

**EFFECTO DEL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO CEREBRAL SOBRE LA
EXPRESIÓN Y LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA AKT**

ANA MARÍA CAICEDO IDROBO

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
FARMACÉUTICAS
QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI, VALLE DEL CAUCA
2016**

**EFFECTO DEL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO CEREBRAL SOBRE LA
EXPRESIÓN Y LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA AKT**

ANA MARÍA CAICEDO IDROBO

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

Tutora

Juliana Rengifo Gómez

Doctora en fisiología celular y molecular

Cotutor

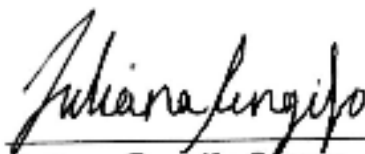
Carlos Fernando Cardozo

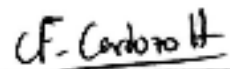
Ingeniero Eléctrico y Biólogo, Estudiante de doctorado

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
FARMACÉUTICAS
QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI, VALLE DEL CAUCA
2016**

APROBADO POR:


Álvaro Barrera Ocampo
Evaluador


Juliana Rengifo Gómez
Directora del Proyecto


Carlos Fernando Cardozo
Co-Director del proyecto

Santiago de Cali, 01 julio de 2016

Scanned by CamScanner

AGRADECIMIENTOS

Gracias primero que todo a Dios quién ha sido mi guía y fortaleza. Deseo también agradecer a toda mi familia, especialmente a mis padres, quienes siempre han creído en mí, y su soporte, sostén y amor han sido indispensables para salir adelante y culminar esta etapa de mi vida. Gracias a mi tutora, la profesora Juliana Rengifo, quien con su dedicación, paciencia, apoyo y compromiso permitieron que saliera este proyecto adelante. Al profesor Carlos Fernando Cardozo, mi co- tutor, gracias por su entrega, disponibilidad y soporte, que se han podido observar a lo largo de todo este semestre. Gracias a Elisa Viveros, quien estuvo en cada etapa del proyecto y con su dedicación y apoyo incondicional, logramos obtener los resultados y conocimientos deseados. Gracias a la Universidad Icesi por contar por todos los instrumentos necesarios para darme una formación académica integral, con todas las bases y principios necesarios para afrontar el ámbito laboral. Gracias a mis compañeros, profesores y a todos quienes han contribuido para que esta etapa sea inolvidable.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO	13
2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
2.2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	14
2.2.1. Irrigación cerebral.....	14
2.2.2. Enfermedad cerebrovascular	15
2.2.3. Isquemia cerebral.....	16
2.2.4. Precondicionamiento isquémico.....	18
2.2.5. Proteína Akt	20
2.2.6. Precondicionamiento isquémico y la proteína Akt.....	23
2.2.7. O-GlcNAcilación	24
2.3. OBJETIVOS.....	27
2.3.1. Objetivo general	27
2.3.2. Objetivos específicos	27
2.4. METODOLOGÍA UTILIZADA.....	28
2.4.1. Biomodelo de estudio.....	28
2.4.2. Tratamiento precondicionante	28
2.4.3. Isquemia cerebral focal	29
2.4.4. Western Blot.....	30
2.4.5. Densitometría y Análisis estadístico.....	35
2.4.6. Matriz de marco lógico	36
2.5. RESULTADOS	38
2.6. DISCUSIÓN.....	43
2.7. CONCLUSIONES	48
2.8. RECOMENDACIONES.....	48
3. BIBLIOGRAFÍA.....	49
4. ANEXOS.....	55

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Diluciones de BSA 0,125 para la realización de la curva de calibración ..	31
Tabla 2 Cantidad de muestra, buffer de carga y agua para servir 20 μ L en cada pozo	32
Tabla 3. Componentes con sus respectivas cantidades, necesarios para hacer el gel de poliacrilamida	33
Tabla 4 Distribución de los grupos experimentales en el gel de poliacrilamida	33
Tabla 5. Anticuerpos primarios que se utilizaron en el Western Blot.....	35
Tabla 6 Matriz de marco lógico.....	36
Tabla 7. Resultados de la prueba t-Student para comparar las medias de los datos correspondientes a la evaluación neurológica de las ratas antes del sacrificio utilizando el test de García.....	59
Tabla 8. Resultados de la prueba t-Student para comparar las medias de los datos correspondientes a la expresión de la proteína Akt-total.	63
Tabla 9. Resultados de la prueba t-Student para comparar las medias de los datos correspondientes a la fosforilación de la proteína Akt en el residuo de Ser 473.....	66
Tabla 10. Resultados de la prueba Mann Whitney para comparar las medias de los datos correspondientes a la fosforilación de la proteína Akt en el residuo de Thr 308	68
Tabla 11. Resultados de la prueba t-Student para comparar las medias de los datos correspondientes a la O-GlcNAcilación total evaluadas con el anticuerpo RL2.....	71

