando se somete previamente a un preconditionamiento, en este caso isquémico. Además, los niveles y la actividad de la enzima O-GlcNAc transferasa también aumentan, por lo que se podría pensar que estos dos mecanismos están estrechamente relacionados (Jensen, Johnsen, Kristiansen, Zachara, & Botker, 2013).

En cuanto al efecto de la O-GlcNAc en el cerebro, en un estudio realizado en un modelo de oclusión de la arteria cerebral media en rata, se observó que el tratamiento con glucosamina, al alimentar la vía de las hexosaminas por la que se produce el sustrato O-GlcNAc, reduce el tamaño del infarto. Recientemente, se han reportado efectos citoprotectores de este compuesto en el cerebro (Hwang, y otros, 2010). No obstante, no se tienen datos acerca del efecto que pueda tener el preconditionamiento hipóxico en el cerebro sobre los niveles de O-GlcNAc, y si realmente están relacionados, o son mecanismos diferentes de protección celular.

4.3 Objetivos

4.3.1 Objetivo general

Desarrollar un modelo *in vitro* de células neuronales para evaluar el efecto del preconditionamiento hipóxico como protección celular ante un evento hipóxico letal.

4.3.2 Objetivos específicos

1. Estandarizar la metodología de cultivo primario neuronal de rata en la Universidad Icesi.
2. Evaluar el efecto del preconditionamiento hipóxico sobre la supervivencia celular y los niveles de O-GlcNAcificación de proteínas en el cultivo neuronal.
3. Establecer si el preconditionamiento hipóxico es un mecanismo de protección neuronal *in vitro*

4.4 Metodología

Este proyecto de investigación se desarrolló en la Universidad Icesi, en los laboratorios de fisiología celular animal, biofarmacia y biocósmética, y en el cuarto de microscopio de fluorescencia. Adicionalmente, los animales de experimentación se cuidaron y manipularon en el bioterio. Esta metodología, que hace parte de la línea de investigación que se ha venido trabajando en el grupo *Natura*, tiene como objetivo desarrollar un modelo *in vitro* de células cerebrales para evaluar el efecto del acondicionamiento hipóxico como tratamiento de protección celular ante un evento hipóxico letal.

4.4.1 Equipos, materiales y reactivos

4.4.1.1 Cultivo celular:

Tabla 2. Listado de equipos, materiales y reactivos utilizados para el cultivo celular.

Equipos	Materiales de cirugía	Materiales de cultivo	Reactivos
Estereoscopio	Tijeras medianas	Ratas recién nacidas	HBSS (Lonza)
Hemocitómetro de Neubauer	Tijeras de microdissección	CO ₂	Tripsina/EDTA (Lonza)
Microscopio invertido	Pinzas curvas y rectas (tamaño mediano y pequeño)	Etanol al 70%	DNAsa I (Qiagen)
Micropipetas (20, 200 y 1000µl)	Pinzas de titanio Dumont nº 5	Recipiente hermético	MEM(Gibco)
Pipeta multicanal	Tijeras de microdissección de punta curva (nº 7)	Pipetas pasteur de plástico*	D-glucosa
Cabina de flujo laminar	Pinzas de agarre	Mechero	Suero fetal bovino (Caisson)
Incubadora	Cuchilla de bisturí nº15	Tubos cónicos de 15 y 50mL*	Penicilina/estreptomicina/anfotericina B (Lonza)
Pipeteador	Cajas de Petri*	Laminillas circulares de 12mm de diámetro cubiertas con poli-L-lisina*	Suero de caballo (Caisson)
		Placas de 96 pozos*	L-glutamina (Lonza)
		Puntas estériles (10, 20, 200 y 1000µl)*	Neurobasal (Gibco)
		Pipetas de 10mL*	B-27 (Gibco)
		Recipiente de descarte	Poli-L-lisina (Sigma)
			PBS 1X* (Caisson)
			Isoflurano USP (Baxter)

*Insumos estériles

4.4.1.2 Acondicionamiento hipóxico y estímulo hipóxico letal:

Tabla 3. Listado de equipos, materiales y reactivos utilizados para el acondicionamiento.

Equipos	Materiales de cultivo	Reactivos
Microscopio invertido	CO ₂	HBSS (Lonza)
Micropipetas (20, 200, 1000µl)	Etanol al 70%	D-glucosa
Pipeta multicanal	Recipiente hermético	Neurobasal (Gibco)
Cabina de flujo laminar	Tubos cónicos de 15 y 50mL*	L- glutamina (Lonza)
Incubadora	Laminillas circulares de 12 mm de diámetro cubiertas con poli-L-lisina*	Penicilina/estreptomicina/anfotericinaB (Lonza)
Microscopio de fluorescencia	Placas de 96 pozos	B-27 (Gibco)
		MTT (Invitrogen)
		DMSO (Merck)
		PBS* (Caisson)
		Anticuerpos primarios: Anti-NeuN rabbit

cubiertas con poli-L-lisina*	polyclonal y Anti-GFAP clone GA5 (Millipore) y RL2 mouse monoclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology)
Puntas estériles (10, 20, 200 y 1000 µl)*	Anticuerpos secundarios:Alexa fluor 488 goat anti-rabbit IgG y Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgG (Invitrogen)
Recipiente de descarte	P-formaldehído (AppliChem)
Cámaras anaerobias	

*Insumos estériles

4.4.2 Métodos

La siguiente metodología fue aprobada por el Comité Institucional de Ética para el Cuidado y Uso de Animales en Experimentación (CIECUAE) de la Universidad Icesi. Todos los animales fueron tratados de acuerdo a los lineamientos expuestos en la ley 84 de 1989 “Estatuto Nacional de Protección de los Animales” (Congreso de Colombia, 1989) y la Resolución N° 8430 de 1993 del Ministerio de Salud (Ministerio de Salud, 1993).

4.4.2.1 Cultivo celular

Esta metodología se empleó tanto para obtener neuronas como astrocitos, a partir de la corteza cerebral de ratas Wistar recién nacidas (P0-P1). A continuación se describen los pasos que se llevaron a cabo para estandarizar el cultivo celular, incluyendo las etapas de preparación de reactivos y mantenimiento del cultivo.

4.4.2.1.1 Antes del cultivo:

Preparación de medios de cultivo y soluciones

Tabla 4. Cantidades de los reactivos para preparar los medios de cultivo y las soluciones.

Solución de disección			
Nombre	Concentración 1	Concentración 2	Volumen
Hanks BBS	-	1 X	50 mL
Solución enzimática			
Nombre	Concentración 1	Concentración 2	Volumen
Hanks BBS	-	1 X	9 mL
Tripsina/EDTA	1X	1X	1 mL
DNAsa I	0,1mg/mL		10µL
Medio de cultivo de neuronas			
Nombre	Concentración 1	Concentración 2	Volumen
MEM (Earle's+L-Glu)	-	1X	48,5mL
D-Glucosa	50%	0,5%	500 µL
Suero fetal bovino	100%	10%	5mL
Pen/Strep/Amph B	100X	1X	500µL

Medio de cultivo para astrocitos			
Nombre	Concentración 1	Concentración 2	Volumen
MEM (Earle's+ L-Glu)	-	1X	48,5mL
D-Glucosa	50%	0,5%	500 µL
Suero de caballo	100%	10%	5mL
Pen/Strep/Amph B	100X	1X	500 µL
Medio Neurobasal			
Nombre	Concentración 1	Concentración 2	Volumen
Neurobasal	-	1X	48,25mL
L-Glutamina	200mM	1mM	250 µL
Pen/Strep/Amph B	100X	1X	500 µL
B-27	50X	1X	1mL

Con las cantidades anteriores se prepararon, bajo cabina de flujo laminar, los medios de cultivo y las soluciones de disección en tubos falcon estériles de 50mL, y las soluciones enzimáticas en tubos falcon estériles de 15mL.

Cubrimiento de las placas de 96 pozos y cubreobjetos con poli-L-lisina

Debido a que el cultivo neuronal se realizó en placas de 96 pozos, estas se cubrieron con poli-L-lisina, 24 horas antes de emplearlas. Además, para visualizar las neuronas en el cultivo primario por inmunofluorescencia, se recubrieron inicialmente 6 cubreobjetos, pero posteriormente, se disminuyó a 4 cubreobjetos.

Bajo cabina de flujo laminar, se le adicionaron a 6 placas de cultivo de 96 pozos y 6 cubreobjetos, 25µl y 500µL de poli-L-lisina, respectivamente. Sin embargo, se observó que 25µl no era suficientes para cubrir el fondo del pozo y se aumentó a 50µl para las placas de 96 pozos. A continuación, estos materiales se dejaron incubando por 24 horas y al cabo de este tiempo, se realizaron 3 lavados con PBS 1X. Finalmente, se dejaron secando en la cabina de flujo laminar y se irradiaron con luz UV por 1 hora.

Preparación de las pipetas Pasteur y puntas de pipeta de 1mL

Antes de iniciar el cultivo se acondicionaron las pipetas Pasteur y las puntas de la pipeta de 1mL para la homogenización, por lo que se cortaron las puntas a 3 de estas, a 3 diámetros de punta distintos, y luego se pasaron por la llama de un mechero para evitar suavizar la superficie y evitar regiones con filo que causaran daño a las células.

Obtención de las ratas recién nacidas

Las ratas Wistar recién nacidas se trasladaron desde el bioterio de la Universidad Icesi hasta el cuarto de cultivo del laboratorio 506L.

4.4.2.1.2 Disección del cerebro y aislamiento de la corteza

Se tomaron alrededor de 4 ratas recién nacidas y se les administró isoflurano para anestesiarlas, luego se decapitaron y las cabezas se colocaron en una caja de Petri con la solución de disección.

Posteriormente, bajo un estereoscopio, se extrajo el cerebro retirando la piel desde la parte posterior. Para esto se apoyó con la pinza nº 5 en la parte nasal, para realizar una incisión en medio de los dos hemisferios y retirar el cráneo. Luego se introdujo la pinza curva nº 7 en la región del basal del cerebro, se levantó de la base y se puso en una caja de Petri con solución de lavado HBSS.

A continuación, se retiró el tallo y se separaron los dos hemisferios. Paso seguido, se separó el bulbo olfatorio y con éste se retiraron las meninges. También, se quitaron los ganglios basales con la pinza nº 7 (se observa una concavidad).

A partir de la parte posterior, se retiró el hipocampo con la pinza nº 7. Y usando esta misma pinza, se trasladó la corteza a una caja de Petri que contenía solución de disección fresca.

Finalmente, se puso en hielo la corteza que se iba extrayendo de cada hemisferio. Se repitieron los pasos del 4 al 8 en el otro hemisferio y luego del 2 al 8 en las cabezas restantes.

En este punto se colocaron las soluciones enzimáticas y los medios de cultivo de neuronas y astrocitos en la incubadora a 37°C y 5%CO₂, para tenerlos listos en el momento de iniciar la disgregación del tejido.

4.4.2.1.3 Disgregación del tejido de la corteza y digestión enzimática

El siguiente paso del cultivo es la obtención de las células cerebrales, para lo cual con una cuchilla se seccionó la corteza en partes más pequeñas, para facilitar la disgregación del tejido. Luego, se llevaron los cortes bajo cabina de flujo laminar y se pusieron en un tubo cónico de 15mL con la solución enzimática (tabla 4). Esta solución se incubó inicialmente durante 20 minutos, pero se observó una alta mortalidad de las células, seguido a esto se probó con 5 minutos, los cuales no fueron suficientes para la disgregación del tejido; por lo tanto, se estableció un tiempo de 10 minutos a 37°C, y se agitó cada 2 min.

A partir de este paso, se hizo una distinción entre el tipo de células que se querían obtener, ya que existen diferencias en el cultivo de neuronas y astrocitos.

Cultivo de neuronas:

Al cabo de este tiempo, se retiró completamente la solución enzimática con pipeta Pasteur plástica, y se agregaron 5mL de medio de cultivo para neuronas, que permite inhibir las enzimas de digestión. Este paso se repitió 2 veces.

Posteriormente, se retiró una parte del medio de cultivo hasta tener 2 a 3mL y se disgregaron las secciones de corteza con las puntas de 1mL, pasando los trozos un mínimo de 20 veces por una pipeta de diámetro mayor y se repitió el procedimiento con las pipetas de apertura menor. Se resuspendió lentamente para evitar la formación de burbujas.

Luego, se pasó 1mL de la suspensión celular (sobrenadante) a un tubo cónico estéril de 15mL y se le adicionó 1mL de medio de neuronas a la suspensión celular madre, la cual se disgregó lentamente con las puntas de la pipeta de 1mL de diferentes diámetros, se tomó nuevamente 1mL de esta (sobrenadante) y se pasó al tubo de 15mL con la suspensión celular (repetir una vez más). Al finalizar este paso se contaba con 3mL de la suspensión celular nueva mejor disgregada.

Para determinar la cantidad de neuronas a sembrar se hizo una dilución 1:10 en azul de tripano para contar las células recuperadas. Se tomaron 90µL del colorante y 10µL de la suspensión celular nueva, se adicionaron a un tubo cónico de 1mL y se sirvieron en el Hemocitómetro de Neubauer.

Finalmente, se realizó el conteo de las células vivas (no coloreadas) y se efectuó el siguiente cálculo para determinar la cantidad de células a sembrar en las 6 placas de 96 pozos

$$\frac{N^{\circ} \text{ células}}{N^{\circ} \text{ de cuadrantes}} \times \text{factor de dilución (10)} \times 10000 = N^{\circ} \frac{\text{células}}{\text{mL}} \quad (1)$$

$$\frac{N^{\circ} \text{ células}}{\text{mL}} \times 3\text{mL} = N^{\circ} \text{ células en } 3\text{mL} \quad (2)$$

Como se sembraron 20.000 células por pozo (este valor se estableció por medio de una curva de calibración con astrocitos).

$$\frac{20.000 \text{ células}}{\text{pozo}} \times \frac{3000 \mu\text{L}}{N^{\circ} \text{ células en } 3\text{mL}} = \mu\text{l de suspensión celular/pozo} \quad (3)$$

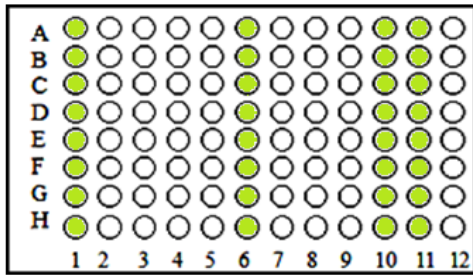


Figura 3. Esquema de la placa de 96 pozos para establecer el número de pozos a usar en el cultivo neuronal.

Según la figura 3, los pozos donde se sembraron las células son los marcados con color verde. Teniendo en cuenta que son 6 placas (0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos de hipoxia), la cantidad de μL que se tomó de la suspensión celular es:

$$\frac{\mu\text{L suspensión celular}}{\text{pozo}} \times 192 \text{ pozos} = \mu\text{L suspensión celular para 192 pozos} \quad (4)$$

En último lugar, se preparó la suspensión celular en la densidad deseada de células viables diluyendo la suspensión en el medio de cultivo para neuronas. Se sembraron $100\mu\text{L}$ de la suspensión celular para las placas de 96 pozos en cada pozo establecido, se marcaron las placas e incubaron a 37°C y $5\% \text{CO}_2$.

A las 4 horas de haber realizado el cultivo se cambió el medio de cultivo neuronal por Neurobasal-B27 y se llevó a la incubadora a 37°C y $5\% \text{CO}_2$. Cada día de por medio después del cultivo, se cambió $1/3$ de medio de cultivo hasta el día *in vitro* 7, en donde se realizó el ensayo de tiempos de hipoxia. Es importante tener en cuenta que el medio fresco siempre fue Neurobasal-B27 y el cambio del medio de cultivo fue con cuidado, para no dañar las células o desprenderlas.

Cultivo de astrocitos

Las cortezas destinadas para sembrar astrocitos se obtuvieron de la misma manera que las neuronas y se adicionaron a la solución enzimática, luego se retiró completamente la solución de tripsina con pipeta Pasteur plástica, y se agregaron 5mL de solución de medio de cultivo para astrocitos, que permite inhibir las enzimas de digestión. Este paso se repitió 2 veces.

A continuación, se retiró una parte del medio de cultivo hasta tener 2 a 3mL y se disgregaron las secciones de corteza con las puntas de 1mL , pasando los trozos un mínimo de 20 veces por una pipeta de diámetro mayor y se repitió el procedimiento con una pipeta de apertura menor. Se resuspendió lentamente para evitar la formación de burbujas.

Posteriormente, se adicionó medio para astrocitos hasta completar 15mL y se homogenizó muy bien para garantizar que las células se distribuyeran por igual en

el medio de cultivo. La cantidad anterior se dividió en tres partes, las cuales fueron sembradas en 3 frascos de cultivo de 25cm². Estos cultivos se dejaron incubando por una semana, en donde se les cambió totalmente el medio, día de por medio.

El medio de cultivo fue siempre medio para astrocitos. Estas células se pasaron a las placas de 96 pozos en el día *in vitro* 6, en donde se realizó el conteo celular de manera similar a las neuronas, teniendo en cuenta que el número de pozos a sembrar es diferente.

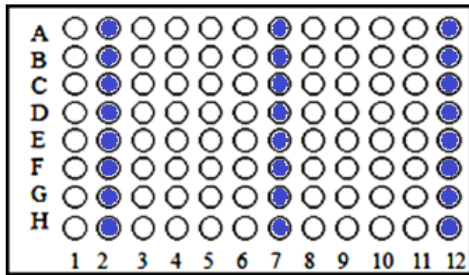


Figura 4. Esquema de la placa de 96 pozos para establecer el número de pozos a usar en el cultivo de astrocitos.

4.4.2.2 Ensayo de viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia

Con los cultivos neuronales en el día *in vitro* 7, se realizó un ensayo de supervivencia celular bajo diferentes tiempos de hipoxia para establecer cuál es el estímulo no letal y cuál el estímulo letal, para lo cual se probaron 5 tiempos (15, 30, 60, 90 y 120 minutos) y un control (0 minutos), cada uno correspondiente a una placa de cultivo de 96 pozos. Los tratamientos que se llevaron a cabo se muestran en la figura 5:

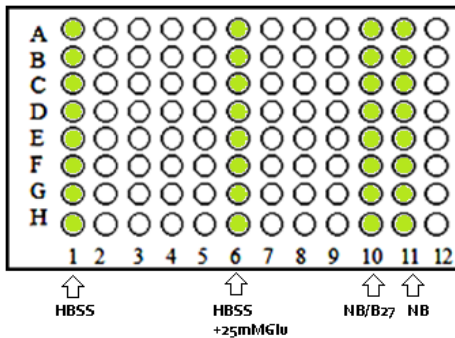


Figura 5. División de la placa de 96 pozos de acuerdo a los tratamientos evaluados para las neuronas.

Adicionalmente, este ensayo se efectuó en cultivo de astrocitos para establecer posibles diferencias o similitudes entre los dos tipos de cultivo (neuronas vs astrocitos).

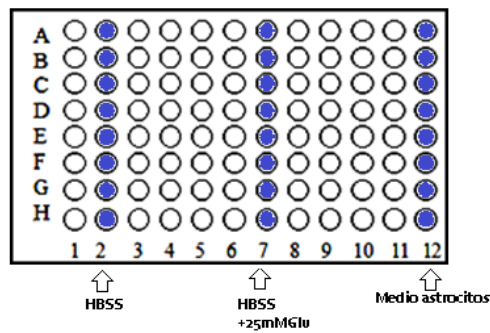


Figura 6. División de la placa de 96 pozos de acuerdo a los tratamientos evaluados para los astrocitos.

El procedimiento inició con el burbujeo de los medios de cultivo (HBSS, HBSS con glucosa, Neurobasal/B27 y Neurobasal sin B-27) con nitrógeno durante 10 minutos. Paso seguido, se retiraron dos placas de cultivo de la incubadora y se llevaron a la cabina de flujo laminar para retirarles el medio de cultivo (Neurobasal/B27) con el que fueron sembradas. Lo anterior, con el fin de iniciar con el tiempo de hipoxia de 120 minutos y el control. Posteriormente, cada placa se dividió como se muestra en la figura 5 para neuronas y la figura 6 para astrocitos, y a cada columna se le adicionó el medio correspondiente, previamente burbujeado con nitrógeno. Al finalizar este paso, la placa de 120 minutos se rotuló y se procedió a realizar la hipoxia.

La hipoxia se efectuó en cámaras anaeróbicas elaboradas por el ingeniero y estudiante de doctorado en Ciencias Biomédicas (Universidad del Valle) Carlos Fernando Cardozo, basado en el diseño mostrado por Wang, Jin & Zhong (2014).



Imagen 1. Cámara anaeróbica

Primero, se retiró el aire de la bolsa y luego se le inyectó nitrógeno. Mientras la cámara se llenaba con el gas, la placa se abría y se cerraba, con el objetivo de que el gas penetrara en los cultivos (este paso se repitió una vez más). Segundo, la bolsa sellada se separó del montaje y se puso en la incubadora a 37°C. Al mismo tiempo, la placa control se puso a incubar a 37°C sin exponerla a la hipoxia.

A continuación, se repitió el mismo procedimiento con la placa siguiente (90 minutos) transcurridos 30 minutos de incubación de la placa de 120 minutos.

Luego, a la siguiente media hora se le realizó la hipoxia a la placa de 60 minutos, y así sucesivamente, hasta completar todos los tiempos. De esta manera, cuando la placa de 120 minutos completó el tiempo de hipoxia, las otras placas también cumplieron su tiempo.

Finalmente, todas las placas se retiraron de la incubadora y se abrieron las bolsas al mismo tiempo, con el objetivo de que volvieran a su ambiente normal. Se llevaron a la cabina de flujo laminar y se procedió a cambiar el medio de todos los pozos por neurobasal sin B-27, excepto para la columna 10, la cual tenía neurobasal con B-27. Esta distinción se hizo para probar la hipótesis de que el suplemento B-27 podría afectar en los resultados.

Los platos de cultivo se dejaron en la incubadora a 37°C y 5%CO₂ durante 24 horas. Al transcurrir este tiempo, se llevó a cabo el ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) (este protocolo se describe en el anexo 2) para determinar la viabilidad celular.

4.4.2.3 Precondicionamiento hipóxico

Al finalizar los ensayos de tiempos de hipoxia y definir cuáles son los tiempos para el estímulo no letal y letal, se efectuó el procedimiento para evaluar si el precondicionamiento hipóxico funciona como mecanismo citoprotector y si está relacionado con los niveles de O-GlcNAcilación.

En este caso se usaron los siguientes esquemas:

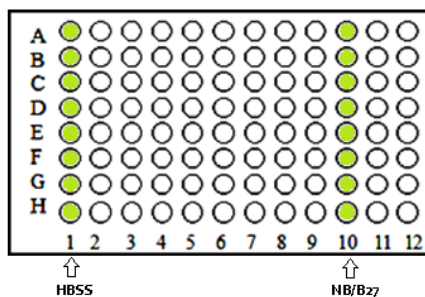


Figura 7. División de la placa de 96 pozos de acuerdo a los tratamientos evaluados para el ensayo de supervivencia celular bajo el tratamiento de precondicionamiento.

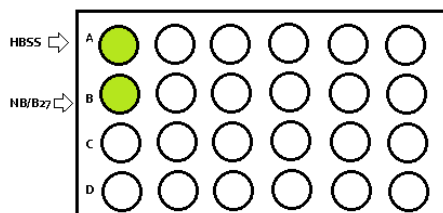


Figura 8. División de la placa de 24 pozos de acuerdo a los tratamientos evaluados para el precondicionamiento (inmunocitoquímica).

Se usaron tres placas de cultivo de 96 pozos y tres de 24 pozos (con un portaobjetos en dos de los pozos), correspondientes a dos controles y el acondicionamiento, con el objetivo de evaluar la viabilidad celular (placas de 96 pozos) y los niveles de O- GlcNAcilación (placas de 24 pozos). Una de las placas control se sometió a 120 minutos de hipoxia únicamente, la otra no se sometió a hipoxia y la placa de acondicionamiento, se sometió a 30 minutos de hipoxia, seguido de 1 hora de normoxia y finalmente, 120 minutos de hipoxia. Lo anterior, se hizo tanto para la placa control de 96 pozos como para la de 24 pozos.

El procedimiento consistió en retirar las placas de cultivo de acondicionamiento de la incubadora en el día *in vitro* 6 y llevarlas a la cabina de flujo laminar. Luego, se les retiró el medio que tenían (Neurobasal/B27) y se les adicionó el respectivo medio de cultivo, según la figura 7. Una cantidad aproximada de 5mL de los medios de cultivo se burbujeó previamente con nitrógeno durante 10 minutos.

Después, únicamente las placas de acondicionamiento, se sometieron a hipoxia por 30 minutos, mientras que las otras placas permanecieron en la incubadora a 37°C. Al transcurrir este tiempo. Las placas de acondicionamiento se retiraron de la incubadora y se expusieron a condiciones normales, incluyendo el cambio del medio de cultivo por neurobasal/B27. Estas placas de cultivo se dejaron por 1 hora en la incubadora a 37°C y 5%CO₂.

Posteriormente, al cabo de una hora, se sacaron las placas de la incubadora y se les cambió nuevamente el medio de cultivo por HBSS y Neurobasal/B27, según las figuras 7 y 8. Lo anterior con el fin de someter a estas placas a 120 minutos de hipoxia. Este paso también se le realizó a las placas control de 120 minutos de hipoxia. Para las placas control sin hipoxia, solamente se les cambió el medio según la figura 7 y se pusieron en la incubadora.

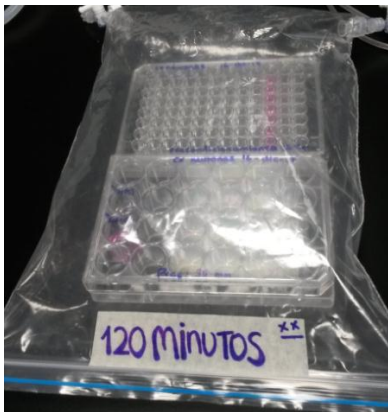


Imagen 2. Montaje experimental para 120 minutos de hipoxia en la etapa de acondicionamiento.

Al finalizar los 120 minutos, todas las placas se retiraron de la incubadora, se les cambió el medio de cultivo por neurobasal/B27 y se dejaron 24 horas incubando a 37°C y 5%CO₂.

Finalmente, se realizó el ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) (placas de 96 pozos) e inmunocitoquímica para medir los niveles de O- GlcNAcilación (placas de 24 pozos).

4.4.2.4 Ensayo Inmunocitoquímica

Para la inmunocitoquímica se tomaron las placas de 24 pozos y se les adicionó 500µL de *para*-formaldehído en los pozos que tenían los cubreobjetos, con el fin de pre-fijar las células durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se retiró el medio con la solución de *p*-formaldehído, se les agregó nuevamente 500µL de este reactivo y se dejó por 20 minutos a temperatura ambiente. Al terminar, se efectuaron dos lavados con PBS 1X y los cultivos se cubrieron con 400µL del buffer de lavado. Estos cubreobjetos pueden ser almacenados a 2-8 °C hasta por 3 meses o ser teñidos inmediatamente.

Posteriormente, a los cubreobjetos se les agregó 400µL de BSA 1% en PBST (Buffer fosfato con tensoactivo Tween 20) como solución de bloqueo y permeabilización, se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se retiró la solución de bloqueo y los cubreobjetos se dejaron incubando durante la noche entre 2-8°C con 400µL de la mezcla de anticuerpos primarios: Anti-NeuN (conejo; dilución 1:1000; Clon A60; Millipore MAB377) y anti-RL2 (ratón dilución 1:400; SantaCruz Biotechnology). Al día siguiente, esta mezcla se recuperó y se realizaron tres lavados con 500µL de PBS 1X durante 5 minutos. Después, se le adicionaron 400µL de la mezcla de anticuerpos secundarios (Alexa Fluor® 488 y Alexa Fluor® 555) y se dejaron incubando por 1 hora a temperatura ambiente, en la oscuridad. Luego, se realizaron dos lavados con 500µL de PBS. Al finalizar, se les agregaron 400µL de DAPI, se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente y se le realizaron dos lavados con PBS

En último lugar, cada cubreobjetos se trasladó cuidadosamente a un portaobjetos marcado con el respectivo tratamiento y los anticuerpos usados, al cual se le había adicionado 10µL de PBS/Glicerol para montar el cubreobjetos en el portaobjetos. A estos se les selló con esmalte transparente, se dejaron secar y se llevaron al cuarto de microscopía, donde se encuentra el microscopio de epifluorescencia para visualizar las placas con los filtros apropiados.

Análisis estadístico

La lectura de las placas de 96 pozos, después de los ensayos de supervivencia celular de MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), para evaluar la viabilidad celular se realizó de forma cuantitativa en el equipo lector de platos, el cual arrojó los datos de absorbancia a 540nm, los cuales se analizaron utilizando ANOVA de una vía y para poblaciones de datos con un comportamiento paramétrico, y el test de Kruskal-Wallis para comportamiento no paramétrico.

Además, se realizó un post test de comparación de Tukey o Dunnett, dependiendo del comportamiento paramétrico o no, con un Alpha de 0,05. Todos estos análisis se efectuaron en el programa *GraphPad Prism 5*.

Los niveles de O-GlcNAcilación se obtuvieron por inmunocitoquímica con anticuerpos anti-O-GlcNAc, por medio del microscopio de fluorescencia. Las imágenes obtenidas en el programa *NIS-Elements F 3.2*, se analizaron con el programa *ImageJ*, en donde se midió la intensidad de fluorescencia; y se compararon por medio de un ANOVA de una vía (la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis) y el test de comparación de Dunn, mediante el software *Graph Pad Prism 5*.

Matriz de marco lógico

Objetivo General: Desarrollar un modelo <i>in vitro</i> de células neuronales para evaluar el efecto del preconditionamiento hipóxico como protección celular ante un evento hipóxico letal			
Objetivos específicos	Actividades	Supuestos	Indicadores
Estandarizar la metodología de cultivo primario neuronal de rata en la Universidad Icesi.	-Obtención de la muestra de tejido y extracción de las células neuronales.	-Disponibilidad de reactivos y medios de cultivo.	Protocolo para realizar el cultivo neuronal.
	-Cultivo inicial de las neuronas para evaluar crecimiento <i>in vitro</i> .	-Crecimiento de las neuronas de embriones de rata en el cultivo.	
	-Establecer las condiciones óptimas de cultivo para obtener un cultivo estandarizado.	-Contar con las condiciones necesarias para el crecimiento neuronal.	
Evaluar el efecto del preconditionamiento hipóxico sobre la supervivencia celular y los niveles de O-GlcNAcilación en el cultivo neuronal.	-Establecer condiciones óptimas para el preconditionamiento hipóxico y el estímulo hipóxico letal.	-Contar con las condiciones necesarias para el preconditionamiento.	-Efecto medido del preconditionamiento hipóxico sobre la supervivencia celular.
	-Evaluar la supervivencia celular después del preconditionamiento hipóxico.	-Disponibilidad de la cámara anaerobia y los reactivos.	-Efecto medido del preconditionamiento hipóxico sobre los niveles de O-GlcNAcilación de proteínas en las células neuronales.
	-Evaluar los niveles de O-GlcNAcilación de proteínas por medio de inmunocitoquímica de fluorescencia.	-Disponibilidad del equipo de fluorescencia y los anticuerpos contra O-GlcNAcilación.	
Establecer si el preconditionamiento hipóxico es un mecanismo de protección neuronal <i>in vitro</i> .	-Analizar los datos del preconditionamiento hipóxico.	-Datos obtenidos del preconditionamiento hipóxico.	-Análisis obtenido del preconditionamiento hipóxico como mecanismo protector.

4.5 Resultados

4.5.1 Estandarización del cultivo neuronal

Inicialmente se realizó el cultivo neuronal con la ayuda del protocolo aportado por el Dr. Álvaro Andrés Barrera, el cual se enfocaba en neuronas hipocampales y los biomodelos eran embriones de rata. Por lo tanto, este protocolo se adecuó para ser usado en la Universidad Icesi con ratas recién nacidas y neuronas corticales.

En el primer cultivo neuronal que se llevó a cabo se observó que la etapa de digestión enzimática no estaba ajustada, es decir que el tiempo de 20 minutos que reportaba el protocolo guía, era demasiado agresivo para las células y estas morían. Entonces, en ese mismo ensayo, se probó con un tiempo de 5 minutos, pero en este caso, fue insuficiente para lograr la disgregación celular. Finalmente, en el segundo ensayo que se hizo se probó con 10 minutos y se escogió este tiempo como el adecuado.

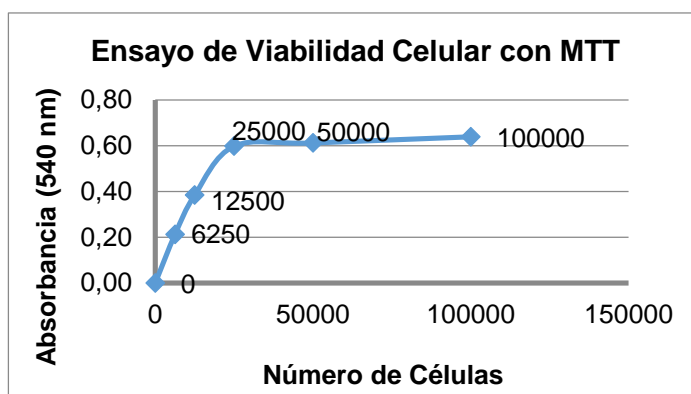
El primer cultivo neuronal que se obtuvo no fue viable porque las células no quedaron bien disgregadas y su conservación fue difícil, por lo que se desecharon. Sin embargo, a partir de las cortezas que se extrajeron ese mismo día, se realizó un cultivo de astrocitos, el cual se usó para establecer cuál era la cantidad de células que se debían sembrar en cada pozo de la placa de 96 pozos.

En la tabla 5 se muestra el orden que se tuvo en la placa y la cantidad de células sembradas para realizar una curva de calibración, por medio del ensayo con MTT, en el cual se mide la absorbancia del compuesto formazán a 540nm en un equipo lector de platos. La absorbancia es directamente proporcional con la viabilidad celular, ya que únicamente las células viables son capaces de transformar metabólicamente el MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), por medio de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, en un compuesto coloreado de color azul (formazan) (Meerlo, Kaspers, & Cloos, 2011).

Tabla 5. Orden de las muestras y número de astrocitos a sembrar en cada pozo de una placa de 96 pozos para el ensayo de viabilidad celular con MTT a los 8 días de cultivo. Los datos se muestran con el blanco restado.

Número de células	Código	Absorbancia (540nm)	Muestras														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
0	B	-0,018	A	B	2	4											
0	B	-0,015	B	B	2	4											
0	B	0,046	C	B	2	4											
0	B	-0,013	D	B	2	4											
6250	1	0,123	E	1	3	5											
6250	1	0,228	F	1	3	5											
6250	1	0,248	G	1	3	5											
6250	1	0,250	H	1	3	5											
12500	2	0,352															
12500	2	0,327															
12500	2	0,423															
12500	2	0,435															

25000	3	0,568
25000	3	0,599
25000	3	0,527
25000	3	0,697
50000	4	0,623
50000	4	0,578
50000	4	0,557
50000	4	0,691
100000	5	0,711
100000	5	0,608
100000	5	0,630
100000	5	0,606



Gráfica 1. Ensayo de viabilidad celular con MTT para obtener el número adecuado de células a sembrar.

Posteriormente, se realizó un segundo cultivo que sirvió para hacer pruebas posteriores de viabilidad mediante el ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol). En el día *in vitro* 7 se tomaron unas imágenes con el microscopio de fluorescencia para observar el crecimiento neuronal.

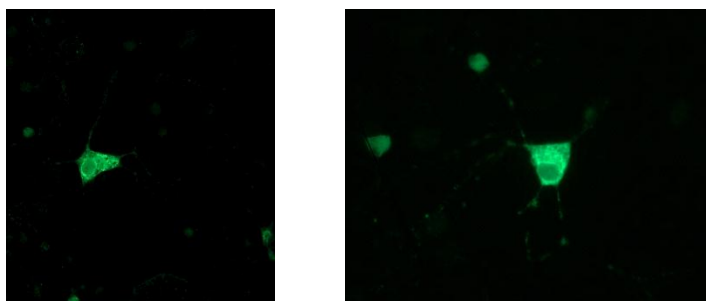


Imagen 3. Imagen de las neuronas del segundo cultivo bajo microscopio de fluorescencia con el anticuerpo NeuN para neuronas a 40X.