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Tamaño del infarto en el grupo de ratas control, las cuales fueron sometidas a ictus isquémico VS en el grupo de ratas isquémicas con tratamiento preconditionante previo a la isquemia (Resultado aún no publicado del laboratorio de fisiología animal celular de la Universidad Icesi).....	20
Gráfica 2. Curva de calibración de las diferentes diluciones del estándar de BSA con el ensayo Bio-Rad a 595nm	31
Gráfica 3. Resultados promedio de la evaluación neurológica de las ratas aplicando el test de García antes del sacrificio. Donde ISQ=Grupo A y PISQ=Grupo B	57
Gráfica 4. Prueba de normalidad de los datos comportamentales al realizar la evaluación neurológica de las ratas obtenidos a partir del Test de García antes del sacrificio	58
Gráfica 5. Prueba de igualdad de las varianzas de los datos comportamentales al realizar la evaluación neurológica de las ratas obtenidos a partir del Test de García antes del sacrificio	58
Gráfica 6. Prueba de normalidad de los datos de la expresión de la proteína Akt-total	61
Gráfica 7. Prueba de igualdad de las varianzas de los datos de la expresión de la proteína Akt-total.....	61
Gráfica 8. Principales efectos del tratamiento preconditionante sobre la expresión de la proteína Akt-total.....	62
Gráfica 9. Prueba normalidad de los datos de la proteína Akt fosforilada en el residuo de Serina 473.....	64
Gráfica 10. Prueba de igualdad de las varianzas de los datos de la proteína Akt fosforilada en el residuo de Ser 473	64
Gráfica 11. Principales efectos del tratamiento preconditionante sobre la fosforilación de la proteína Akt en el residuo de Ser 473.....	65
Gráfica 12. Prueba normalidad de los datos de la proteína Akt fosforilada en el residuo de Thr 308.....	67
Gráfica 13. Prueba homogeneidad de las varianzas de los datos de la proteína Akt fosforilada en el residuo de Thr 308.....	67
Gráfica 14. Principales efectos del tratamiento preconditionante sobre la fosforilación de la proteína Akt en el residuo de Thr 308	68
Gráfica 15. Prueba normalidad de los datos de la O-GlcNAcilación total evaluada con el anticuerpo RL2	69
Gráfica 16. Prueba homogeneidad de las varianzas de los datos de la O-GlcNAcilación total evaluada con el anticuerpo RL2.....	69
Gráfica 17. Principales efectos del tratamiento preconditionante sobre la O-GlcNAcilación total evaluada con el anticuerpo RL2.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistema arterial del cerebro humano. Polígono de Willis (Auriel, 2009).	15
Figura 2. Esquema de la cascada isquemática (Sosa, y otros, 2008).....	17
Figura 3. Áreas del infarto. Área central de la lesión y región de penumbra (Sánchez-Chávez, 1999)	18
Figura 4. Estructura de la proteína Akt. Obtenida de PDB (1GZO).....	21
Figura 5. Vía de síntesis de las hexosaminas. Ciclo de O-GlcNAcilación (Issad, 2010).....	25
Figura 6. Cuatro relaciones distintas entre la O-GlcNAcilación y la fosforilación en los sustratos de distintas proteínas (Zeldan & Hart, 2010)	26
Figura 7. A. Resultados de la expresión de la proteína Akt total detectados por Western Blot. B. Cuantificación de la expresión de la proteína Akt total en la corteza cerebral del grupo control de ratas isquémicas Vs. del grupo de ratas isquémicas que recibió tratamiento preconditionante.	39
Figura 8. A. Resultados de la fosforilación de la proteína Akt en el residuo de Serina 473 detectados por el Western Blot. B. Cuantificación de la fosforilación de la proteína Akt en el residuo de Serina 473 en la corteza cerebral del grupo control de ratas isquémicas Vs. del grupo de ratas isquémicas que recibió tratamiento preconditionante.....	40
Figura 9. A. Resultados de la fosforilación de la proteína Akt en el residuo de Treonina 308 detectados por Western Blot. B. Cuantificación de la fosforilación de la proteína Akt en el residuo de Treonina 308 en la corteza cerebral del grupo control de ratas isquémicas Vs. Del grupo de ratas isquémicas que recibió tratamiento preconditionante.....	41
Figura 10. A. Resultados de la O-GlcNAcilación por medio del anticuerpo RL2 detectados por Western Blot. B. Niveles de O-GlcNAcilación en las proteínas de la corteza cerebral del grupo control de ratas isquémicas Vs. del grupo de ratas isquémicas sometidas a tratamiento preconditionante.....	42

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Aprobación del comité de ética CIECUAE	55
Anexo 2. Parámetros para la evaluación neurológica de las ratas pre y post- isquémica utilizando el test de García.	56
Anexo 3. Muestra de cálculos realizados	60
Anexo 4. Resultados de la prueba de normalidad, homogeneidad de las varianzas y de efectos principales para la evaluación de la expresión total de la proteína Akt en la corteza cerebral de las ratas objeto de estudio	61
Anexo 5. Resultados de la prueba de normalidad, homogeneidad de las varianzas y de efectos principales para evaluar la fosforilación de la proteína Akt en el residuo de Ser 473	64
Anexo 6. Resultados de la prueba de normalidad, homogeneidad de las varianzas y de efectos principales de la proteína Akt fosforilada en el residuo de Thr 308 ...	67
Anexo 7. Resultados de la prueba de normalidad, homogeneidad de las varianzas y de efectos principales de la O-GlcNAcilación total evaluada con el anticuerpo RL2	69
Anexo 8. Aspectos evaluados por el test de 28 puntos realizado por el laboratorio de neurociencias funcional y comportamental de la Universidad de Stanford	72

RESUMEN

La isquemia cerebral, junto con el ictus hemorrágico, es una de las dos categorías en las cuales se clasifican las enfermedades cerebrovasculares. Esta consiste en la obstrucción de un vaso sanguíneo, lo cual impide el flujo de sangre focal o global hacia el cerebro. Al disminuir la perfusión sanguínea, el cerebro entrará en un estado de hipoxia, el cual concluirá en la muerte celular. Actualmente el único tratamiento para la isquemia cerebral consiste en una terapia farmacológica utilizando fibrinolíticos, esto ha causado que se unan esfuerzos para encontrar nuevos mecanismos para su prevención y tratamiento. Dentro de estos esfuerzos se encuentra el estudio de los mecanismos por los cuales el preconditionamiento isquémico confiere citoprotección a las células. Éste consiste en la interrupción del flujo sanguíneo a un tejido en un corto periodo de tiempo, lo cual activa vías de neuroprotección ante episodios posteriores de isquemia.

Se ha encontrado que la proteína Akt está involucrada en la cascada de señalización que promueve la supervivencia celular al inhibir factores pro-apoptóticos y activar genes anti-apoptóticos. Es por esto, que el presente proyecto tuvo como objetivo evaluar, por medio de la técnica Western Blot, los niveles de expresión total y de fosforilación de la proteína Akt en la corteza cerebral de ratas Wistar sometidas a preconditionamiento isquémico cerebral, estableciendo si se presentaban diferencias significativas en estos niveles, con respecto a las ratas que no se expusieron a ningún tratamiento preconditionante.

Se encontró que el grupo de ratas sometidas a preconditionamiento isquémico presentaron un mayor nivel de fosforilación, tanto en el residuo de treonina 308 como en el de serina 473, que el grupo de ratas que solo tuvieron isquemia cerebral. También se halló que la expresión total de la proteína Akt no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos evaluados. Por otro lado, en este proyecto también se realizó la evaluación del nivel de O-GlcNAcilación, utilizando el anticuerpo RL2 y se encontró un mayor nivel de este tipo de glicosilación en el grupo de ratas sometidas a preconditionamiento isquémico.

Los resultados obtenidos sugieren que la vía de señalización de la proteína Akt se activa como mecanismo de neuroprotección ante episodios posteriores de isquemia cuando se da el preconditionamiento isquémico. Además de esto, también sugieren que la O-GlcNAcilación puede estar involucrada en el aumento de la activación de la proteína Akt, ya sea inhibiendo los proteína encargadas de su activación, o inhibiendo las proteínas que inhiben la fosforilación de la proteína quinasa B. A partir de los resultados y de las conclusiones obtenidas, futuras investigaciones podrían evaluar el nivel de expresión de la proteína GSK-3 β cuando hay preconditionamiento isquémico, quien es una proteína activada por Akt.

Palabras claves: Accidente cerebrovascular, Isquemia cerebral, preconditionamiento isquémico, proteína Akt, neuroprotección, O-GlcNAcilación.

ABSTRACT

The cerebral ischemia is one of the categories that are classified cerebrovascular diseases. This consist in the obstruction of a blood vessel, which prevents the flow of blood to focal or global brain. By decreasing the blood perfusion, the brain go into a state of hypoxia, which end in cell death. Currently, the only treatment for cerebral ischemia consist in use fibrinolytic therapy, this has caused join efforts to find new mechanisms to prevention and treatment. Into these mechanisms is ischemic preconditioning which involves the interruption of blood flow to a tissue in a short time, activating pathways for neuroprotection against subsequent ischemic episodes.

It had found that the Akt protein is involved in the signaling cascade that promotes cell survival by inhibiting pro-apoptotic factors and activating anti-apoptotic genes. It is for this reason that this project evaluated, by the Western Blot technique, the levels of total expression and phosphorylation of Akt protein in the cerebral cortex from Wistar rats subjected to cerebral ischemic preconditioning, establishing if present significant difference in these levels, compared to rats that were not exposed to any preconditioning treatment.

Is was found that the group of rats subjected to ischemic preconditioning had a higher level of phosphorylation in both residues, Serine 473 and Threonine 308, that the group of rats that had only cerebral ischemia. In addition, it had found that the total Akt protein expression did not show differences statistically significant between the two groups evaluated. On the other hand, this project also evaluated the level of O-GlcNAcylation, using the antibody RL2, and a higher level of this kind of glycosylation found in the group of rats subjected to ischemic preconditioning.

The results suggest that the signaling pathway of Akt protein is activate as a mechanism of neuroprotection against further episodes of ischemia when ischemic preconditioning occurs. Besides this, also the results suggest that O-GlcNAcylation may be involved in the increased on Akt protein, either by inhibiting the protein responsible for activation or inhibiting proteins that inhibit the phosphorylation of Kinase B protein (Akt). From the results and the conclusions, future research could assess the level of expression of GSK-3 β protein when the rats are subjected ischemic preconditioning, who is a protein activated by Akt.

Key Words: Stroke, cerebral ischemia, ischemic preconditioning, Akt protein, neuroprotection, O-GlcNAcylation.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cerebrovasculares corresponden a la segunda causa de muerte en el continente americano, y consisten en una afección de la función cerebral ocasionada por problemas vasculares (Organización Panamericana de la Salud, 2015). Las enfermedades cerebrovasculares se clasifican en hemorrágicas o isquémicas; en donde las primeras se relacionan con una lesión en los vasos sanguíneos y la afección isquémica consiste en la obstrucción de estos.

De los dos tipos de accidente cerebrovascular, el que predomina es el isquémico, en el cual, como ya se mencionó, ocurre una obstrucción de los vasos sanguíneos impidiendo el flujo de sangre focal o global al cerebro. Al disminuir el flujo sanguíneo, el cerebro entra en un estado de hipoxia y déficit de glucosa, el cual va a concluir en la muerte celular. Actualmente, para el tratamiento de los eventos isquémicos se utiliza terapia farmacológica en la cual, los medicamentos usados pueden provocar algunos efectos adversos e interacciones y no buscan la supervivencia neuronal. Este inconveniente es lo que ha promovido que las investigaciones en torno a posibles fuentes de prevención y tratamiento de la isquemia cerebral sean establecidas (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, 2016).

Una posible estrategia de prevención estudiada es el preconditionamiento isquémico, el cual es reconocido como una vía de neuroprotección ante episodios posteriores de isquemia cerebral. Este consiste en la interrupción del flujo sanguíneo a un tejido en un corto periodo de tiempo (Iliodromitis, Lazou, & Kremastinos, 2007) . Es por esto que se han venido estudiando los posibles mecanismos moleculares implicados en este proceso de tal forma que se puedan establecer estrategias farmacológicas en el tratamiento y prevención de la isquemia cerebral.

Una de las cascadas moleculares que está implicada en la supervivencia celular, se encuentra mediada por la proteína Akt. Se ha encontrado que esta proteína promueve la expresión de los “genes de expresión inmediata”, provocando así la inactivación de factores pro-apoptóticos y la activación de algunos genes anti-apoptóticos como NF-KB, lo cual conlleva a la supervivencia neuronal (Pinzón, Serrano, & Sanabria, 2015)

Debido a lo anterior, el presente proyecto buscó evaluar, por medio de la técnica Western Blot, los niveles de expresión total y de fosforilación de la proteína Akt en la corteza cerebral de ratas Wistar que fueron sometidas a preconditionamiento isquémico. Esto se hizo con el fin de establecer si se presentaban diferencias significativas en estos niveles, con respecto a las ratas que no fueron sometidas a ningún tratamiento preconditionante. Cuyo propósito era el de ampliar el conocimiento sobre las vías moleculares que se activan como vía de protección celular en el preconditionamiento isquémico, estableciendo una relación entre la proteína Akt y la protección neuronal.

2. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO

2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, OMS, los accidentes cerebrovasculares junto con los ataques al corazón, son fenómenos que consisten en el impedimento del correcto flujo sanguíneo al corazón o al cerebro (World Health Organization, 2015); por otro lado, la enfermedad cerebrovascular (ECV) la define como: “el rápido desarrollo de signos focales (o globales) con compromiso de la función cerebral, y síntomas de 24 horas o más, o que lleven a la muerte sin otra causa que el origen vascular” (World Health Organization, 1989).

Teniendo en cuenta lo anterior, la OMS reportó que en el año 2012, 17,5 millones de personas fallecieron a causa de las enfermedades cardiovasculares (dentro de las cuales se encuentran las ECV) y que más del 75% de estas muertes se presentaron en países subdesarrollados y con bajos ingresos económicos (World Health Organization, 2015). Además de esto, la OMS estimó que el número de muertes que ocurrirán en el mundo en el año 2030, causado por las enfermedades cardiovasculares, aumentará a 22.245.272 de personas (World Health Organization, 2015).

Por su parte, la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en el Informe del Sistema Regional de Mortalidad del año 2012, afirmó que las enfermedades cerebrovasculares correspondieron a la segunda causa de muerte en las Américas (7,08%), superada sólo por las enfermedades isquémicas del corazón (9,27%) (Organización Panamericana de la Salud, 2015). Y Colombia, entra en estas estadísticas ya que, aunque la expectativa de vida ha aumentado, también han incrementado las enfermedades relacionadas con la edad, dentro de las que se incluyen las ECV (Asociación Colombiana de Neurología, 2015).