Inicialmente, en el protocolo de cultivo se tenía pensado adicionar al medio, el reactivo arabinósido de citosina, con el fin de obtener cultivos neuronales puros, ya que este reactivo afecta principalmente a las células en constante división, como son las células gliales, que pueden crecer en el cultivo y que no son

deseadas. Sin embargo, en la cantidad de 5 μ L que fue agregada a cada pozo del plato de cultivo, se observó que las neuronas morían casi en su totalidad, por lo que se decidió no usar este reactivo en los siguientes cultivos, con lo cual se obtuvo siempre cultivos mixtos, donde la mayoría de las células presentes son neuronas y astrocitos. La diferencia entre ambos cultivos (con AraC y sin AraC) se muestra en las imágenes 4 y 5.

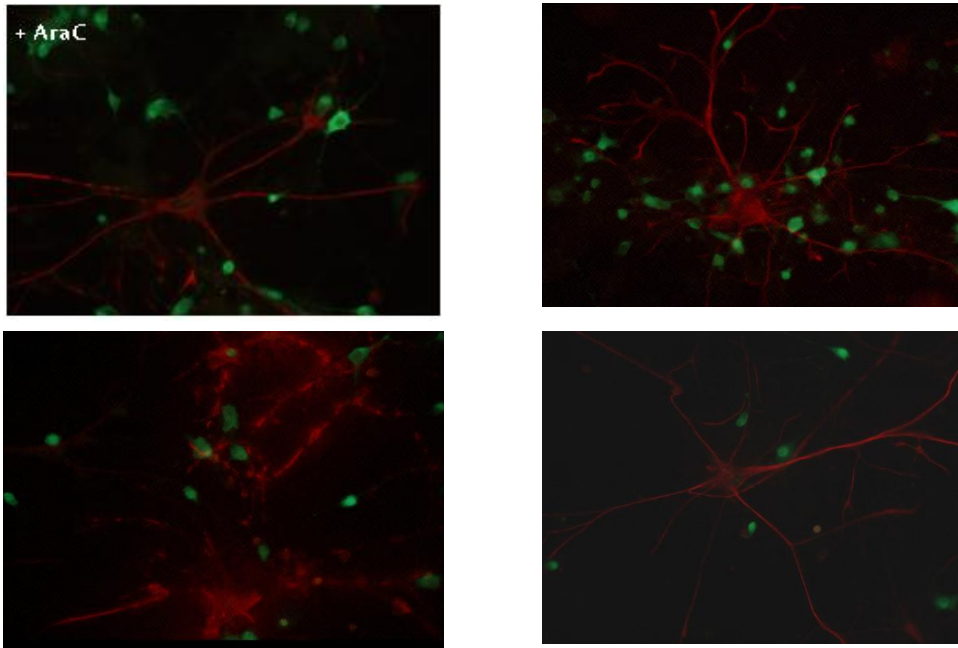


Imagen 4. Imágenes del cultivo neuronal mixto en el día *in vitro* 7 con adición de arabinósido de citosina bajo microscopio de fluorescencia con anticuerpo NeuN para neuronas (verde) y GFAP para astrocitos (rojo), tomadas a 40X.

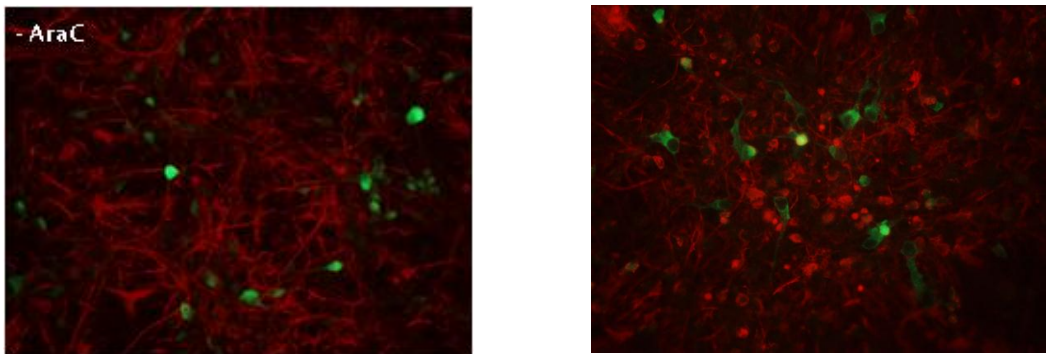
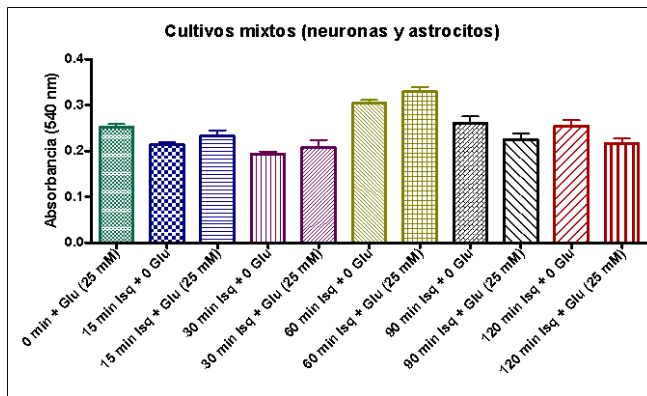


Imagen 5. Imágenes del cultivo neuronal mixto en el día *in vitro* 7, sin adición de arabinósido de citosina, bajo microscopio de fluorescencia con anticuerpos NeuN para neuronas (verde) y GFAP para astrocitos (rojo), tomadas a 40X.

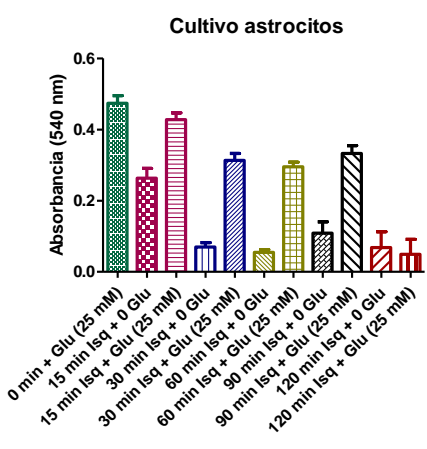
4.5.2 Ensayos de viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia

Después de obtener cultivos neuronales se realizaron diversos ensayos de viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia, donde se expusieron los cultivos neuronales mixtos a 15, 30, 60, 90 y 120 minutos de hipoxia, con el objetivo de seleccionar un tiempo de hipoxia no letal y uno letal, para luego ser usados en el protocolo de preconditionamiento isquémico. El diseño experimental se hizo teniendo en cuenta la figura 5, en el cual para cada periodo de tiempo en hipoxia, se contaba con una placa de cultivo de 96 pozos y la placa control (0 minutos).

Primero, se efectuaron dos ensayos, uno con cultivo neuronal mixto y otro con astrocitos. Sin embargo, estos datos no fueron tenidos en cuenta para el análisis estadístico, debido a que sirvieron para poner a prueba el protocolo de hipoxia y ajustar detalles experimentales. Los resultados obtenidos en estos primeros ensayos se muestran en las tablas 13 y 14 (ver anexos), gráficas 2 y 3. **Error! No encuentra el origen de la referencia.:**



Gráfica 2. Promedio de absorbancias a 540nm para el cultivo mixto (neuronas/astrocitos) de 7 días *in vitro* ± EEM, bajo diferentes tiempos de hipoxia de la imagen 9.

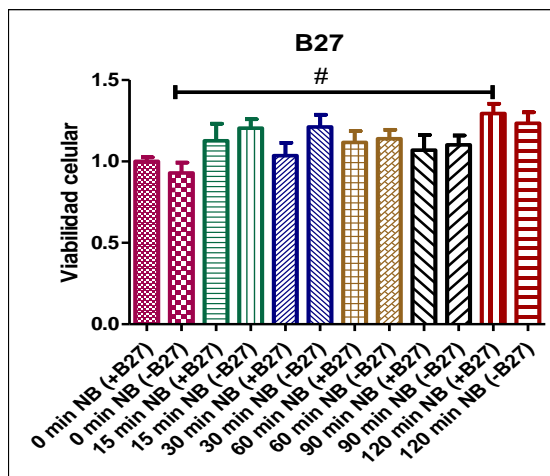


Gráfica 3. Promedio de absorbancia a 540nm para el cultivo de astrocitos de 7 días *in vitro* ± EEM, bajo diferentes tiempos de hipoxia.

Efecto del suplemento B27 en la viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia

Después de realizar los ensayos anteriores, se efectuaron tres experimentos independientes de viabilidad celular, para los tiempos de hipoxia (0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos), con cerebros de ratas Wistar recién nacidas de diferentes camadas y en días diferentes.

La primera evaluación fue la de efecto del suplemento B27 en la viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente en el programa Graph Pad Prism 5, por medio de un ANOVA de una vía y un post test de comparación múltiple de Tukey. Los datos se muestran en la tabla 15 (ver anexos), en la tabla 6 y en la gráfica 4.



Gráfica 4. Promedio de viabilidad celular normalizado contra el tratamiento control (0 min de hipoxia) \pm EEM, con un $n=22$ para evaluar el efecto del suplemento B-27 en esta variable, bajo diferentes tiempos de hipoxia (# = existe diferencia significativa entre esos tratamientos).

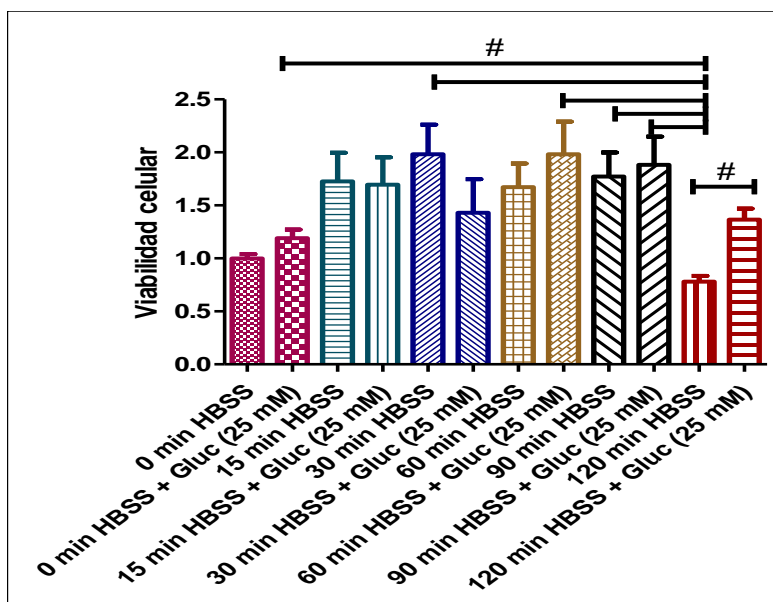
Tabla 6. Resultados del análisis estadístico para evaluar el efecto del suplemento B27 en la viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia (ANOVA Valor $P=0,0138$; $\alpha=0,05$).

Test de comparación múltiple de Tukey	P<0,05	Test de comparación múltiple de Tukey	P<0,05
0 min NB (+B27) vs 0 min NB (-B27)	No	15 min NB (-B27) vs 60 min NB (-B27)	No
0 min NB (+B27) vs 15 min NB (+B27)	No	15 min NB (-B27) vs 90 min NB (+B27)	No
0 min NB (+B27) vs 15 min NB (-B27)	No	15 min NB (-B27) vs 90 min NB (-B27)	No
0 min NB (+B27) vs 30 min NB (+B27)	No	15 min NB (-B27) vs 120 min NB (+B27)	No
0 min NB (+B27) vs 30 min NB (-B27)	No	15 min NB (-B27) vs 120 min NB (-B27)	No
0 min NB (+B27) vs 60 min NB (+B27)	No	30 min NB (+B27) vs 30 min NB (-B27)	No
0 min NB (+B27) vs 60 min NB (-B27)	No	30 min NB (+B27) vs 60 min NB (+B27)	No
0 min NB (+B27) vs 90 min NB (+B27)	No	30 min NB (+B27) vs 60 min NB (-B27)	No
0 min NB (+B27) vs 90 min NB (-B27)	No	30 min NB (+B27) vs 90 min NB (+B27)	No
0 min NB (+B27) vs 120 min NB (+B27)	No	30 min NB (+B27) vs 90 min NB (-B27)	No
0 min NB (+B27) vs 120 min NB (-B27)	No	30 min NB (+B27) vs 120 min NB (+B27)	No
0 min NB (-B27) vs 15 min NB (+B27)	No	30 min NB (+B27) vs 120 min NB (-B27)	No
0 min NB (-B27) vs 15 min NB (-B27)	No	30 min NB (-B27) vs 60 min NB (+B27)	No
0 min NB (-B27) vs 30 min NB (+B27)	No	30 min NB (-B27) vs 60 min NB (-B27)	No
0 min NB (-B27) vs 30 min NB (-B27)	No	30 min NB (-B27) vs 90 min NB (+B27)	No
0 min NB (-B27) vs 60 min NB (+B27)	No	30 min NB (-B27) vs 90 min NB (-B27)	No
0 min NB (-B27) vs 60 min NB (-B27)	No	30 min NB (-B27) vs 120 min NB (+B27)	No

0 min NB (-B27) vs 90 min NB (+B27)	No	30 min NB (-B27) vs 120 min NB (-B27)	No
0 min NB (-B27) vs 90 min NB (-B27)	No	60 min NB (+B27) vs 60 min NB (-B27)	No
0 min NB (-B27) vs 120 min NB (+B27)	Si	60 min NB (+B27) vs 90 min NB (+B27)	No
0 min NB (-B27) vs 120 min NB (-B27)	No	60 min NB (+B27) vs 90 min NB (-B27)	No
15 min NB (+B27) vs 15 min NB (-B27)	No	60 min NB (+B27) vs 120 min NB (+B27)	No
15 min NB (+B27) vs 30 min NB (+B27)	No	60 min NB (+B27) vs 120 min NB (-B27)	No
15 min NB (+B27) vs 30 min NB (-B27)	No	60 min NB (-B27) vs 90 min NB (+B27)	No
15 min NB (+B27) vs 60 min NB (+B27)	No	60 min NB (-B27) vs 90 min NB (-B27)	No
15 min NB (+B27) vs 60 min NB (-B27)	No	60 min NB (-B27) vs 120 min NB (+B27)	No
15 min NB (+B27) vs 90 min NB (+B27)	No	60 min NB (-B27) vs 120 min NB (-B27)	No
15 min NB (+B27) vs 90 min NB (-B27)	No	90 min NB (+B27) vs 90 min NB (-B27)	No
15 min NB (+B27) vs 120 min NB (+B27)	No	90 min NB (+B27) vs 120 min NB (+B27)	No
15 min NB (+B27) vs 120 min NB (-B27)	No	90 min NB (+B27) vs 120 min NB (-B27)	No
15 min NB (-B27) vs 30 min NB (+B27)	No	90 min NB (-B27) vs 120 min NB (+B27)	No
15 min NB (-B27) vs 30 min NB (-B27)	No	90 min NB (-B27) vs 120 min NB (-B27)	No
15 min NB (-B27) vs 60 min NB (+B27)	No	120 min NB (+B27) vs 120 min NB (-B27)	No

Efecto de la presencia de glucosa en la viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia

La segunda evaluación fue la de efecto de la presencia de glucosa en la viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente en el programa Graph Pad Prism 5, por medio de un ANOVA no paramétrico (Test de Kruskal-Wallis) y un post test de comparación múltiple de Dunn, debido a que al realizar la prueba de normalidad de D'Agostino y Pearson ómnibus se determinó que los datos no tienen una distribución normal. Los datos se muestran en la tabla 16 (ver anexos), en la tabla 7 y en la gráfica 5.



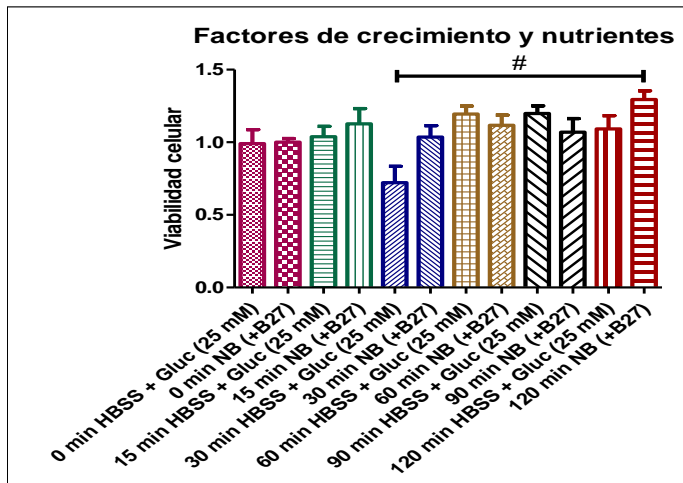
Gráfica 5. Promedio de viabilidad celular normalizado contra el tratamiento control (0 min de hipoxia) \pm EEM, con un n=22 para evaluar el efecto de la presencia de glucosa en la viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia (# = existe diferencia significativa entre esos tratamientos).

Tabla 7. Resultados del análisis estadístico para evaluar el efecto de la presencia de glucosa en la viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia (Test de Kruskal-Wallis: Valor $P < 0,0001$; $\alpha = 0,05$).

Test de comparación múltiple de Dunn	P<0,05	Test de comparación múltiple de Dunn	P<0,05
0 min HBSS vs 0 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	15 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 60 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
0 min HBSS vs 15 min HBSS	No	15 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 90 min HBSS	No
0 min HBSS vs 15 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	15 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 90 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
0 min HBSS vs 30 min HBSS	No	15 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 120 min HBSS	No
0 min HBSS vs 30 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	15 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 120 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
0 min HBSS vs 60 min HBSS	No	30 min HBSS vs 30 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
0 min HBSS vs 60 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	30 min HBSS vs 60 min HBSS	No
0 min HBSS vs 90 min HBSS	No	30 min HBSS vs 60 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
0 min HBSS vs 90 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	30 min HBSS vs 90 min HBSS	No
0 min HBSS vs 120 min HBSS	No	30 min HBSS vs 90 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
0 min HBSS vs 120 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	30 min HBSS vs 120 min HBSS	Si
0 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 15 min HBSS	No	30 min HBSS vs 120 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
0 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 15 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	30 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 60 min HBSS	No
0 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 30 min HBSS	No	30 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 60 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
0 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 30 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	30 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 90 min HBSS	No
0 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 60 min HBSS	No	30 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 90 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
0 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 60 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	30 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 120 min HBSS	No
0 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 90 min HBSS	No	30 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 120 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
0 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 90 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	60 min HBSS vs 60 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
0 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 120 min HBSS	Si	60 min HBSS vs 90 min HBSS	No
0 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 120 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	60 min HBSS vs 90 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
15 min HBSS vs 15 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	60 min HBSS vs 120 min HBSS	No
15 min HBSS vs 30 min HBSS	No	60 min HBSS vs 120 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
15 min HBSS vs 30 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	60 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 90 min HBSS	No
15 min HBSS vs 60 min HBSS	No	60 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 90 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
15 min HBSS vs 60 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	60 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 120 min HBSS	Si
15 min HBSS vs 90 min HBSS	No	60 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 120 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
15 min HBSS vs 90 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	90 min HBSS vs 90 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
15 min HBSS vs 120 min HBSS	No	90 min HBSS vs 120 min HBSS	Si
15 min HBSS vs 120 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	90 min HBSS vs 120 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
15 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 30 min HBSS	No	90 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 120 min HBSS	Si
15 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 30 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	90 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 120 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
15 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 60 min HBSS	No	120 min HBSS vs 120 min HBSS + Gluc (25 mM)	Si

Efecto de factores de crecimiento y nutrientes diferentes a la glucosa en la viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia

La tercera evaluación fue la de efecto de factores de crecimiento y nutrientes diferentes a la glucosa en la viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente en el programa Graph Pad Prism 5, por medio de un Test de Kruskal-Wallis y un post test de comparación múltiple de Dunn, debido a que al realizar la prueba de normalidad de D'Agostino y Pearson ómnibus se determinó que los datos no tienen una distribución normal. Los datos se muestran en la tabla 17 (ver anexos), en la tabla 8 y en la gráfica 6.



Gráfica 6. Promedio de viabilidad celular normalizado contra el tratamiento control (0 min de hipoxia) \pm EEM con un $n=22$ para evaluar el efecto de factores de crecimiento y nutrientes diferentes a la glucosa en viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia (# = existe diferencia significativa entre esos tratamientos).

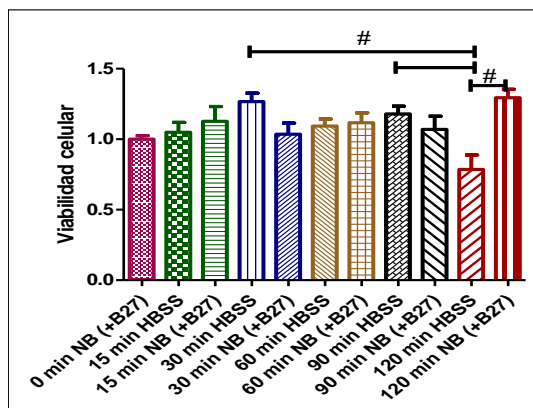
Tabla 8. Resultados del análisis estadístico para evaluar el efecto de factores de crecimiento y nutrientes diferentes a la glucosa en la viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia (Test de Kruskal-Wallis: Valor $P=0,0127$; $\alpha=0,05$).

Test de comparación múltiple de Dunn	$P < 0,05$	Test de comparación múltiple de Dunn	$P < 0,05$
0 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 0 min NB (+B27)	No	15 min NB (+B27) vs 60 min NB (+B27)	No
0 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 15 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	15 min NB (+B27) vs 90 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
0 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 15 min NB (+B27)	No	15 min NB (+B27) vs 90 min NB (+B27)	No
0 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 30 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	15 min NB (+B27) vs 120 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
0 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 30 min NB (+B27)	No	15 min NB (+B27) vs 120 min NB (+B27)	No
0 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 60 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	30 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 30 min NB (+B27)	No
0 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 60 min NB (+B27)	No	30 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 60 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
0 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 90 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	30 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 60 min NB (+B27)	No
0 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 90 min NB (+B27)	No	30 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 90 min HBSS + Gluc (25 mM)	No

0 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 120 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	30 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 90 min NB (+B27)	No
0 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 120 min NB (+B27)	No	30 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 120 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
0 min NB (+B27) vs 15 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	30 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 120 min NB (+B27)	Si
0 min NB (+B27) vs 15 min NB (+B27)	No	30 min NB (+B27) vs 60 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
0 min NB (+B27) vs 30 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	30 min NB (+B27) vs 60 min NB (+B27)	No
0 min NB (+B27) vs 30 min NB (+B27)	No	30 min NB (+B27) vs 90 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
0 min NB (+B27) vs 60 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	30 min NB (+B27) vs 90 min NB (+B27)	No
0 min NB (+B27) vs 60 min NB (+B27)	No	30 min NB (+B27) vs 120 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
0 min NB (+B27) vs 90 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	30 min NB (+B27) vs 120 min NB (+B27)	No
0 min NB (+B27) vs 90 min NB (+B27)	No	60 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 60 min NB (+B27)	No
0 min NB (+B27) vs 120 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	60 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 90 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
0 min NB (+B27) vs 120 min NB (+B27)	No	60 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 90 min NB (+B27)	No
15 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 15 min NB (+B27)	No	60 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 120 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
15 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 30 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	60 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 120 min NB (+B27)	No
15 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 30 min NB (+B27)	No	60 min NB (+B27) vs 90 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
15 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 60 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	60 min NB (+B27) vs 90 min NB (+B27)	No
15 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 60 min NB (+B27)	No	60 min NB (+B27) vs 120 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
15 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 90 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	60 min NB (+B27) vs 120 min NB (+B27)	No
15 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 90 min NB (+B27)	No	90 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 90 min NB (+B27)	No
15 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 120 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	90 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 120 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
15 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 120 min NB (+B27)	No	90 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 120 min NB (+B27)	No
15 min NB (+B27) vs 30 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	90 min NB (+B27) vs 120 min HBSS + Gluc (25 mM)	No
15 min NB (+B27) vs 30 min NB (+B27)	No	90 min NB (+B27) vs 120 min NB (+B27)	No
15 min NB (+B27) vs 60 min HBSS + Gluc (25 mM)	No	120 min HBSS + Gluc (25 mM) vs 120 min NB (+B27)	No
15 min NB (+B27) vs 60 min NB (+B27)	No		

Efecto de la privación simultánea de oxígeno y glucosa en la viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia

La cuarta evaluación fue la de efecto de la privación simultánea de oxígeno y glucosa en la viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente en el programa Graph Pad Prism 5, por medio de un ANOVA de una vía y un post test de comparación múltiple de Tukey. Los datos se muestran en la tabla 18 (ver anexos), en la tabla 9 y en la gráfica 7.

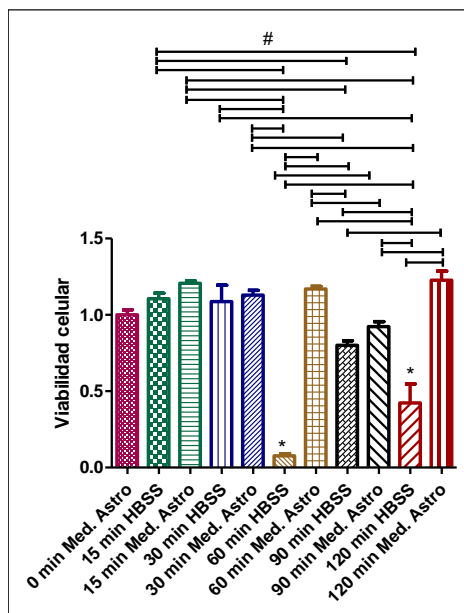


Gráfica 7. Promedio de viabilidad celular normalizado contra el tratamiento control (0 min de hipoxia) \pm EEM con un n=22 para evaluar el efecto de la deprivación simultánea de oxígeno y glucosa en la viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia en cultivos mixtos (# = existe diferencia significativa entre esos tratamientos).

Tabla 9. Resultados del análisis estadístico para evaluar el efecto de la deprivación simultánea de oxígeno y glucosa en la viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia en cultivos mixtos (ANOVA Valor $P=0,0003$; $\alpha=0,05$).

Test de comparación múltiple de Tukey	P<0,05	Test de comparación múltiple de Tukey	P<0,05
0 min NB (+B27) vs 15 min HBSS	No	30 min HBSS vs 30 min NB (+B27)	No
0 min NB (+B27) vs 15 min NB (+B27)	No	30 min HBSS vs 60 min HBSS	No
0 min NB (+B27) vs 30 min HBSS	No	30 min HBSS vs 60 min NB (+B27)	No
0 min NB (+B27) vs 30 min NB (+B27)	No	30 min HBSS vs 90 min NB (+B27)	No
0 min NB (+B27) vs 60 min HBSS	No	30 min HBSS vs 120 min HBSS	Si
0 min NB (+B27) vs 60 min NB (+B27)	No	30 min HBSS vs 120 min NB (+B27)	No
0 min NB (+B27) vs 90 min HBSS	No	30 min NB (+B27) vs 60 min HBSS	No
0 min NB (+B27) vs 90 min NB (+B27)	No	30 min NB (+B27) vs 60 min NB (+B27)	No
0 min NB (+B27) vs 120 min HBSS	No	30 min NB (+B27) vs 90 min HBSS	No
0 min NB (+B27) vs 120 min NB (+B27)	No	30 min NB (+B27) vs 90 min NB (+B27)	No
15 min HBSS vs 15 min NB (+B27)	No	30 min NB (+B27) vs 120 min HBSS	No
15 min HBSS vs 30 min HBSS	No	30 min NB (+B27) vs 120 min NB (+B27)	No
15 min HBSS vs 30 min NB (+B27)	No	60 min HBSS vs 60 min NB (+B27)	No
15 min HBSS vs 60 min HBSS	No	60 min HBSS vs 90 min HBSS	No
15 min HBSS vs 60 min NB (+B27)	No	60 min HBSS vs 90 min NB (+B27)	No
15 min HBSS vs 90 min HBSS	No	60 min HBSS vs 120 min HBSS	No
15 min HBSS vs 90 min NB (+B27)	No	60 min NB (+B27) vs 90 min HBSS	No
15 min HBSS vs 120 min HBSS	No	60 min NB (+B27) vs 90 min NB (+B27)	No
15 min HBSS vs 120 min NB (+B27)	No	60 min NB (+B27) vs 120 min NB (+B27)	No
15 min NB (+B27) vs 30 min HBSS	No	90 min HBSS vs 90 min NB (+B27)	No
15 min NB (+B27) vs 60 min HBSS	No	90 min HBSS vs 120 min HBSS	Si
15 min NB (+B27) vs 60 min NB (+B27)	No	90 min HBSS vs 120 min NB (+B27)	No
15 min NB (+B27) vs 90 min HBSS	No	90 min NB (+B27) vs 120 min HBSS	No
15 min NB (+B27) vs 90 min NB (+B27)	No	90 min NB (+B27) vs 120 min NB (+B27)	No
15 min NB (+B27) vs 120 min HBSS	No	120 min HBSS vs 120 min NB (+B27)	Si
15 min NB (+B27) vs 120 min NB (+B27)	No		

El ensayo de astrocitos para evaluar el efecto de la deprivación simultánea de oxígeno y glucosa, se realizó únicamente una vez, debido a que solo en esa ocasión se logró obtener cultivos viables. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente en el programa Graph Pad Prism 5, por medio de un ANOVA de una vía y un post test de comparación múltiple de Tukey. Los resultados se muestran en la tabla 19 (ver anexos), gráfica 8 y tabla 10.



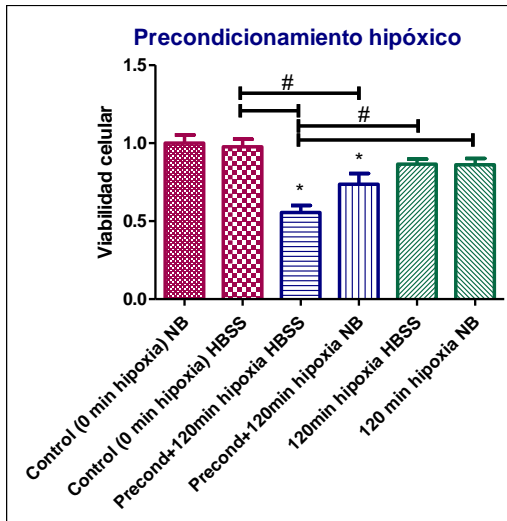
Gráfica 8. Promedio de viabilidad celular normalizado contra el tratamiento control (0 min de hipoxia) \pm EEM con un n=7 para los tiempos 0 minutos y 120 minutos y un n=6 para los otros tiempos, para evaluar el efecto de la deprivación simultánea de oxígeno y glucosa en la viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia en cultivo de astrocitos (*= existe diferencia significativa respecto al control; # = existe diferencia significativa entre esos tratamientos).

Tabla 10. Resultados del análisis estadístico para evaluar el efecto de la deprivación simultánea de oxígeno y glucosa en la viabilidad celular de cultivos de astrocitos, bajo diferentes tiempos de hipoxia (ANOVA: Valor $P < 0,0001$; $\alpha = 0,05$).

Test de comparación múltiple de Tukey	P<0,05	Test de comparación múltiple de Tukey	P<0,05
0 min Med. Astro vs 15 min HBSS	No	15 min Med. Astro vs 90 min Med. Astro	No
0 min Med. Astro vs 15 min Med. Astro	No	30 min HBSS vs 60 min HBSS	Si
0 min Med. Astro vs 30 min HBSS	No	30 min HBSS vs 60 min Med. Astro	No
0 min Med. Astro vs 30 min Med. Astro	No	30 min HBSS vs 90 min HBSS	No
0 min Med. Astro vs 60 min HBSS	Si	30 min HBSS vs 90 min Med. Astro	No
0 min Med. Astro vs 60 min Med. Astro	No	30 min HBSS vs 120 min HBSS	Si
0 min Med. Astro vs 90 min HBSS	No	30 min HBSS vs 120 min Med. Astro	No
0 min Med. Astro vs 90 min Med. Astro	No	30 min Med. Astro vs 60 min HBSS	Si
0 min Med. Astro vs 120 min HBSS	Si	30 min Med. Astro vs 60 min Med. Astro	No
0 min Med. Astro vs 120 min Med. Astro	No	30 min Med. Astro vs 90 min HBSS	Si
15 min HBSS vs 15 min Med. Astro	No	30 min Med. Astro vs 90 min Med. Astro	No
15 min HBSS vs 30 min HBSS	No	30 min Med. Astro vs 120 min HBSS	Si
15 min HBSS vs 30 min Med. Astro	No	30 min Med. Astro vs 120 min Med. Astro	No
15 min HBSS vs 60 min HBSS	Si	60 min HBSS vs 60 min Med. Astro	Si
15 min HBSS vs 60 min Med. Astro	No	60 min HBSS vs 90 min HBSS	Si
15 min HBSS vs 90 min HBSS	Si	60 min HBSS vs 90 min Med. Astro	Si
15 min HBSS vs 90 min Med. Astro	No	60 min HBSS vs 120 min HBSS	Si
15 min HBSS vs 120 min HBSS	Si	60 min HBSS vs 120 min Med. Astro	Si
15 min HBSS vs 120 min Med. Astro	No	60 min Med. Astro vs 90 min HBSS	Si
15 min Med. Astro vs 30 min HBSS	No	60 min Med. Astro vs 90 min Med. Astro	No
15 min Med. Astro vs 30 min Med. Astro	No	60 min Med. Astro vs 120 min HBSS	Si
15 min Med. Astro vs 60 min HBSS	Si	60 min Med. Astro vs 120 min Med. Astro	No
15 min Med. Astro vs 60 min Med. Astro	No	90 min HBSS vs 90 min Med. Astro	No
15 min Med. Astro vs 90 min HBSS	Si	90 min HBSS vs 120 min HBSS	Si
15 min Med. Astro vs 90 min Med. Astro	No	90 min HBSS vs 120 min Med. Astro	Si
15 min Med. Astro vs 120 min HBSS	Si	90 min Med. Astro vs 120 min HBSS	Si
15 min Med. Astro vs 120 min Med. Astro	No	90 min Med. Astro vs 120 min Med. Astro	Si
30 min HBSS vs 30 min Med. Astro	No	120 min HBSS vs 120 min Med. Astro	Si

4.5.3 Precondicionamiento hipóxico

Después de realizar los ensayos de viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia, se establecieron los tiempos de hipoxia de 30 minutos y 120 minutos como evento hipóxico preconditionante y evento hipóxico letal, respectivamente. Lo anterior, con el objetivo de evaluar *in vitro* si el preconditionamiento hipóxico es un tratamiento neuroprotector y si tiene algún efecto en los niveles de O-GlcNAcificación. Los resultados del experimento independiente que se efectuó se presentan en la tabla 20 (ver anexos), gráfica 9 y tabla 11.



Gráfica 9. Promedio de viabilidad celular normalizado contra el tratamiento control (0 min de hipoxia) \pm EEM con un $n=8$ para evaluar el efecto del preconditionamiento hipóxico en la viabilidad celular (*=existe diferencia significativa respecto al control; # =existe diferencia significativa entre esos tratamientos).

Tabla 11. Resultados del análisis estadístico para evaluar el efecto del preconditionamiento hipóxico en la viabilidad celular (ANOVA: Valor $P<0,0001$; $\alpha=0,05$; NB= medio neurobasal; HBSS= solución salina balanceada; precond= preconditionamiento).