Es por esto, que al ser una de las principales causas de muerte en todo el mundo, su atención clínica, tratamiento y prevención implican un alto costo económico al sistema de salud; este problema se agrava cuando la ECV afecta a personas de escasos recursos, las cuales tienen mayor incidencia de esta patología. Esto implica que a nivel mundial se estén uniendo esfuerzos con el objetivo de prevenir y encontrar nuevos tratamientos frente a los incidentes cerebrovasculares

Una alternativa que está siendo estudiada en la actualidad es el preconditionamiento isquémico. Este se reconoce como una vía de neuroprotección ante episodios posteriores de isquemia cerebral y consiste en interrumpir el flujo sanguíneo a un tejido en un corto periodo de tiempo; es por esto que se han venido estudiando los mecanismos moleculares implicados en este proceso de tal forma que se puedan establecer estrategias farmacológicas en el tratamiento y prevención de la isquemia cerebral.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, este proyecto buscaba ampliar el conocimiento sobre el mecanismo molecular mediante el cual el preconditionamiento isquémico produce neuroprotección frente a futuros episodios de isquemia (ECV), al identificar la relación entre el preconditionamiento isquémico y la expresión y fosforilación de la proteína quinasa B (Akt). Esto se realizó con el fin facilitar que en un futuro, otros proyectos puedan encontrar un posible tratamiento para disminuir el impacto negativo de los incidentes isquémicos.

2.2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

2.2.1. Irrigación cerebral

El sistema nervioso central está compuesto por el cerebro, la médula espinal y las células cerebrales (neuronas y glías). Dentro de estos, el primero, tiene una masa cerebral de 1,5 kg con un flujo sanguíneo alrededor de 750mL/min, lo que es equivalente entre el 15% y 20% del gasto cardiaco (Fábregas & Valero, 2009). La irrigación sanguínea al cerebro ocurre por medio de dos arterias carótidas internas y dos arterias vertebrales (Auriel, 2009)

- Carótidas internas: Encargadas de la circulación anterior del cerebro, estas arterias provienen de la arteria carótida común e ingresan a la cavidad craneal por el agujero carotideo. En el extremo medial del surco cerebral lateral, esta arteria se ramifica en: Arteria cerebral anterior, arteria cerebral media y arteria comunicante posterior (Arana Chacón, Uribe Uribe, Muñoz Berrio, Salinas Durán, & Celis Mejía, s.f.) (Auriel, 2009)
- Arterias vertebrales: Encargadas de la circulación posterior del cerebro, estas provienen de la arteria subclavia y convergen para formar la arteria basilar, la cual termina bifurcando en las arterias posteriores (Snell, 2007)

Estas cuatro arterias se anastomosan en la superficie inferior del encéfalo, formando el polígono de Willis (Figura 1). Este polígono es un mecanismo anatómico con el que cuenta el cerebro para protegerse frente a la isquemia ya que en el caso de que ocurra la obstrucción de alguna de las arterias mencionadas antes, permite la redistribución del aporte sanguíneo a la parte del cerebro afectada (Torregrosa, Salom, Jover-Mengual, & Alborch, 2007).

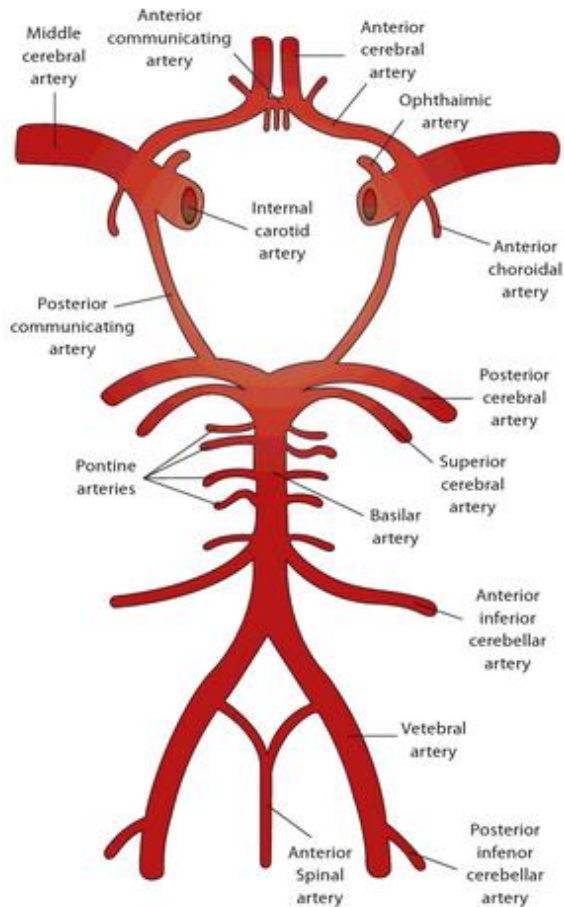


Figura 1. Sistema arterial del cerebro humano. Polígono de Willis (Auriel, 2009)

2.2.2. Enfermedad cerebrovascular

De acuerdo con la Organización Mundial de la salud, la enfermedad cerebrovascular consiste en: “el rápido desarrollo de signos focales (o globales) con compromiso de la función cerebral, y síntomas de 24 horas o más, o que lleven a la muerte sin otra causa que el origen vascular” (World Health Organization, 1989).

Las enfermedades cerebrovasculares pueden clasificarse en dos clases principales: accidente de tipo isquémico y accidente de tipo hemorrágico. La forma predominante (75% a 85%) de la enfermedad cerebrovascular la constituye el ictus isquémico, seguido del ictus hemorrágico que representa un 20% y en menor medida la hemorragia subaracnoidea (5%-8 %) (Fernandez Travieso, 2014).

En el caso de la enfermedad cerebrovascular isquémica, consiste en la obstrucción del flujo sanguíneo focal o global en el cerebro. Este tipo de ECV se ocasiona por la oclusión de la vasculatura, lo cual reduce el aporte de oxígeno y glucosa al

cerebro, interrumpiendo la actividad metabólica del área afectada (Fernandez Travieso, 2014).

La obstrucción del flujo sanguíneo puede ser provocada por distintos motivos, como coágulos de sangre que se formaron en un lugar lejano al cerebro y se trasladaron por medio de las arterias cerebrales o coágulos formados directamente sobre una arteria cerebral; por otro lado, la obstrucción de los vasos cerebrales también podría ser provocada por placas de aterosclerosis que causan estenosis en las arterias. El ictus isquémico puede dividirse en: isquemia cerebral transitoria (ICT), infarto cerebral por trombosis, infarto cerebral por embolismo y enfermedad lacunar (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, 2016).