Test de comparación múltiple de Tukey	P<0,05
Control (0 min hipoxia) NB vs Control (0 min hipoxia) HBSS	No
Control (0 min hipoxia) NB vs Precond+120min hipoxia HBSS	Si
Control (0 min hipoxia) NB vs Precond+120min hipoxia NB	Si
Control (0 min hipoxia) NB vs 120min hipoxia HBSS	No
Control (0 min hipoxia) NB vs 120 min hipoxia NB	No
Control (0 min hipoxia) HBSS vs Precond+120min hipoxia HBSS	Si
Control (0 min hipoxia) HBSS vs Precond+120min hipoxia NB	Si
Control (0 min hipoxia) HBSS vs 120min hipoxia HBSS	No
Control (0 min hipoxia) HBSS vs 120 min hipoxia NB	No
Precond+120min hipoxia HBSS vs Precond+120min hipoxia NB	No
Precond+120min hipoxia HBSS vs 120min hipoxia HBSS	Si
Precond+120min hipoxia HBSS vs 120 min hipoxia NB	Si
Precond+120min hipoxia NB vs 120min hipoxia HBSS	No
Precond+120min hipoxia NB vs 120 min hipoxia NB	No
120min hipoxia HBSS vs 120 min hipoxia NB	No

Finalmente, se realizó el análisis por ImageJ de las imágenes tomadas en el microscopio de fluorescencia de la Universidad Icesi, para establecer la intensidad

de fluorescencia emitida por el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 555 goat anti-mouse IgG que se une al anticuerpo primario RL2 (rojo-naranja), el cual detecta la O-GlcNAcilación. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente en el programa Graph Pad Prism 5, por medio de un ANOVA no paramétrico (Test de Kruskal-Wallis) y un post test de comparación múltiple de Dunn, debido a que al realizar la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov se determinó que los datos no tienen una distribución normal. Los resultados se muestran en la imagen 6, tabla 21 (ver anexos), gráfica 10 y tabla 12.

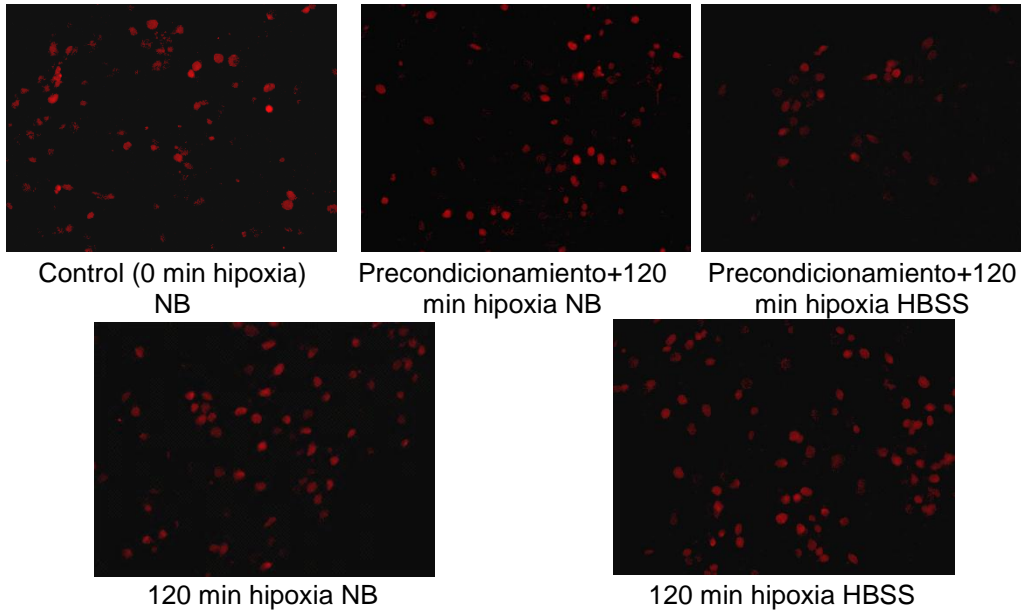
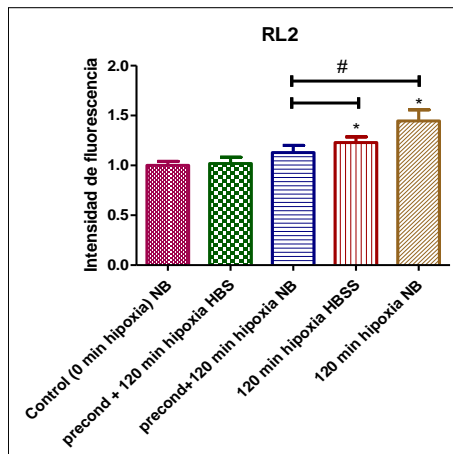


Imagen 6. Imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia para visualizar la intensidad de fluorescencia del RL2.



Gráfica 10. Promedio de intensidad de fluorescencia del RL2/célula, normalizados contra el tratamiento control (0 min hipoxia) \pm EEM, para evaluar los niveles de O- GlcNAcilación después del precondicionamiento hipóxico (*= existe diferencia significativa respecto al control; # =existe diferencia significativa entre esos tratamientos).

Tabla 12. Resultados del análisis estadístico para evaluar el efecto del acondicionamiento hipóxico en los niveles de O-GlcNAcificación (Test de Kruskal-Wallis: Valor $P=0,0103$; $\alpha=0,05$; *precond= acondicionamiento*).

Test de comparación múltiple de Dunn	P<0,05
Control (0 min hipóxia) NB vs <i>precond</i> + 120 min hipóxia HBS	No
Control (0 min hipóxia) NB vs <i>precond</i> +120 min hipóxia NB	No
Control (0 min hipóxia) NB vs 120 min hipóxia HBSS	Si
Control (0 min hipóxia) NB vs 120 min hipóxia NB	Si
<i>precond</i> + 120 min hipóxia HBS vs <i>precond</i> +120 min hipóxia NB	No
<i>precond</i> + 120 min hipóxia HBS vs 120 min hipóxia HBSS	No
<i>precond</i> + 120 min hipóxia HBS vs 120 min hipóxia NB	No
<i>precond</i> +120 min hipóxia NB vs 120 min hipóxia HBSS	Si
<i>precond</i> +120 min hipóxia NB vs 120 min hipóxia NB	Si
120 min hipóxia HBSS vs 120 min hipóxia NB	No

4.6 Discusión de resultados

4.6.1 Estandarización del cultivo neuronal

La primera parte del trabajo experimental consistió en la estandarización del método de cultivo primario de neuronas de rata Wistar, debido a que en la Universidad Icesi no existía un protocolo para realizar dicho procedimiento y el que se usó, sirvió como base, pero debía ser ajustado a las necesidades y condiciones de cultivo actuales.

Es importante resaltar que este tipo de cultivos permiten evaluar *in vitro*, diferentes procesos celulares de una manera más simplificada, en comparación con el estudio *in vivo*. No obstante, para lograr estandarizar completamente el método de cultivo para neuronas de rata se debe realizar pruebas adicionales que ayuden a ajustar variables como el tipo de digestión enzimática (enzimas y tiempo), número de células a sembrar y concentración de arabinósido de citosina.

Durante la etapa de estandarización se encontró que la digestión enzimática del tejido era un paso clave en la viabilidad celular, ya que dependiendo de qué tan aisladas quedaban las neuronas de otro tipo de células, el cultivo era más saludable. Lo anterior es importante porque al estar presentes células no deseadas, estas pueden liberar citoquinas que provoquen la muerte celular (Rabinovich, 2004). Adicionalmente, si en este paso quedan muchas células muertas y estas no se logran separar de las neuronas, el cultivo comienza a deteriorarse y en el momento de realizar las pruebas *in vitro*, las neuronas no están saludables para lograr observar el comportamiento que se desea evaluar. Por tal motivo, el tipo de enzima usado en este trabajo fue la tripsina y el tiempo de incubación fueron 10 minutos, pero se deben evaluar diferentes tiempos y otro tipo de enzima como la papaína, la cual se usa en algunos artículos como (Meloni, Majda, & Knuckey, 2001), (Kaneko, Yokoyama, & Makita, 2005), (Meloni, Majda, & Knuckey, 2002), entre otros.

Posteriormente, se efectuó un cultivo de astrocitos (anexos: imagen 8) donde el objetivo principal de este experimento fue establecer el número adecuado de células para llevar a cabo el ensayo de viabilidad celular. A partir de los resultados de la gráfica 1, se pudo determinar que la cantidad óptima de células (astrocitos) es de 25000/pozo. Por encima de esta densidad celular los valores de absorbancia se vuelven constantes y no es posible establecer diferencias. Adicionalmente, se confirmó que tanto el kit como el protocolo funcionan adecuadamente y puede ser usado en futuros experimentos.

Asimismo, se intentó realizar cultivos neuronales puros con la adición del reactivo arabinósido de citosina, pero esto no fue posible porque al revisar las células en el día *in vitro* 7, en la mayoría de los pozos las neuronas habían muerto, por lo que se concluyó que este compuesto es muy agresivo para las neuronas y es necesario ajustar su concentración para futuros ensayos; por lo tanto, se decidió realizar cultivos mixtos (neuronas y astrocitos). Este efecto del arabinósido de citosina sobre la cantidad de células se puede evidenciar en las imágenes 4 y 5, en las cuales se nota una diferencia en la cantidad de células, principalmente en el número de astrocitos. Además, en la imagen 5 se puede observar el cultivo mixto con el que se trabajó en el resto de los experimentos, logrando deducir que hace falta optimizar la disgregación celular, pues las células se encuentran muy juntas formando cúmulos, lo cual se cree que es una de las razones por las cuales el comportamiento en la viabilidad celular, varió tanto. Por lo anterior, es necesario determinar el % Confluencia celular antes de iniciar el experimento.

Además, aunque se realizó una curva de calibración para el número de astrocitos sembrados, parece que no puede ser utilizado para sembrar neuronas, ya que el conteo de todas las células de la suspensión celular sembrado incluye astrocitos que pueden proliferar en el tiempo; y en el día *in vitro* 7, es posible que se tenga un número mayor de células por pozo (puede ser que el número de neuronas no varíe desde el primer día, pero los astrocitos sí). Por lo cual se requiere hacer una prueba para detectar el tipo de células que hay en el cultivo, por ejemplo una tinción con NeuN y GFAP, antes de iniciar los ensayos de viabilidad.

4.6.2 Ensayo de viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia

Posteriormente, se procedió a realizar diversos ensayos de viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia con el objetivo de determinar cuál es el efecto de estos en la viabilidad; y así, poder establecer un tiempo de exposición a hipoxia como estímulo no letal y otro como letal.

Inicialmente, se efectuaron dos ensayos de viabilidad celular, uno con cultivo mixto y otro con astrocitos. En la tabla 13 (ver anexos), se puede observar los resultados del ensayo con neuronas y astrocitos, en el cual solo se usaron 3 columnas de las placas de 96 pozos para evaluar dos tipos de tratamientos: cultivos con HBSS y cultivos con medio Neurobasal. Sin embargo, estos datos no se tuvieron en cuenta

como parte del análisis estadístico final, debido a que el diseño experimental estaba incompleto, puesto que faltaba adicionar un control para el cultivo con HBSS que consistiera en adicionarle glucosa al HBSS, para establecer si la presencia de glucosa en el medio neurobasal influía en los resultados. Adicionalmente, surgió la hipótesis de que el suplemento B-27, al contener compuestos antioxidantes como superóxido dismutasa, glutatión, vitamina E, catalasa y transferrina, podría contrarrestar los efectos de la hipoxia y alterar los resultados de viabilidad celular (Xie, Markesbery, & Lovell, 1999). Por lo anterior, se decidió realizar una comparación para cada placa de cultivo entre una columna con medio Neurobasal sin B-27 y otra con B-27. El esquema completo se muestra en la figura 5.

No obstante, con los resultados de los primeros ensayos se pudo observar que en el cultivo mixto no se presenta como tal un comportamiento de aumento o disminución en la viabilidad conforme el tiempo de hipoxia, sino que la respuesta (absorbancia) varía indiferentemente. Sin embargo, en el cultivo de astrocitos se logró ver que el control (0 minutos de hipoxia) y 120 minutos, presentan respectivamente los valores más altos y bajos de viabilidad, respectivamente (ver gráfica 3), lo cual está en concordancia con lo encontrado en la literatura (Kaneko, Yokoyama, & Makita, 2005).

Como segundo paso, se realizó tres ensayos de viabilidad celular independientes, en los cuales se usaron cerebros de ratas recién nacidas de camadas diferentes. Con los resultados de estos experimentos se analizó el efecto del suplemento B27 (Tabla 6), la presencia de glucosa en el medio de cultivo (Tabla 7), la presencia de factores de crecimiento y nutrientes diferentes a la glucosa (Tabla 8) y la privación simultánea de oxígeno y glucosa en la viabilidad celular (Tabla 9).

En los datos mostrados en la gráfica 4 y la tabla 6 se puede observar que existe diferencia significativa ($p=0,0003$), en la viabilidad celular usando un ANOVA de una vía para todos los tiempos de hipoxia evaluados con y sin B27 en el medio neurobasal. Esta prueba arroja que hay diferencias pero no indica si se debe a que uno de los grupos es diferente de los demás o todos son diferentes entre ellos. Para identificar cuáles son las parejas de poblaciones diferentes entre sí se procede a realizar el test de comparación múltiple de Tukey, encontrando que solo el tiempo de 120 minutos de hipoxia con adición de B27 respecto al control sin B27 es significativamente diferente. En consecuencia, se puede pensar que el suplemento B-27 podría afectar la resistencia de las neuronas ante un evento hipóxico y por lo tanto, su viabilidad, es decir que cuando al medio neurobasal se le adiciona B27, las neuronas tienen una fuente de compuestos antioxidantes adicionales que pueden explicar la diferencia en las viabilidades del control sin B27 (viabilidad menor) y el tiempo de 120 minutos con B27 (viabilidad mayor), lo cual coincide con diferentes artículos que evalúan el preconditionamiento hipóxico como mecanismo neuroprotector, pues mencionan que no usaron B27 después de

aplicar el estímulo hipóxico, para no interferir en los resultados (Meloni, Majda, & Knuckey, 2001).

Con la serie de experimentos representada en la gráfica 5 se intentó determinar si la presencia de glucosa en el cultivo afectaba la respuesta de la célula al estrés hipóxico. Para esto se comparó una columna de la placa de 96 pozos que contenía solución salina balanceada (HBSS) con otra columna que tenía HBSS con 25mM glucosa, para cada tiempo. En la tabla 7 se observa que existe una diferencia significativa ($p < 0,001$) usando la prueba de kruskal wallis para todos los tiempos de hipoxia evaluados. Al realizar el test de comparación múltiple de Dunn, se encontraron 6 diferencias significativas, todas relacionadas con el tiempo 120 min de hipoxia en medio HBSS (deprivación simultánea de oxígeno y glucosa). Dos de las diferencias muestran que 120 minutos de hipoxia sin aporte de glucosa presenta menor viabilidad (78%) que 30 minutos y 90 minutos de hipoxia sin aporte de este nutriente, lo que indica que el estímulo hipóxico letal puede estar alrededor de 120 minutos. Adicionalmente, al comparar 120 minutos de hipoxia sin glucosa con 0, 60,90 y 120 minutos de hipoxia con adición de glucosa, se observa que el aporte de glucosa contribuye a que el daño celular por hipoxia sea menor, lo cual está en concordancia con lo que se presenta durante un accidente cerebrovascular isquémico, en el cual se presenta tanto una disminución en el aporte de oxígeno como de nutrientes como la glucosa, lo que hace que el daño celular sea mayor y que las células finalmente se mueran, ya sea por necrosis o apoptosis. Lo anterior, ocurre principalmente en la zona de necrosis; sin embargo, en la zona de penumbra, algunas células logran recuperarse, esto posiblemente porque en esta área, las neuronas al estar más alejadas de la zona de infarto, tienen un aporte de oxígeno y nutrientes mayor. Entonces se simuló *in vitro* lo que sucedería si hay reducción de aporte de oxígeno sin glucosa (HBSS) y cuando está presente este nutriente (HBSS+Glucosa), logrando establecer que es más difícil para las neuronas recuperarse cuando, además de la reducción de oxígeno no existe aporte de glucosa, por lo que este compuesto es vital para la supervivencia de las neuronas ante un estímulo letal hipóxico (Arango D, Escobar B, Cardona G, & Pimienta J, 2004).

Posteriormente, en la tabla 8 se muestran los resultados del análisis estadístico para establecer si existe algún efecto protector ante la hipoxia de los factores de crecimiento y nutrientes diferentes a la glucosa presentes en el medio Neurobasal; estos arrojaron que existe tal diferencia al usar el test de Kruskal-Wallis ($p = 0,0127$). Luego, cuando se realizó el test de comparación múltiple de Dunn se encontró que la única diferencia se debe al tiempo de 120 minutos (en medio neurobasal) respecto a 30 minutos (en HBSS con glucosa), en donde el tiempo mayor presenta mayor viabilidad, lo cual no tiene sentido ya que en otras pruebas se vio que 120 minutos causa más daño celular que tiempos menores, por lo tanto el dato de viabilidad de 30 minutos de hipoxia es anómalo porque se sale del comportamiento de todos los demás. Esta diferencia entre HBSS+Glucosa y medio Neurobasal, se debe a que posiblemente durante el ensayo de viabilidad

celular, se adicionó menor cantidad de medio con glucosa, afectando así la absorbancia de las muestras. Por lo tanto, se puede considerar que la composición de los medios no afecta la viabilidad celular para cada uno de los tiempos.

En la tabla 9 se comparó el control de 0 minutos de hipoxia y medio Neurobasal con B-27 (condiciones normales de cultivo) con el tratamiento de HBSS (deprivación de oxígeno y glucosa) y con el tratamiento de Neurobasal con B-27 (hipoxia) para cada uno de los tiempos, con el objetivo de aislar el efecto sobre la supervivencia celular de la deprivación de oxígeno únicamente. En estos resultados se encontró en el ANOVA de una vía que existe diferencia significativa ($p=0,0003$) entre las poblaciones evaluadas. Luego, al usar el test de comparación múltiple de Tukey se estableció que 120 minutos de deprivación de oxígeno y glucosa (OGD) es significativamente diferente respecto a 30 y 90 minutos de deprivación de oxígeno y glucosa, y de 120 minutos de deprivación de oxígeno. Esto indica que 120 minutos de OGD causa mayor daño celular que tiempos menores como 90 y 30 minutos, y que se presenta menor viabilidad cuando se exponen las células cerebrales a un estímulo OGD que a un estímulo hipóxico, pues la glucosa es un factor de protección. La principal diferencia entre el daño causado en presencia y ausencia de glucosa, es el estrés oxidativo que se da por la falta de glucosa y de oxígeno, ya que se aumenta la producción de radicales libres de oxígeno y la vía energética anaeróbica (Goldberg & Choi, 1993).

El ensayo de deprivación simultánea de oxígeno y glucosa sobre la viabilidad celular bajo diferentes tiempos de deprivación (HBSS u OGD) se usó para determinar cuál tiempo de deprivación podría ser usado como estímulo no letal y cuál como letal. Se estableció que el estímulo no letal sería aquel que presente una viabilidad mayor al 50% respecto al control (100%), y el letal presentaría una viabilidad entre el 40-20% respecto al control (Badaut, y otros, 2005).

Se escogió el tiempo de 120 min de deprivación de oxígeno y glucosa como el que produce el mayor daño, ya que tanto en la evaluación del efecto del OGD como en la presencia de glucosa, en la viabilidad celular se observó que la exposición a este periodo de hipoxia causa una reducción en la viabilidad celular. Por lo tanto, este tiempo se escogió como estímulo letal. No obstante, este dato presenta un porcentaje de viabilidad del 79%, el cual es mayor al establecido en la literatura para este estímulo.

Para escoger el estímulo no letal se realizó una revisión de la literatura y se encontró que tiempos menores de 30 minutos producen una pérdida neuronal pequeña y que los tiempos ensayados varían desde 5 minutos a 30 minutos de hipoxia, lo cual coincide con los resultados de las gráficas 5 y 7, donde se observa que 30 minutos de OGD presentan mayor viabilidad celular que 120 minutos de OGD, por lo que el tiempo elegido fue 30 minutos (Goldberg & Choi, 1993).

Adicionalmente, en el ensayo de viabilidad celular que se realizó al cultivo de astrocitos se comparó la deprivación simultánea de oxígeno y glucosa (HBSS) con la deprivación de oxígeno (Medio astrocitos). En la tabla 10 se muestra que existe diferencia significativa entre los tratamientos evaluados por ANOVA de una vía ($p < 0,0001$), y al compararlo con el test de Tukey se encontraron 23 diferencias que se observan en la gráfica 8. En esta gráfica se puede ver que el tiempo 60 minutos en medio HBSS presenta valores muy bajos de viabilidad, lo cual se debe a un error experimental en la cantidad de medio de cultivo adicionado y no se atribuye al experimento como tal.

En la gráfica 8 se puede observar que los tiempos de 15 y 30 minutos de hipoxia (tanto en medio de astrocitos como HBSS), presentan una viabilidad mayor que los tiempos de 90 y 120 minutos de OGD, lo que corrobora que tiempos menores de 30 minutos pueden usarse como estímulo preconditionante. Adicionalmente, 60 y 90 minutos de hipoxia son menos letales que 120 minutos de OGD. No obstante, los otros resultados no tienen sentido porque muestran que el tiempo de 120 minutos en medio de astrocitos presenta mayor viabilidad que el tiempo de 90 minutos. En general, estos valores muestran una tendencia de que tiempos por debajo de 30 minutos presentan valores de viabilidad celular mayores que tiempos por encima de 90 minutos.

Durante los ensayos de viabilidad celular se observó que cuando se burbujeaban los medios de cultivo Neurobasal y astrocitos, estos cambiaban de color, pasaban de rojo a fucsia. Lo anterior se debe a que estos reactivos contienen fenol rojo, el cual actúa como indicador de pH del medio, y al cambiar de rojo a fucsia indica que el pH está aumentando, lo cual se da por el cambio en la cantidad de oxígeno en el medio. Esto es importante porque lo que se desea con el burbujeo del medio de cultivo con nitrógeno, antes de usarlo, es que esté libre de oxígeno para que la deprivación de oxígeno sea efectiva.

4.6.3 Precondicionamiento hipóxico

A partir de los ensayos de viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia se escogieron los tiempos de 30 minutos y 120 minutos como estímulos preconditionante y letal, respectivamente. Con estos tiempos se realizó un ensayo de viabilidad celular para evaluar el efecto del preconditionamiento hipóxico sobre esta variable.

En la tabla 11 se muestran los resultados del análisis estadístico, los cuales se obtuvieron después de realizar un ANOVA de una vía y determinar que existen diferencias significativas ($p < 0,0001$). Luego, al comparar los datos por el test de comparación de Turkey se encontraron 6 diferencias entre el tratamiento de preconditionamiento (HBSS y NB) con el control (tanto con HBSS como NB) y con 120 minutos de hipoxia (HBSS y NB). Esto se observa en la gráfica 9, en la cual el preconditionamiento con HBSS presenta menor viabilidad que los otros

tratamientos. Las diferencias con el control (0 minutos de hipoxia) son esperadas pues al no exponer el cultivo a hipoxia, este va a presentar mayores valores de viabilidad celular. Sin embargo, la diferencia con el estímulo letal seleccionado de 120 minutos de hipoxia no concuerda con lo reportado en otros estudios sobre el preconditionamiento hipóxico, en los cuales este tratamiento presenta mayor supervivencia celular que el evento letal (Badaut, y otros, 2005). Este comportamiento se puede deber a varias razones: una puede ser que como tal la privación simultánea de oxígeno y glucosa al ser un estímulo de estrés celular, puede activar vías tanto protectoras como de muerte, y es lo que todavía no se ha logrado dilucidar muy bien; por lo tanto, lo que se podría estar presentando en los ensayos de viabilidad es que las células (neuronas y astrocitos) están respondiendo negativamente al preconditionamiento, es decir, se favorecen las vías de muerte, tanto apoptóticas como de necrosis. Lo anterior, se relaciona con la respuesta celular ante el estrés oxidativo y al entorno o microambiente celular, debido a que las neuronas en su ambiente normal *in vivo*, presentan conexiones y reciben constantemente señales de supervivencia desde la matriz extracelular y de otras células, mientras que *in vitro* se pierde esta comunicación, lo que favorece aún más las vías de muerte celular. Estas teorías se podrían corroborar si se hicieran más ensayos. En esta ocasión, los datos se obtuvieron a partir de un solo experimento, lo que dificulta obtener una tendencia clara.

Otra razón está directamente relacionada con el montaje experimental y la estandarización de la metodología, ya que como se ha mencionado anteriormente, solo fue posible realizar un experimento, el cual se efectuó en cultivo no estandarizados completamente, que puede generar resultados no concluyentes. Un punto importante es que los 120 min de hipoxia no generaron la disminución en la viabilidad celular que según la literatura lo clasifica como letal. Además, hace falta tener más control sobre el número de células en el cultivo al momento de realizar el ensayo. Como se mencionó previamente, la curva de calibración indicó que se debía realizar el ensayo máximo con 20,000 células (Gráfica 1), pero este número se sembró el primer día y no se tuvo en cuenta que los astrocitos proliferan, por lo que en un pozo dado se podrían tener por ejemplo, 50,000 células o más. También, se pudo notar que la cantidad de células sembradas entre los pozos era diferente a simple vista, por lo que los resultados desde el inicio, ya podrían opacar la respuesta buscada con los tratamientos empleados. Estas razones están relacionadas, porque al no tener cultivos completamente sanos (por la metodología empleada), estos al exponerse a un evento hipóxico se van a estropear más, favoreciendo las vías de muerte neuronal.

Finalmente, en la gráfica 10 se observa la intensidad de fluorescencia del RL2/célula (anticuerpo anti- O-Linked N-Acetilglucosamina), el cual detecta el complejo de poro nuclear (NPC) y glicoproteínas citoplásmicas e intranucleares unidas con N-Acetilglucosamina de tejido humano, de ratón y rata. En la tabla 12 se muestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados por el test de Kruskal-Wallis ($p=0,0103$), las cuales según el test de comparación

de Dunn, son 120 minutos de hipoxia respecto al control de 0 minutos de hipoxia y entre el preconditionamiento (medio neurobasal) y 120 minutos de hipoxia (HBSS y NB), siendo menor su intensidad de fluorescencia. Lo anterior, está en concordancia con los resultados de viabilidad celular de la gráfica 9, en donde el tratamiento de preconditionamiento hipóxico presenta menor supervivencia que 120 minutos de hipoxia. Adicionalmente, en la gráfica 10 se muestra que el valor más alto de intensidad de fluorescencia lo presenta el tiempo de 120 minutos de hipoxia, que fue seleccionado como estímulo letal, lo cual indica que el estrés celular que sufrieron las células cerebrales podría aumentar los niveles de O-GlcNAc, coincidiendo con lo descrito por Butkinaree et al. (2010), quienes afirman que la GlcNAcilación juega un papel protector contra el estrés celular y que los niveles de O-GlcNAc se incrementan en respuesta a diversas formas de estrés. Se observa en la gráfica 10 que el preconditionamiento hipóxico presenta niveles de O-GlcNAc menores que los otros tratamientos evaluados, y que a su vez, en la gráfica 9, los valores de supervivencia celular son menores, este resultado es difícil de explicar pero lo que queda en evidencia es que el protocolo de preconditionamiento escogido no resulta citoprotector. Esta diferencia con lo reportado en la literatura se presenta debido a la falta de estandarización del cultivo y al procedimiento de preconditionamiento, por lo que se debe continuar indagando en este aspecto.

Se observó que a mayor viabilidad celular mayores son los niveles de glicosilación, pero no se pudo comprobar si el preconditionamiento hipóxico está involucrado con el aumento en la O-GlcNA, por razones experimentales ya mencionadas. Por lo tanto, se debe mejorar el procedimiento de preconditionamiento hipóxico para poder observar si efectivamente este guarda relación con la glicosilación de proteínas.

4.7 Dificultades

Es importante mencionar que el tiempo con el que se contó para realizar la parte experimental del proyecto fue corto, exactamente dos meses (20 de octubre- 23 de diciembre de 2015), en los cuales se presentaron diferentes inconvenientes que acortaron más el tiempo de experimentación.

Inicialmente, el principal inconveniente fue el retraso en la llegada de los reactivos (medios de cultivo principalmente), los cuales llegaron en septiembre de 2015. A partir de esta fecha, se encargó la primera camada de ratas Wistar, la cual se usó para estandarizar el cultivo y hallar el número de células a sembrar por pozo.

Posteriormente, el siguiente inconveniente se presentó con la programación del nacimiento de las ratas, ya que estas no nacían en las fechas previstas, lo cual dificultó el inicio de los experimentos. Adicionalmente, sucedió que una de las camadas no fue viable porque las crías se murieron durante el parto, y en otra camada la madre no alimentó a sus crías por lo que estas estaban muy

deterioradas para usarlas, incluso algunas murieron. Cabe mencionar que por semana se tenía programada una camada, y si no se realizaba el ensayo, era una semana perdida. Además, los apareamientos de las ratas se debían programar con aproximadamente 24 días de anticipación.

En cuanto a la parte experimental fue complicado estandarizar el cultivo de neuronas porque algunos reactivos con los que se contaba no eran los indicados o su concentración debía ajustarse, para lo cual no se contaba con el tiempo, es el caso de las enzimas tripsina y DNAsa I y el arabinósido de citosina. La DNAsa I que se usó no era la indicada para el uso en cultivo celular, ya que no se conocía exactamente su concentración, y fue aportada por un grupo de investigación de la universidad Icesi que trabaja con extracción de RNAs. En el mes de diciembre se contó con la DNAsa que se había pedido antes de iniciar el proyecto, pero está no era del grado de pureza que se requería, por lo cual no se utilizó. La tripsina resultó ser muy agresiva para las células y poco efectiva en la disgregación del tejido, para lo que se sugirió usar papaína, pero no se contaba con este reactivo. El arabinósido de citosina llegó a la universidad en noviembre de 2015 y se efectuó un ensayo con él, pero no se utilizó más porque su concentración debía ajustarse.

Finalmente, durante los ensayos de viabilidad celular bajo diferentes tiempos el suplemento B-27 se acabó y no se contaba disponible en el almacén de la universidad, por lo que se mandó a pedir. Sin embargo, este llegó en diciembre, lo que dificultó seguir con la segunda parte del trabajo. Aun cuando se contaba con este reactivo se retrasó el ensayo de acondicionamiento porque la rata con la que se contaba, atacó a sus crías y no se pudieron usar, por lo que el último experimento de cultivo celular se realizó el día 16 de diciembre de 2015, obteniendo los resultados de viabilidad el 22 de diciembre y los de inmunocitoquímica los días 23 y 24 de diciembre, ya que el microscopio de fluorescencia presentó fallas en la lámpara el día 23 y se tuvo que posponer las medidas hasta el 24.

4.8 Conclusiones

Con este proyecto se logró aportar a la estandarización del modelo *in vitro* de cultivo neuronal primario y acondicionamiento hipóxico, siendo el paso inicial para una posterior caracterización de las proteínas involucradas en los mecanismos de neuroprotección endógena en el cerebro de rata Wistar, lo cual generará mayor conocimiento sobre los posibles tratamientos de la isquemia cerebral.

El tratamiento de acondicionamiento hipóxico y con privación de oxígeno y glucosa (OGD) mostró ser más letal para las células (neuronas y astrocitos) que 120 minutos de hipoxia y el control (0 minutos de hipoxia), lo cual es una prueba de lo complejo que es el mecanismo molecular por el cual el acondicionamiento

podría favorecer la neuroprotección, puesto que en este caso las vías que al parecer se activaron en las neuronas al exponerse a un OGD, son las apoptóticas o necróticas. A pesar de lo dicho anteriormente, se debe resaltar que los resultados obtenidos son muy dependientes de la estandarización de los cultivos y, puede que los resultados obtenidos no reflejen lo que realmente está sucediendo, en relación con los tratamientos empleados.

Los niveles de glicosilación O-GlcNAc están relacionados con el estrés celular, ya que al aplicar el estímulo seleccionado como letal, los niveles de O-GlcNAc son mayores; además, 120 minutos de hipoxia presentaron valores mayores de viabilidad celular, por lo que se observó la glicosilación se activa como respuesta al estrés celular. Sin embargo, cuando se compara la viabilidad celular del preconditionamiento y los niveles de O-GlcNAc ambos son menores que los otros tratamientos, por lo que aún no es posible relacionar este tratamiento de preconditionamiento hipóxico con un aumento en los niveles de glicosilación de proteínas.

4.9 Recomendaciones

Se recomienda realizar ensayos adicionales para finalizar la estandarización del protocolo de cultivo neuronal en la Universidad Icesi, tales como: efectuar una curva de calibración con el arabinósido de citosina que empiece con una concentración baja como 500nm hasta 4 μ M, debido a que la concentración de 5 μ M fue muy agresiva para el cultivo, y así, establecer la concentración adecuada para inhibir el crecimiento de células gliales sin causar daño a las neuronas, porque se debe comparar la viabilidad celular de los cultivos mixtos con cultivos neuronales y cultivos de astrocitos. Además, hacer ensayos con la papaína, ya sea probar diferentes concentraciones y diferentes tiempos de digestión, para determinar si con esta enzima la disgregación del tejido arroja mejores resultados. También, determinar el número de neuronas a sembrar y el porcentaje de confluencia en el comienzo de los experimentos. Sería importante evaluar la viabilidad celular con privación de glucosa únicamente, además de la privación simultánea de oxígeno y glucosa, con el objetivo de estudiar el efecto de la ausencia de este nutriente y compararlo con la privación de oxígeno.

Adicionalmente, se aconseja sonicar los medios de cultivo que van a usarse para el ensayo de viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia, antes de burbujearlos con nitrógeno, para disminuir al máximo la cantidad de oxígeno en el medio, que pueda interferir con los resultados.

Por otra parte, se deben repetir los ensayos de viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia para lograr esclarecer si 30 minutos se comporta como estímulo no letal y 120 minutos como letal, o si es necesario ampliar el margen de tiempo para lograr un evento hipóxico letal que se ajuste al intervalo establecido. Asimismo, cuando se definan estos tiempos y se estandarice completamente el

método de cultivo neuronal, se deben efectuar al menos tres experimentos independientes de acondicionamiento hipóxico para evaluar *in vitro* si este tratamiento funciona como mecanismo de neuroprotección.

Una de las recomendaciones más importantes es brindar una capacitación al personal del bioterio para que logren garantizar los biomodelos en las fechas estipuladas y así cumplir con el cronograma del proyecto. Además, realizar un mayor seguimiento a los pedidos de reactivos que se deben traer del extranjero, porque se observó que los proveedores no cumplen con los tiempos previstos, por lo cual es necesario que se designe la tarea de confirmar la llegada de los insumos a tiempo.

Finalmente, sería importante realizar el ensayo de acondicionamiento *in vivo*, para establecer comparaciones de ambos resultados y acercarse más a la dilucidación del mecanismo molecular involucrado en la neuroprotección y tolerancia isquémica.

4.10 Bibliografía

- Arango D, C., Escobar B, M., Cardona G, G., & Pimienta J, H. (2004). Fisiopatología de la isquemia cerebral focal: aspectos básicos y proyección a la clínica. *Revista de Neurología*, 156-165.
- Badaut, J., Hirt, L., Price, M., de Castro Ribeiro, M., Magistretti, P. J., & Regli, L. (2005). Hypoxia/hypoglycemia preconditioning prevents the loss of functional electrical activity in organotypic slice cultures. *Brain Research*, 117 – 122.
- Barone, F. C., & Kilgore, K. S. (2006). Role of inflammation and cellular stress in brain injury and central nervous system diseases. *Clinical Neuroscience Research*, 329–356.
- Blakeley, J. O., & Llinas, R. H. (2007). Thrombolytic therapy for acute ischemic stroke. *Journal of the Neurological Sciences*, 55-62.
- Bruer, U., Weih, M. K., Isaev, N. K., Meisel, A., Ruscher, K., Bergk, A., . . . Dirnagl, U. (1997). Induction of tolerance in rat cortical neurons: hypoxic preconditioning. *FEBS Letters*, 117-121.
- Butkinaree, C., Park, K., & Hart, G. W. (2010). O-linked β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, 96-106.
- Centro de Innovación Fundación Santa Fe de Bogotá. (2009). *Seguimiento al sector salud en Colombia*. Obtenido de Así Vamos en Salud: <http://www.asivamosensalud.org/inidicadores/estado-de-salud/grafica.ver/68>
- Congreso de Colombia. (1989). *Ley 84 de 1989: Estatuto Nacional de Protección de los Animales*. Bogotá.
- Cruz Culebras, A., García-Pastor, A., Reig, G., Fuentes, B., Simal, P., Méndez-Cendón, J., . . . Masjuan, J. (2010). Neurovascular intervention in the acute phase of cerebral infarction. *Neurología*, 279-286.
- Dirnagl, U., Simon, R. P., & Hallenbeck, J. M. (2003). Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *TRENDS in Neurosciences*, 248-254.
- Doyle, K. P., Simon, R. P., & Stenzel-Poore, M. P. (2008). Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, 310-318.
- Eltzsching, H. K., & Eckle, T. (2011). Ischemia and reperfusion-from mechanism to translation. *Nature Medicine*, 1391-1401.