Cuando se habla de ECV hemorrágica, se está haciendo referencia a los derrames cerebrales ocasionados por la lesión de los vasos sanguíneos del cerebro. Generalmente el ictus hemorrágico es causado por la presencia de aneurismas sobre los vasos sanguíneos, los cuales son una zona débil en la pared arterial, la cual puede romperse y provocar la hemorragia. Esta puede dividirse en: hemorragia intracerebral y hemorragia subaracnoidea (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, 2016)

2.2.3. Isquemia cerebral

Como se mencionó antes, la isquemia cerebral que consiste en la interrupción o disminución del flujo sanguíneo cerebral en un territorio vascular determinado, lo cual afecta la disponibilidad de oxígeno y glucosa necesarios para el metabolismo energético celular, incapacitando así a las células para mantener su potencial de membrana en reposo, y a las neuronas para conservar sus propiedades de membrana eléctricamente excitable (Sosa, y otros, 2008). Esta disminución del flujo sanguíneo al cerebro causa un daño neuronal que induce a la muerte celular por vías apoptóticas (Tanaka, y otros, 2004)

En la medida en que las condiciones de isquemia prevalecen, las consecuencias moleculares son más drásticas, llevándose a cabo la cascada isquemática (Figura 2). Esta cascada empieza con una disminución en la producción de energía, una sobre estimulación de los receptores de glutamato, la liberación indiscriminada de neurotransmisores y daño de las bombas iónicas; por otro lado culmina con la entrada de iones de calcio y de sodio al citoplasma, edema celular y vascular, así como la activación de hidrolasas lisosomales que conducen a la muerte celular aguda en el foco de la isquemia, caracterizado por necrosis tisular (Sosa, y otros, 2008) (Zarco, Gonzáles, & Casas, 2008).

La receptación del glutamato es un proceso dependiente de la energía por lo cual, en condiciones isquémicas, este se va a acumular en el espacio extracelular, lo que causa la estimulación de los receptores NMDA y AMPA, lo que a su vez provoca excitotoxicidad. Por otro lado, se va a inducir el ingreso de sodio, agua, calcio y cloro a las células. La entrada de calcio causará que se activen fosfolipasas que van a

destruir la membrana celular, aumentando la cantidad de ácidos grasos libres y de radicales libres citotóxicos. Por su parte, el ingreso de sodio y cloro al citoplasma promueve la difusión pasiva de agua a la célula, culminando en edema citotóxico. Todo lo mencionado anteriormente culmina con la apoptosis celular (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, 2016) (Sosa, y otros, 2008) (Zarco, Gonzáles, & Casas, 2008).

En la Figura 2 se observan los procesos que ocurren cuando sucede un evento isquémico, en donde la etapa final es el proceso apoptótico.

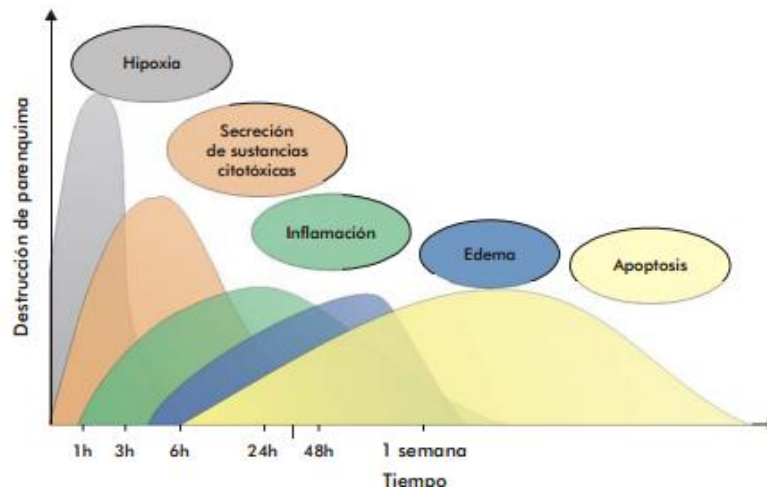


Figura 2. Esquema de la cascada isquémica (Sosa, y otros, 2008)

Una vez ocurrida la lesión isquémica, pueden diferenciarse dos áreas principales: una central, donde ocurren los daños irreparables ocasionados por el infarto; y periférica a este área, se encuentra la zona de penumbra en la cual las células se encuentran afectadas, pero pueden recuperarse (Torregrosa, Salom, Jover-Mengual, & Alborch, 2007).

La penumbra isquémica, a diferencia de la zona central del infarto, está caracterizada por tener un tamaño mucho mayor que tiende a disminuir a medida que pasa el tiempo, además de esto tiene una buena respuesta al tratamiento clínico. Aunque en esta zona se presenta una lesión funcional, es potencialmente recuperable (Sánchez-Chávez, 1999).

En la Figura 3, se pueden observar las regiones características que se forman cuando ocurre la isquemia. Hay una región central y una región de penumbra, que en la imagen está dividida en 2. La zona a, corresponde a una zona que no está exenta de sufrir necrosis ya que puede extenderse la zona central, y la zona b, que presenta daño funcional pero tiene la capacidad de recuperarse con el tiempo (oligoemia benigna) (Torregrosa, Salom, Jover-Mengual, & Alborch, 2007).

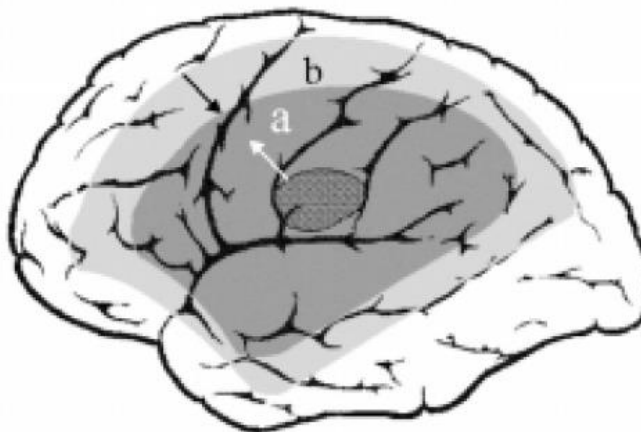


Figura 3. Áreas del infarto. Área central de la lesión y región de penumbra (Sánchez-Chávez, 1999)

Existen varios factores que van a determinar si la zona de penumbra evoluciona negativamente hacia el infarto o si sobrevive. Dentro de estos factores se pueden destacar el grado de circulación colateral de la zona, la ubicación de la lesión isquémica y de la obstrucción arterial (Torregrosa, Salom, Jover-Mengual, & Alborch, 2007). Esta variabilidad es lo que hace de la zona de penumbra un blanco para investigaciones con el fin de que esta región recupere su funcionalidad.