- Giusti, S., & Fiszer de Plazas, S. (2012). Neuroprotection by Hypoxic Preconditioning Involves Upregulation of Hypoxia-Inducible Factor-1 in a Prenatal Model of Acute Hypoxia. *Journal of Neuroscience Research*, 468-478.
- Goldberg, M. P., & Choi, D. W. (Agosto de 1993). Combined Oxygen and Glucose Deprivation in Cortical Cell Culture: Calcium-dependent and Calcium-independent Mechanisms of Neuronal Injury. *The Journal of Neuroscience*, 3510-3524.
- Haight, T. J., R, N. B., Erus, G., Christos, D., Jacobs, D. R., D'Espositod, M., . . . Launer, L. J. (2015). Vascular risk factors, cerebrovascular reactivity, and the default-mode brain network. *NeuroImage*, 7-16.
- Holzer, M. (2002). Mild Therapeutic Hypothermia to Improve the Neurologic. *The New England of Medicine*, 549-556.
- Hwang, S.-Y. S.-H., Hwang, J.-S., Kim, S.-Y., Shin, J.-A., Oh, E.-S., Oh, S., . . . Han, I.-O. (2010). Glucosamine Exerts a Neuroprotective Effect via Suppression of Inflammation in Rat Brain Ischemia/Reperfusion Injury. *GLIA*, 1881-1892.
- Institute for Laboratory Animal Research. (2010). *Guía Internacional para el cuidado y uso de animales de laboratorio*. Washington, D.C: The National Academies Press.
- Instituto Nacional de Salud. (2013). *Boletín Observatorio Nacional de Salud: Enfermedad cardiovascular principal causa de muerte en Colombia*. Bogotá: Observatorio Nacional de Salud.
- Jensen, R. V., Johnsen, J., Kristiansen, S. B., Zachara, N. E., & Botker, H. E. (2013). Ischemic Preconditioning increases myocardial O-GlcNAc glycosylation. *Scandinavian Cardiovascular Journal*, 168-174.
- Jones, N. M., & Bergeron, M. (2004). Hypoxia- induced ischemic tolerance in neonatal rat brain involves enhanced ERK1/2 signaling. *Journal of Neurochemistry*, 157-167.
- Jones, N. M., & Bergeron, M. (2004). Hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain involves enhanced ERK1/2 signaling. *Journal of Neurochemistry*, 157-167.
- Kaech, S., & Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nature Protocols*, 1(5), 2406-2415.
- Kaneko, T., Yokoyama, K., & Makita, K. (2 de septiembre de 2005). Late preconditioning with isoflurane in cultured rat cortical neurones. *British Journal of Anaesthesia*(95), 662-668.
- Lehotsky, J., Burda, J., Danielisová, V., Gotlieb, M., & Saniová, P. K. (2009). Ischemic Tolerance: The Mechanisms of Neuroprotective Strategy. *The Anatomical Record*, 2002-2012.
- Li, Y., Chopp, M., Powers, C., & Jiang, N. (1997). Apoptosis and protein expression after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Research*, 301-312.
- Lv, P., Fang, W., Geng, X., Li, Y., & Sha, L. (2011). Therapeutic neuroprotective effects of ginkgolide B on cortex and basal ganglia in a rat model of transient focal ischemia. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 235-240.
- Marsh, J. D., & Keyrouz, S. G. (2010). Stroke Prevention and Treatment. *Journal of the American College of Cardiology*, 683-691.
- Meerlo, J. v., Kaspers, G., & Cloos, J. (2011). Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. En I. A. Cree, *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* (págs. 237-245). Springer Science+Business Media.
- Meloni, B. P., Majda, B. T., & Knuckey, N. W. (2001). Establishment of neuronal in vitro models of ischemia in 96-well microtiter strip-plates that result in acute, progressive and delayed neuronal death. *Neuroscience*, 17-26.
- Meloni, B. P., Majda, B. T., & Knuckey, N. W. (2002). Evaluation of preconditioning treatments to protect near-pure cortical neuronal cultures from in vitro ischemia induced acute and delayed neuronal death. *Brain Research*, 69-75.
- Ministerio de Salud. (1993). *Resolución 8430 de 1993*. Bogotá.
- Moretti, A., Ferrari, F., & Villa, R. (2015). Neuroprotection for ischaemic stroke: current status and challenges. *Pharmacology & Therapeutics*, 23-34.
- Muñoz C, M. (1997). *Enfermedad Cerebrovascular*. Bogotá: Asociación Colombiana de Neurología.
- Nunez, J. (2008). Primary Culture of Hippocampal Neurons from P0 Newborn Rats. *Journal of Visualized Experiments*, 895-898.

- OMS. (2015). *Organización Mundial de la Salud*. Recuperado el abril de 2015, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/index2.html>
- Ouyang, Y.-B., Xu, L., Yue, S., Liu, S., & Giffard, R. (2014). Neuroprotection by astrocytes in brain ischemia: Importance of microRNAs. *Neuroscience Letters*, 53-58.
- Pimienta, H. J., & Escobar, M. I. (2008). *Sistema Nervioso* (Tercera edición ed.). Cali, Colombia: Universidad del Valle.
- Pugliese, A. M., Latini, S., Corradetti, R., & Pedata, F. (2003). Brief, repeated, oxygen-glucose deprivation episodes protect neurotransmission from a longer ischemic episode in the in vitro hippocampus: role of adenosine receptors. *British Journal of Pharmacology*, 305-314.
- Rabinovich, G. A. (2004). *Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina* (1ª edición ed.). Buenos Aires, Argentina: Panamericana.
- Shafi, R., Iyer, S., Ellies, L., O'Donnell, N., Marek, K., Chui, D., . . . Marth, J. (2000). The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 5735-5739.
- Sharp, F. R., Ran, R., Lu, A., Tang, Y., Strauss, K. I., Glass, T., . . . Bernaudin, M. (enero de 2004). Hypoxic Preconditioning Protects against Ischemic Brain Injury. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 1, 26-35.
- Silva, F., Zarruk, J., Quintero, C., Arenas, W., Rueda-Clausen, C., Silva, S., & Estupiñán, A. (2006). Enfermedad Cerebrovascular en Colombia. *Revista Colombiana de Cardiología*, 13(2).
- Stetler, A., Leak, R., Gan, Y., Li, P., Zhang, F., Hu, X., . . . Gao, Y. (2014). Preconditioning provides neuroprotection in models of CNS disease: Paradigms and clinical significance. *Progress in Neurobiology*, 58-83.
- Tarazona, B., Ramos, W., Arce, J., Yarinsueca, J., Morales, S., Ronceros, G., . . . Pérez, J. (2010). Etiology and risk factors for a first episode of cerebral ischemia in young adults. *Neurología*, 470-477.
- Tauskela, J. S., Aylsworth, A., Hewitt, M., Brunette, E., & Mealing, G. (2012). Preconditioning induces Tolerance by suppressing glutamate release in neuron culture ischemia models. *Journal of Neurochemistry*, 470-481.
- Wang, G., Zhou, D., Wang, C., Gao, Y., Zhou, Q., Qian, G., & DeCoster, M. (2010). Hypoxic preconditioning suppresses group III secreted phospholipase A2-induced apoptosis via JAK2-STAT3 activation in cortical neurons. *Journal of Neurochemistry*, 1039-1048.
- White, B. C., Sullivan, J. M., DeGracia, D. J., O'Neil, B. J., Neumar, R. W., Grossman, L. I., . . . Krause, G. S. (2000). Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *Journal of the Neurological Sciences*, 1-33.
- WHO. (2015). *World Health Organization*. Obtenido de http://www.who.int/topics/cerebrovascular_accident/en/
- Xie, C., Markesbery, W. R., & Lovell, M. A. (1999). Survival of hippocampal and cortical neurons in a mixture of MEM+ and B27-supplemented neurobasal medium. *Free Radical Biology & Medicine*, 665-672.
- Zachara, N. E. (2009). Detecting the "O-GlcNAc-ome"; Detection, Purification, and Analysis of O-GlcNAc Modified Proteins. En N. H. Packer, & N. G. Karlsson, *Methods in Molecular Biology, Glycomics: Methods and Protocols* (págs. 251-279). Humana Press.
- Zachara, N. E. (2012). Detection and Analysis of (O-linked B-N-Acetylglucosamine)-Modified Proteins. En N. E. Zachara, K. Vosseller, & G. W. Hart, *Current Protocols in Molecular Biology* (págs. 229-254). John Wiley & sons.
- Zemke, D., Smith, J. L., Reeves, M. J., & Majid, A. (2004). Ischemia and Ischemic Tolerance in the Brain: an Overview. *NeuroToxicology*, 895-904.

ANEXOS

CARTA APROBACIÓN COMITÉ DE ÉTICA

Santiago de Cali, 12 de Mayo de 2015
CICUAE 0007/2015

Sr. Juliana Rengifo Gómez
Investigador Principal- Universidad Icesi

ASUNTO: Aprobación proyecto: *“Evaluación de la glicosilación tipo O-GlcNAc como un mecanismo citoprotector en un modelo experimental **in vitro** de preconditionamiento hipóxico”.*

El 10 de Abril del presente año, los miembros de **CIECUAE** de la Universidad Icesi se reunieron y revisaron el proyecto de investigación mencionado, sugiriendo algunos cambios. Luego de recibir el protocolo de investigación con las correcciones sugeridas, dando cumplimiento a la ley 84 de 1989 y a la resolución de rectoría N° 847 (9 de Julio de 2012), aprobaron el proyecto de investigación:

“Evaluación de la glicosilación tipo O-GlcNAc como un mecanismo citoprotector en un modelo experimental **in vitro de preconditionamiento hipóxico”.**

La presente se firma, el día (12), mes (Mayo), del año (2015)

Cordialmente,



Gabriel Jaime Echeverri Junca MD
Presidente -CIECUAE- Universidad Icesi

Imagen 7. Carta de aprobación del comité de ética

ENSAYO MTT

Protocolo para evaluación de viabilidad celular por MTT

Preparación de reactivos:

1. **Solución Stock de MTT (12 mM):** Pesar 2.5 mg de MTT y disolverlos en 500 μ L de PBS estéril. Mezclar empleando un vortex hasta que esté disuelto. Centrifugar a 1000 rpm por 1 min para precipitar material insoluble. Este volumen es suficiente para 50 muestras. *La solución es estable por 4 semanas almacenada a 4°C y protegida de la luz.*
2. **Células:** Si el ensayo se realiza en neuronas, el plato de 96 pozos debe ser recubierto con poli-L-Lisina (1 mg/mL) el día anterior a la siembra de las células.
 - El día anterior al ensayo con MTT, sembrar la cantidad de células (astrocitos o neuronas) establecida para el ensayo en un plato de 96 pozos.
3. **Marcaje de las células:** El día del ensayo, retire el medio de cultivo y reemplácelo por 100 μ L de medio fresco incluyendo los pozos sin células que serán empleados como blanco.
 - Adicionar 10 μ L de **Solución Stock de MTT** a cada pozo incluyendo los pozos" blanco".
 - Incubar a 37°C por 4 h.
 - Una vez transcurridas las 4 h, retirar 85 μ L del medio de cada pozo y adicionar 50 μ L de DMSO a cada pozo. Mezclar bien con la pipeta.
 - Incubar a 37°C por 10 min.
 - Después de este tiempo, mezclar bien y leer la absorbancia a 540nm.

ANEXO 3

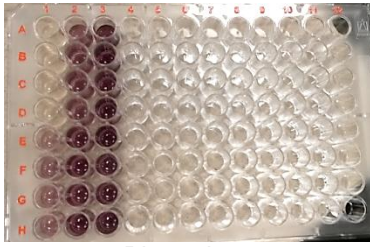


Imagen 8. Placa de 96 pozos con MTT después de incubar por 4 horas y adicionar DMSO.

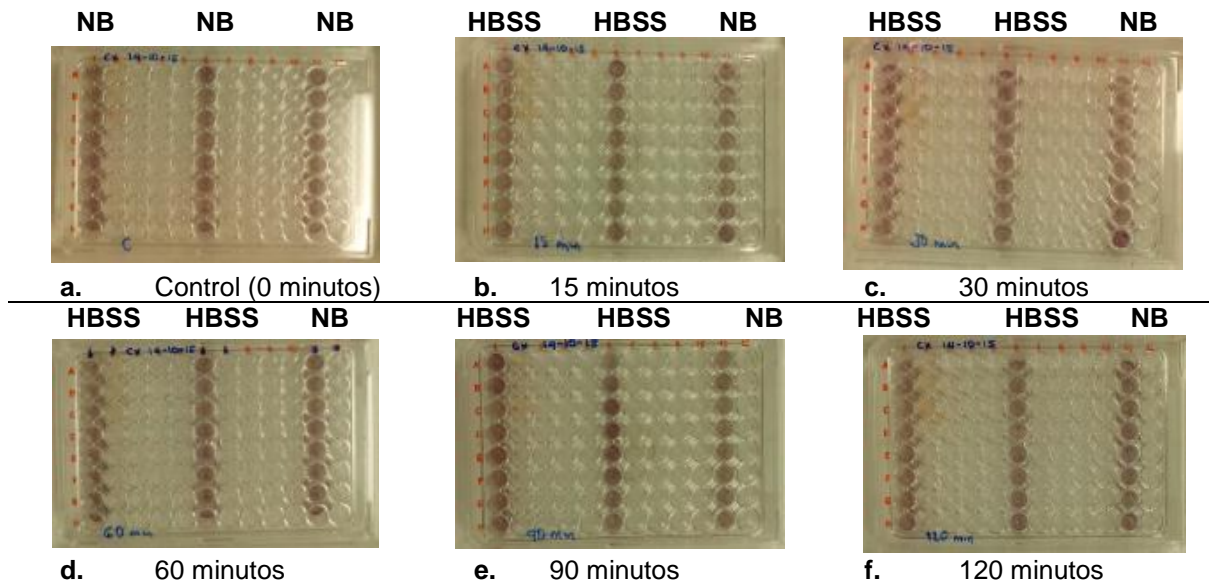


Imagen 9. Esquema general del ensayo de viabilidad con MTT de cultivos neuronales mixtos a diferentes tiempos de hipoxia (NB= medio neurobasal; HBSS= solución salina balanceada).

Tabla 13. Datos de absorbancia a 540nm, obtenidos en el ensayo de MTT, para los cultivos mixtos a diferentes tiempos de hipoxia (NB= medio neurobasal; HBSS= solución salina balanceada). Los datos se muestran con el blanco restado.

0 min	15 min		30 min		60 min		90 min		120 min	
NB	HBSS	NB	HBSS	NB	HBSS	NB	HBSS	NB	HBSS	NB
0,261	0,244	0,261	0,177	0,219	0,315	0,316	0,349	0,209	0,329	0,249
0,278	0,23	0,235	0,187	0,194	0,275	0,309	0,366	0,2	0,302	0,255
0,261	0,211	0,202	0,22	0,197	0,357	0,368	0,236	0,288	0,229	0,186
0,348	0,202	0,18	0,22	0,166	0,314	0,382	0,291	0,247	0,224	0,174
0,269	0,23	0,236	0,223	0,186	0,28	0,312	0,381	0,17	0,251	0,221
0,244	0,182	0,205	0,176	0,203	0,258	0,319	0,197	0,247	0,215	0,208
0,262	0,226	0,238	0,205	0,178	0,261	0,312	0,286	0,204	0,227	0,219
0,282	0,266	0,299	0,227	0,319	0,297	0,326	0,211	0,237	0,226	0,223
0,319	0,231		0,221		0,33		0,187		0,221	
0,254	0,197		0,188		0,347		0,277		0,277	
0,231	0,229		0,189		0,326		0,235		0,291	
0,253	0,201		0,178		0,302		0,177		0,336	
0,245	0,200		0,172		0,298		0,288		0,318	
0,247	0,205		0,182		0,286		0,238		0,273	
0,197	0,188		0,159		0,313		0,226		0,185	
0,268	0,175		0,165		0,306		0,223		0,178	

0,214
0,225
0,184
0,233
0,235
0,235
0,243
0,258

Tabla 14. Datos de absorbancia a 540nm del ensayo de viabilidad celular con MTT para cultivos de astrocitos a diferentes tiempos de hipoxia. Los datos se muestran con el blanco restado.

0min	15 min		30 min		60 min		90 min		120 min	
Medio astrocitos	HBSS	Medio astrocitos	HBSS	Medio astrocitos	HBSS	Medio astrocitos	HBSS	Medio astrocitos	HBSS	Medio astrocitos
0,581	0,395	0,505	0,026	0,322	0,040	0,354	0,053	0,199	0,323	-0,015
0,372	0,300	0,364	0,038	0,404	0,029	0,231	0,309	0,383	0,010	-0,005
0,477	0,288	0,467	0,045	0,307	0,075	0,274	0,093	0,390	0,041	0,155
0,424	0,210	0,370	0,125	0,385	0,072	0,309	0,046	0,313	0,030	0,037
0,518	0,280	0,372	0,062	0,293	0,084	0,311	0,081	0,305	-0,008	-0,032
0,480	0,173	0,415	0,103	0,286	0,044	0,279	0,168	0,386	0,088	0,252
0,524	0,303	0,463	0,057	0,260	0,056	0,277	0,064	0,343	-0,006	-0,049
0,637	0,155	0,465	0,102	0,249	0,040	0,326	0,057	0,342		
0,403										
0,455										
0,389										
0,395										
0,353										
0,436										
0,588										
0,550										

Tabla 15. Datos de absorbancia a 540nm, normalizados contra el tratamiento control (0 min de hipoxia), del ensayo de viabilidad celular con MTT en cultivos mixtos, para evaluar el efecto del suplemento B27 en la viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia (NB=medio neurobasal; SD= desviación estándar; EEM= error estándar de la muestra). Los datos se muestran con el blanco restado.