La variación interpersonal en la duración de la penumbra isquémica, causa que el tiempo en el cual cada persona pueda recibir una intervención terapéutica sea distinto. A pesar de que se sabe que la penumbra isquémica es un blanco potencial para disminuir el impacto negativo de la isquemia, los fármacos estudiados hasta el momento no han sido muy eficientes para corregir el daño neuronal. Esto puede deberse a que existe un bajo flujo sanguíneo que permite la llegada del fármaco a su lugar de acción o a que cuando ocurre un proceso de isquemia cerebral, muchos mecanismos moleculares se alteran y sólo un fármaco no puede actuar sobre todos ellos. Es por ello que se buscan establecer vías alternativas que actúen sobre la penumbra isquémica para recuperar la funcionalidad de esta zona (Castillo, Blanco, Rodríguez-Yañez, Sobrino, & Leira, 2009)

2.2.4. Precondicionamiento isquémico

El preconditionamiento isquémico (PI), también conocido como isquemia transitoria global no letal, consiste en la realización de un breve periodo de isquemia seguido de reperusión sanguínea, con el fin de activar mecanismos de protección celular ante episodios posteriores de isquemia (Wang, y otros, 2015). Este mecanismo fue experimentado inicialmente en órganos como el corazón, el hígado y el riñón y se ha expandido a otros órganos como el cerebro (Muscari, y otros, 2013).

El preconditionamiento isquémico puede ser dividido en preconditionamiento temprano y preconditionamiento tardío, este depende del periodo de tiempo que haya entre el tratamiento preconditionante y el ictus isquémico. En caso de que este tiempo sea de una a tres horas, se habla de preconditionamiento temprano en el cual solo se realizan modificaciones post-traduccionales. Cuando se habla de preconditionamiento tardío, el periodo de tiempo que se da entre el preconditionamiento isquémico y la isquemia cerebral es de uno o más días, en este tipo de IP se empiezan a dar modificaciones en la expresión génica de las proteínas.

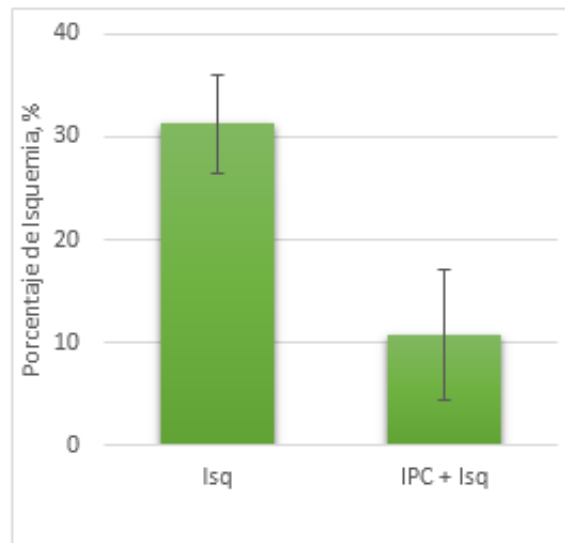
Dentro de los primeros estudios realizados con el fin de determinar el efecto del preconditionamiento isquémico, se encuentra el elaborado por Charles E. Murry. En su estudio, Murry indujo la isquemia y el preconditionamiento isquémico en el corazón de distintos grupos de perros y encontró que el tamaño del infarto en el grupo con el tratamiento preconditionante fue de ~5% en relación con el grupo control, quien presentó un porcentaje de infarto de alrededor de 30% (Murry, Jennings, & Reimer, 1986)

A partir de entonces se han venido realizando gran cantidad de investigaciones, con el fin de establecer cuáles son los mecanismos moleculares que brindan el efecto protector cuando se da el tratamiento preconditionante. Se ha encontrado que cuando ocurren periodos de isquemia, ocurre una sobre regulación de genes implicados en el metabolismo, transporte celular y transmisión sináptica; el efecto contrario ocurre en los mismos genes, cuando existe un periodo de preconditionamiento previo a la isquemia (Stenzel-Poore, Stevens, & Simon, 2004). Por otro lado, en el 2015 se publicó un artículo, en el cual se encontró que las bombas que regulan el calcio en la mitocondria NCX, aumentaban su expresión durante el preconditionamiento brindando efectos protectores a las células y mejorando la capacidad antioxidante de las mitocondrias (Sisalli, Annunziato, & Scorziello, 2015).

Otros mecanismos moleculares que se han venido relacionando con el preconditionamiento isquémico son: el aumento de la expresión de la proteína quinasa C (PKC), la cual fosforila algunas proteínas que se encargan del crecimiento y la diferenciación celular (Dave, y otros, 2008); la intervención en la cascada de la caspasa-3, la cual está implicada en la inducción de la apoptosis y en la cual actúa el preconditionamiento, previniendo la muerte neuronal (Tanaka, y otros, 2004). Además de estos, existen otros mecanismos moleculares que podrían estar involucrados en el resultado protector del preconditionamiento y que no están claramente establecidos todavía.

Actualmente, se cree que los mecanismos moleculares que se activan como mecanismo de neuroprotección en el preconditionamiento isquémico, están relacionados con algunas vías de resistencia que adquieren las células tumorales en estados de hipoxia (Muscari, y otros, 2013). De ser esto cierto, podría investigarse si las moléculas involucradas en el preconditionamiento isquémico pueden utilizarse como dianas terapéuticas contra las células cancerígenas.

Investigaciones previas que se han venido realizando en el laboratorio de fisiología animal y celular de la Universidad Icesi sobre el preconditionamiento isquémico, hallaron que se presentó una reducción significativa en el tamaño del infarto cerebral cuando se sometió a preconditionamiento isquémico, en un modelo in vivo de ratas Wistar. Esto se puede observar en la Gráfica 1, en donde se observa que se presentó una reducción de aproximadamente 20 puntos en el tamaño del infarto que pasó de ~31% de hemisferio infartado en el grupo de ratas isquémicas al ~11% en el grupo de ratas que fueron sometidas a preconditionamiento isquémico previo a la isquemia. Esto es equivalente a una reducción en el tamaño del infarto de aproximadamente un 60% del tamaño original



Gráfica 1. Tamaño del infarto en el grupo de ratas control, las cuales fueron sometidas a ictus isquémico VS en el grupo de ratas isquémicas con tratamiento preconditionante previo a la isquemia (Resultado aún no publicado del laboratorio de fisiología animal celular de la Universidad Icesi).

2.2.5. Proteína Akt

La proteína Akt, también conocida como proteína quinasa B, es una proteína quinasa serina/treonina, quien tiene tres isoformas, Akt1, Akt2 y Akt3, las cuales están involucradas en procesos de angiogénesis, proliferación, supervivencia, metabolismo y crecimiento celular (RCSB PDB: Protein Data Bank, 2015). Estas tres isoformas se caracterizan estructuralmente por presentar un dominio PH amino terminal (**P**leckstrin **h**omology domain), un dominio central quinasa y un dominio regulador carboxilo terminal (Song, Ouyang, & Bao, 2005). La proteína Akt1 se expresa en altos niveles en todos los tejidos, Akt2 se expresa principalmente en órganos como el hígado, músculo y los adipocitos, y la proteína Akt3 se expresa principalmente en el cerebro y en testículos (Chan, y otros, 2014). En la Figura 4 se muestra la estructura de esta proteína.

El dominio quinasa catalítico de la proteína Akt se encuentra en la posición central de la molécula, en esta región también se encuentra el residuo de Thr 308 (en el caso de Akt1), el cual es característico de la proteína Akt, ya que su fosforilación causa la activación parcial de la proteína antes mencionada. Por otro lado, en el dominio terminal carboxilo se encuentra la Ser 473 y es el que brinda el entorno hidrófobo, el cual es necesario para que se fosforile la serina 473 y la treonina 308 de la proteína, causantes de su activación. Este entorno hidrófobo en la proteína Akt presenta la secuencia amonoacídica FPQFSY, y se ha encontrado que la variación en alguno de estos aminoácidos, afectará la capacidad catalítica de la proteína quinasa B. Cabe aclarar que se ha encontrado que cuando se fosforila solamente la Ser 473, la actividad de la proteína es casi nula, pero cuando se fosforila la Thr 308 su actividad es parcial; por el contrario, la fosforilación de ambos aminoácidos, produce la actividad completa de Akt. (Song, Ouyang, & Bao, 2005)

La proteína Akt se encuentra involucrada en la cascada PI3K/Akt, la cual inicia con la activación de los receptores tirosina-quinasa que se encuentran en la membrana celular, los cuales fosforilan al sustrato receptor de insulina (IRS), que a su vez fosforila a PI3K. Al fosforilarse esta última proteína se induce un cambio conformacional que permite la unión de la subunidad p110, la cual es la subunidad catalítica. Una vez que la subunidad catalítica se haya unido, PI3K fosforila al fosfatidil inositol 3,4 difosfato (PIP2) el cual para a ser fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3) (Pinzón, Serrano, & Sanabria, 2015). Seguido de esto, la proteína Akt y PDK1 se unen a el PIP3, seguido de esto, PDK1 fosforila a Akt en la Thr 308 activándose parcialmente. Por otro lado, aunque el mecanismo de fosforilación de la Ser 473, aún no está completamente establecido, se cree que el complejo mTORC2 fosforila a Akt en el motivo hidrófobo Ser 473 (Manning & Cantley, 2007).

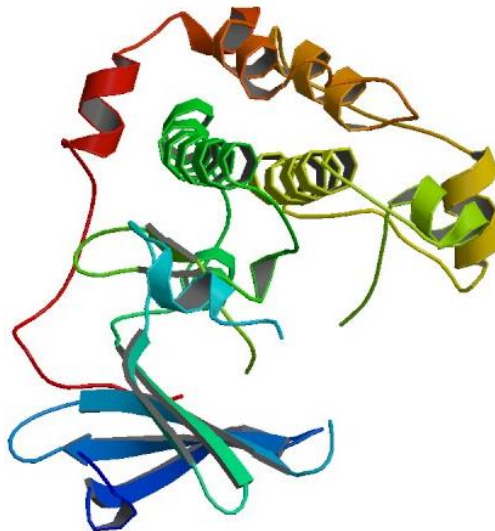
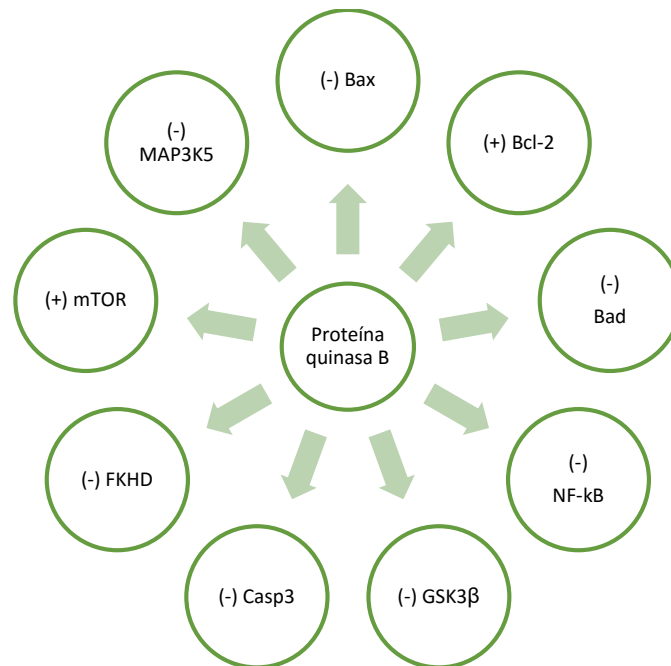


Figura 4. Estructura de la proteína Akt. Obtenida de PDB (1GZO)

Se ha observado que cada una de estas isoformas influye en la capacidad tumoral con la que cuentan algunas células. Por ejemplo, se ha encontrado que existe una

mayor expresión de Akt 2 en las células cancerígenas pancreáticas, mamarias y de ovario, y de Akt 3 en cáncer de próstata y de mama (Pinzón, Serrano, & Sanabria, 2015). Por otro lado, también se ha encontrado que la proteína Akt se fosforila comúnmente en el cerebro cuando este no se encuentra en condiciones isquémicas, pero luego de ocurrido un evento isquémico y permitida la reperfusión, se ha observado que hay un aumento significativo en el nivel de fosforilación en el residuo de serina 473 de esta proteína (Zhao, Sapolsky, & Steinberg, 2006).