	0 min		15 min		30 min		60min		90 min		120 min	
	NB (+B27)	NB (-B27)	NB (+B27)	NB (-B27)	NB (+B27)	NB (-B27)	NB (+B27)	NB (-B27)	NB (+B27)	NB (-B27)	NB (+B27)	NB (-B27)
Experimento 1	1,267	0,739	1,037	1,102	0,817	0,785	0,702	1,060	0,955	0,955	0,964	0,785
	0,909	0,450	0,817	0,978	0,785	0,776	0,734	1,097	0,812	0,753	0,918	0,725
	1,221	0,734	0,349	1,189	1,051	0,849	1,097	1,129	0,964	1,065	1,033	0,858
	0,900	0,523	0,413	1,115	0,744	0,982	1,056	1,060	0,932	0,817	1,065	1,010
	1,056	0,491	0,367	1,092	0,955	0,822	1,487	0,955	0,730	0,996	1,138	0,978
	0,702	0,473	0,413	1,102	0,904	0,867	1,079	0,936	0,766	0,812	0,959	0,959
	1,024	0,638	0,945	1,097	0,991	0,936	1,170	0,886	0,812	0,771	1,060	0,964
Experimento 2	0,923	0,840	0,900	0,959	0,647	0,789	1,102	1,198	0,867	0,688	1,014	0,845
	1,054	1,047	0,649	1,358	1,169	1,703	1,736	1,534	1,608	1,236	1,595	1,649
	0,926	0,912	1,588	1,473	1,514	1,473	1,230	1,480	1,878	1,453	1,642	1,507
	0,953	0,912	1,128	1,493	1,372	1,514	1,223	1,358	0,818	1,236	1,622	1,486
	0,899	0,959	1,426	1,365	1,338	1,527	1,135	1,446	1,649	1,392	1,851	1,628
	0,980	0,973	0,980	1,486	1,716	1,561	1,480	1,527	1,459	1,291	1,500	1,149
	1,122	1,068	1,432	1,642	1,514	1,662	1,385	1,750	1,642	1,284	1,547	1,345
Experimento 3	0,966	1,466	1,304	1,128	1,676	1,736	1,419	0,946	1,432	1,392	1,514	1,676
	1,101	1,074	0,872	1,500	1,446	1,831	1,689	1,020	2,000	1,770	1,345	1,777
	1,005	0,840	1,799	0,772	0,776	1,091	1,009	0,877	0,575	1,096	1,091	1,425
	1,055	1,128	1,731	1,146	0,840	1,178	0,836	0,941	0,749	1,037	1,315	1,388
	0,973	1,315	1,717	0,922	0,667	1,169	0,785	1,041	0,836	0,973	1,571	1,347
	1,078	1,301	1,548	0,877	0,685	1,137	0,858	0,941	0,630	1,164	1,502	1,333
	0,936	1,269	1,744	0,991	0,603	1,119	0,461	0,918	0,721	1,119	1,096	1,237

	0,954	1,301	1,630	1,703	0,566	1,146	0,904	0,968	0,680	0,945	1,123	1,082
\bar{x}	100%	93%	113%	120%	104%	121%	112%	114%	107%	110%	129%	123%
SD	0,120	0,301	0,493	0,259	0,369	0,352	0,326	0,256	0,442	0,267	0,281	0,316
EEM	0,025	0,064	0,105	0,055	0,079	0,075	0,070	0,055	0,094	0,057	0,060	0,067

Tabla 16. Datos de absorbancia a 540nm, normalizados contra el tratamiento control (0 min de hipoxia), del ensayo de viabilidad celular con MTT en cultivos mixtos, para evaluar el efecto de la presencia de glucosa en la viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia (HBSS= solución salina balanceada; SD= desviación estándar; EEM= error estándar de la media). Los datos se muestran con el blanco restado.

	0 min		15 min		30 min		60min		90 min		120 min	
	HBSS	HBSS +25mM Glu	HBSS	HBSS +25mM Glu	HBSS	HBSS +25mM Glu	HBSS	HBSS +25mM Glu	HBSS	HBSS +25mM Glu	HBSS	HBSS +25mM Glu
Experimento 1	0,885	1,252	3,939	2,901	4,336	3,313	2,748	4,137	3,542	4,031	0,595	2,519
	0,916	1,115	3,527	3,466	3,145	3,008	2,794	3,298	3,084	3,466	0,137	1,374
	1,313	1,466	3,466	3,679	3,786	3,908	2,443	3,939	3,206	3,954	1,344	2,397
	0,870	1,069	3,359	3,023	3,603	3,344	3,282	4,031	3,084	3,420	0,397	2,031
	0,718	1,771	3,756	3,053	4,427	3,756	3,115	3,542	3,603	3,221	0,611	1,969
	0,809	1,756	3,038	2,931	2,916	3,420	2,748	3,267	3,053	2,672	0,580	1,908
	1,618	1,954	2,427	3,237	3,557	3,527	3,588	4,580	2,641	3,481	0,885	1,710
	0,870	1,954	2,870	3,420	3,160	0,611	3,145	3,725	2,641	3,389	0,534	1,145
Experimento 2	1,032	0,391	0,168	0,056	1,205	0,046	1,220	0,706	1,184	1,174	0,773	0,945
	0,950	1,113	1,128	1,154	1,245	0,117	0,966	1,128	1,139	1,169	0,793	0,991
	1,169	1,017	1,159	1,113	1,164	0,076	0,595	0,925	1,123	1,072	0,666	1,011
	0,828	1,001	1,128	1,057	1,052	0,076	1,032	1,194	1,042	1,118	0,895	1,113
	1,164	1,098	1,128	0,915	1,210	0,066	0,839	1,281	1,078	1,062	0,686	1,108
	0,808	1,159	1,037	1,006	1,255	0,076	0,940	1,194	1,088	1,047	1,128	1,139
	1,037	1,072	0,869	1,169	1,205	0,107	1,027	0,935	1,067	1,189	0,950	1,047
	1,011	1,042	0,417	0,371	1,093	0,086	0,971	1,108	1,123	1,098	0,950	1,052
Experimento 3	1,101	0,983	0,781	0,936	0,889	0,914	0,781	0,817	1,073	0,990	0,875	0,972
	1,058	1,069	0,885	0,691	1,065	0,983	1,083	0,741	0,903	0,821	0,961	1,062
	0,968	0,947	0,803	0,731	1,069	1,001	0,803	0,983	0,925	0,698	0,774	1,134
	0,979	0,968	0,803	0,788	0,921	1,033	0,806	0,716	0,813	0,835	0,900	1,292
	0,965	0,939	0,817	0,777	0,644	1,037	0,867	0,612	0,839	0,846	0,810	1,159
	0,929	1,073	0,482	0,821	0,641	0,972	1,011	0,731	0,741	0,677	0,921	0,950
\bar{x}	100%	119%	173%	170%	198%	143%	167%	198%	177%	188%	78%	136%
SD	0,195	0,373	1,270	1,211	1,314	1,480	1,043	1,452	1,058	1,248	0,253	0,488
EEM	0,042	0,080	0,271	0,258	0,280	0,316	0,222	0,310	0,226	0,266	0,054	0,104

Tabla 17. Datos de absorbancia a 540nm, normalizados contra el tratamiento control (0 min de hipoxia), del ensayo de viabilidad celular con MTT en cultivos mixtos, para evaluar el efecto de factores de crecimiento y nutrientes diferentes a la glucosa en viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia (NB= medio neurobasal; HBSS=solución salina balanceada; SD=desviación estándar; EEM= error estándar de la muestra). Los datos se muestran con el blanco restado.

	0 min		15 min		30 min		60min		90 min		120 min	
	HBSS +25mM Glu	NB (B27)	HBSS +25mM Glu	NB (B27)	HBSS +25mM Glu	NB (B27)	HBSS +25mM Glu	NB (B27)	HBSS +25mM Glu	NB (B27)	HBSS +25mM Glu	NB (B27)
Experimento 1	0,376	1,267	0,872	1,037	0,996	0,817	1,244	0,702	1,212	0,955	0,757	0,964
	0,335	0,909	1,042	0,817	0,904	0,785	0,991	0,734	1,042	0,812	0,413	0,918
	0,441	1,221	1,106	0,349	1,175	1,051	1,184	1,097	1,189	0,964	0,721	1,033
	0,321	0,900	0,909	0,413	1,005	0,744	1,212	1,056	1,028	0,932	0,610	1,065
	0,532	1,056	0,918	0,367	1,129	0,955	1,065	1,487	0,968	0,730	0,592	1,138
	0,528	0,702	0,881	0,413	1,028	0,904	0,982	1,079	0,803	0,766	0,574	0,959
	0,587	1,024	0,973	0,945	1,060	0,991	1,377	1,170	1,046	0,812	0,514	1,060
	0,587	0,923	1,028	0,900	0,184	0,647	1,120	1,102	1,019	0,867	0,344	1,014

Experimento 2	0,520	1,054	0,074	0,649	0,061	1,169	0,939	1,736	1,561	1,608	1,257	1,595
	1,480	0,926	1,534	1,588	0,155	1,514	1,500	1,230	1,554	1,878	1,318	1,642
	1,351	0,953	1,480	1,128	0,101	1,372	1,230	1,223	1,426	0,818	1,345	1,622
	1,331	0,899	1,405	1,426	0,101	1,338	1,588	1,135	1,486	1,649	1,480	1,851
	1,459	0,980	1,216	0,980	0,088	1,716	1,703	1,480	1,412	1,459	1,473	1,500
	1,541	1,122	1,338	1,432	0,101	1,514	1,588	1,385	1,392	1,642	1,514	1,547
	1,426	0,966	1,554	1,304	0,142	1,676	1,243	1,419	1,581	1,432	1,392	1,514
	1,385	1,101	0,493	0,872	0,115	1,446	1,473	1,689	1,459	2,000	1,399	1,345
Experimento 3	1,247	1,005	1,187	1,799	1,160	0,776	1,037	1,009	1,256	0,575	1,233	1,091
	1,356	1,055	0,877	1,731	1,247	0,840	0,941	0,836	1,041	0,749	1,347	1,315
	1,201	0,973	0,927	1,717	1,269	0,667	1,247	0,785	0,886	0,836	1,438	1,571
	1,228	1,078	1,000	1,548	1,311	0,685	0,909	0,858	1,059	0,630	1,639	1,502
	1,192	0,936	0,986	1,744	1,315	0,603	0,776	0,461	1,073	0,721	1,470	1,096
	1,361	0,954	1,041	1,630	1,233	0,566	0,927	0,904	0,858	0,680	1,205	1,123
\bar{x}	99%	100%	104%	113%	72%	104%	119%	112%	120%	107%	109%	129%
SD	0,46	0,12	0,33	0,49	0,53	0,37	0,26	0,33	0,25	0,44	0,43	0,28
EEM	0,097	0,025	0,071	0,105	0,112	0,079	0,055	0,070	0,053	0,094	0,091	0,060

Tabla 18. Datos de absorbancia a 540nm, normalizados contra el tratamiento control (0 min de hipoxia), del ensayo de viabilidad celular con MTT en cultivos mixtos, para evaluar el efecto de la privación simultánea de oxígeno y glucosa en la viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia (HBSS= solución salina balanceada; NB= medio neurobasal; SD= desviación estándar; EEM=error estándar de la muestra). Los datos se muestran con el blanco restado.

	Control	15 min		30 min		60 min		90 min		120 min		
	0 min NB (B27)	HBSS	NB (B27)	HBSS	NB (B27)	HBSS	NB (B27)	HBSS	NB (B27)	HBSS	NB (B27)	
Experimento 1	1,267	1,184	1,037	1,303	0,817	0,826	0,702	1,065	0,955	0,179	0,964	
	0,909	1,060	0,817	0,945	0,785	0,840	0,734	0,927	0,812	0,041	0,918	
	1,221	1,042	0,349	1,138	1,051	0,734	1,097	0,964	0,964	0,404	1,033	
	0,900	1,010	0,413	1,083	0,744	0,987	1,056	0,927	0,932	0,119	1,065	
	1,056	1,129	0,367	1,331	0,955	0,936	1,487	1,083	0,730	0,184	1,138	
	0,702	0,913	0,413	0,877	0,904	0,826	1,079	0,918	0,766	0,174	0,959	
	1,024	0,730	0,945	1,069	0,991	1,079	1,170	0,794	0,812	0,266	1,060	
	0,923	0,863	0,900	0,950	0,647	0,945	1,102	0,794	0,867	0,161	1,014	
Experimento 2	1,054	0,223	0,649	1,601	1,169	1,622	1,736	1,574	1,608	1,027	1,595	
	0,926	1,500	1,588	1,655	1,514	1,284	1,230	1,514	1,878	1,054	1,642	
	0,953	1,541	1,128	1,547	1,372	0,791	1,223	1,493	0,818	0,885	1,622	
	0,899	1,500	1,426	1,399	1,338	1,372	1,135	1,385	1,649	1,189	1,851	
	0,980	1,500	0,980	1,608	1,716	1,115	1,480	1,432	1,459	0,912	1,500	
	1,122	1,378	1,432	1,669	1,514	1,250	1,385	1,446	1,642	1,500	1,547	
	0,966	1,155	1,304	1,601	1,676	1,365	1,419	1,419	1,432	1,264	1,514	
	1,101	0,554	0,872	1,453	1,446	1,291	1,689	1,493	2,000	1,264	1,345	
Experimento 3	1,005	0,991	1,799	1,128	0,776	0,991	1,009	1,361	0,575	1,110	1,091	
	1,055	1,123	1,731	1,352	0,840	1,374	0,836	1,146	0,749	1,219	1,315	
	0,973	1,018	1,717	1,356	0,667	1,018	0,785	1,174	0,836	0,982	1,571	
	1,078	1,018	1,548	1,169	0,685	1,023	0,858	1,032	0,630	1,142	1,502	
	0,936	1,037	1,744	0,817	0,603	1,100	0,461	1,064	0,721	1,027	1,096	
	0,954	0,612	1,630	0,813	0,566	1,283	0,904	0,941	0,680	1,169	1,123	
	\bar{x}	100%	97%	169%	111%	69%	113%	81%	112%	70%	111%	128%
	SD	0,057	0,180	0,090	0,244	0,103	0,160	0,186	0,145	0,092	0,089	0,214
EEM	0,023	0,073	0,037	0,099	0,042	0,065	0,076	0,059	0,037	0,036	0,087	

Tabla 19. Datos de absorbancia a 540nm, normalizados contra el tratamiento control (0 min de hipoxia), del ensayo de viabilidad celular con MTT en cultivos de astrocitos, para evaluar el efecto de la privación simultánea de oxígeno y glucosa en la viabilidad celular bajo diferentes tiempos de hipoxia (HBSS= solución salina balanceada; SD= desviación estándar; EEM=error estándar de la muestra). Los datos se muestran con el blanco restado.

Control 0 min Medio Astrocitos	15 min		30 min		60 min		90 min		120 min		
	HBSS	Medio Astrocitos	HBSS	Medio Astrocitos	HBSS	Medio Astrocitos	HBSS	Medio Astrocitos	HBSS	Medio Astrocitos	
1,106	1,052	1,232	1,194	1,171	0,088	1,113	0,683	0,805	0,443	1,076	
1,052	1,008	1,130	1,309	1,204	0,085	1,194	0,853	1,042	0,633	1,269	
0,985	1,218	1,235	1,069	1,093	0,108	1,123	0,863	0,964	0,041	1,472	
0,836	1,201	1,235	0,981	1,154	0,034	1,177	0,859	0,907	0,000	1,326	
1,045	1,116	1,208	1,340	0,998	0,041	1,215	0,798	0,883	0,376	1,062	
1,035	1,042	1,201	0,629	1,160	0,108	1,194	0,748	0,937	0,944	1,079	
0,941									0,528	1,303	
\bar{x}	100%	111%	121%	109%	113%	8%	117%	80%	92%	42%	123%
SD	0,09	0,09	0,04	0,26	0,07	0,03	0,04	0,07	0,08	0,33	0,16
EEM	0,034	0,036	0,016	0,107	0,030	0,013	0,017	0,030	0,033	0,125	0,060

Tabla 20. Datos de absorbancia a 540nm, normalizados contra el tratamiento control negativo (sin hipoxia), del ensayo de viabilidad celular con MTT en cultivos mixtos, para evaluar el efecto del acondicionamiento hipóxico en la viabilidad celular (NB= medio neurobasal; SD= desviación estándar; EEM= error estándar de la muestra). Los datos se muestran con el blanco restado.

Control (0 min hipoxia) NB	Control (0 min hipoxia) HBSS	Precondicionamiento + 120 min hipoxia HBSS	precondicionamiento +120 min hipoxia NB	120 min hipoxia HBSS	120 min hipoxia NB	
0,820	0,785	0,488		0,762	0,832	
0,887	1,082	0,617	0,648	1,020	0,691	
1,168	0,977	0,531	0,699	0,984	0,875	
0,961	1,023	0,590	0,523	0,859	0,930	
0,852	0,914	0,527	0,738	0,762	0,699	
1,039	0,934	0,660	0,734	0,809	0,973	
1,035	0,867	0,309	0,762	0,859	0,906	
1,238	1,230	0,723	1,180	0,867	0,988	
\bar{x}	100%	98%	56%	74%	87%	86%
SD	0,149	0,137	0,126	0,195	0,095	0,114
EEM	0,053	0,049	0,044	0,069	0,033	0,040

Tabla 21. Datos de intensidad de fluorescencia, normalizados contra el tratamiento control (0 min de hipoxia), en cultivos mixtos, para evaluar el efecto del acondicionamiento hipóxico en los niveles de O- GlnAcilación (NB= medio neurobasal; HBSS= solución salina balanceada; SD= desviación estándar; EEM= error estándar de la muestra).

Control (0 min hipoxia) NB	Precondicionamiento + 120 min hipoxia HBSS	Precondicionamiento +120 min NB	120 min hipoxia HBSS	120 min hipoxia NB	
0,695	0,541	0,836	1,431	1,097	
0,819	0,738	1,306	1,497	1,365	
0,758	0,635	1,140	1,271	1,687	
1,220	0,644	0,894	1,108	1,914	
0,848					
1,660					
\bar{x}	100%	64%	104%	133%	152%
SD	0,372	0,081	0,219	0,174	0,359
EEM	0,152	0,040	0,109	0,087	0,179