Como se mencionó antes, la proteína Akt se ha relacionado con varios mecanismos de supervivencia celular. Esta quinasa, fosforila a Bad en la ser-136, a la procaspasa 9 en la ser-196, a FRKHL1 y a la GSK3 β , lo que causa la inhibición de las vías apoptóticas que promueven estas moléculas (Encinas Martín, 2001). Por otro lado, Akt también fosforila a MAP3K5, la cual está relacionada con las vías de señalización en la apoptosis y al estar fosforilada, disminuye su actividad impidiendo la apoptosis (RCSB PDB: Protein Data Bank, 2015). Estas no son las únicas vías por las que Akt promueve la persistencia celular, por lo cual en el Esquema 1 se muestran algunos blancos moleculares de la proteína Akt, que causan que esta tenga características a favor de la supervivencia celular. El Esquema 1, se realizó con base en las siguientes referencias: (Encinas Martín, 2001), (RCSB PDB: Protein Data Bank, 2015), (Pinzón, Serrano, & Sanabria, 2015), (Sadidi, Lentz, & Feldman, 2009) (Ahmed, Grimes, Bellacosa, Chan, & Tsichlis, 1997) (Cherry & Stella, 2014),



Esquema 1. Blancos moleculares de la proteína Akt. (+) = Activa. (-) = Inhibe

Por otro lado, se ha encontrado que la proteína Akt, juega un papel importante en las enfermedades cerebrovasculares y neurodegenerativas, ya que la gravedad de estas patologías va a depender en gran medida de la expresión de esta proteína. Se ha visto afectada su actividad en los procesos de isquemia cerebral, ya que se

ha encontrado que en situaciones de hipo perfusión, su actividad se ve disminuida, (Stanojlovic, y otros, 2015). Por otro lado, también se ha encontrado un aumento en la fosforilación de Akt durante la isquemia, lo que se explica como un mecanismo que le va a permitir a algunas células sobrevivir después de la oclusión vascular (Zhou, y otros, 2015).

En un estudio realizado por Friguls, se encontró que una hora después de haber inducido la isquemia cerebral en ratas, hubo un aumento en la fosforilación del residuo de serina 473 de la proteína Akt, y que este aumento es el promotor de la supervivencia neuronal, ya que esta proteína fosforila un miembro de la familia Bcl-2 Bad, lo que inhibe la apoptosis (Friguls, Petegnief, Justicia, Pallás, & Planas, 2002).

Es decir, que la cascada PI3K/Akt se encuentra involucrada en los mecanismos de neuroprotección durante y después la isquemia, provocando un aumento en la fosforilación de Akt, quien a su vez va a activar o inhibir las proteínas mostradas en el Esquema 1; obteniendo como resultado final la respuesta neuroprotectora (Ishrat, Sayeed, Atif, Hua, & Stein, 2012). Como se ha visto hasta el momento, por distintas vías Akt inhibe la muerte celular, por lo cual esta proteína actualmente es un blanco atractivo para investigaciones, con el fin de establecer su función dentro de los procesos de protección celular en condiciones de estrés, como la isquemia cerebral.

2.2.6. Precondicionamiento isquémico y la proteína Akt

Teniendo en cuenta la información mostrada anteriormente, se ha tratado de establecer si existe alguna relación entre el precondicionamiento isquémico (PI) y la expresión y fosforilación de la proteína Akt. Uno de los primeros estudios realizados al respecto fue en ratas en el año 2000, donde concluyeron que el nivel de la expresión total de Akt no se influenciaba por el precondicionamiento isquémico y que además se veía disminuida su fosforilación en la Serina 473 después de 10 minutos de reperfusión, permitidos luego de haber obstruido las arterias carótidas por un periodo de 3,5 minutos (Reperfusión temprana). (Namura, Nagata, Kikuchi, Andreucci, & Alessandrini, 2000).

El rol de la proteína Akt, en el efecto protector que brinda el precondicionamiento isquémico es algo controversial, ya que muchos autores han afirmado que la proteína Akt no está involucrada con la protección dada por el precondicionamiento y por el contrario, otras investigaciones afirman que si existe una protección debido al aumento de la proteína Akt fosforilada. A pesar de esta controversia, en la mayoría de las investigaciones se ha observado que después de la reperfusión se aumenta el nivel de fosforilación de la proteína Akt, seguido de una disminución progresiva, cuando hay un precondicionamiento previo, se observa un pico en el nivel de esta fosforilación (Zhao, Sapolsky, & Steinberg, 2006).

A partir de entonces se ha seguido estudiando la relación existente entre esta proteína y el PI. Se ha encontrado que en un modelo in vivo de ratas Sprague-

Dawley, siguiendo el procedimiento MCAO (Middle Cerebral Artery Occlusion), el preconditionamiento prolonga la fosforilación de la proteína Akt y protege las neuronas en la región de penumbra ya que se aumenta su actividad (Zhou, y otros, 2015). Por otro lado, cuando se realizó el preconditionamiento isquémico en la retina de un modelo in vivo de ratas, se encontró que el PI en la retina provocó su protección por la activación de la vía PI3K/Akt, de acuerdo con cada isoforma de la proteína Akt (Dreixler, y otros, 2009).

Esta relación se ha establecido en varios tejidos y órganos distintos. Por ejemplo, se encontró que una de las vías que ofrece la mayor cardioprotección en el PI está caracterizada por la activación de la proteína Akt y Erk 1/2 durante la reperfusión al miocardio (Williams, Waksman, De Silva, Jacques, & Mahmoudi, 2015). Esta activación, no sólo aumenta la supervivencia celular, sino que también reduce el tamaño del infarto de miocardio (Lai, Tang, Chiang, Tseng, & Huang, 2015).

Hallazgos similares se han encontrado en el riñón de ratas Sprague-Dawley, en donde el preconditionamiento isquémico renal protege este órgano, gracias a la fosforilación de la proteína Akt después del episodio isquémico y a la activación de la óxido nítrico sintasa (Tsutsui, y otros, 2013). Se ha encontrado también, que cuando se realiza el preconditionamiento isquémico en la arteria femoral izquierda de ratas Sprague-Dawley, se produce la renoprotección frente a un medio de contraste posterior, al que fueron sometidos estos animales. Aunque el mecanismo de protección no está establecido, se cree que el aumento de la fosforilación de la proteína Akt y de GSK-3 β debido al preconditionamiento, son los responsables de este proceso (Liu, y otros, 2015). Debido a los hallazgos que se han mencionado antes, se considera a la relación entre el preconditionamiento isquémico cerebral y la proteína Akt un atractivo foco de investigación para determinar un mecanismo neuroprotector frente a la isquemia cerebral.

2.2.7. O-GlcNAcilación

La O-GlcNAcilación, al igual que la fosforilación, es una modificación post-traducciona reversible que se ha encontrado principalmente en el citoplasma y el núcleo de las células. Esta modificación corresponde a la adición covalente de un grupo N-Acetilglucosamina sobre el grupo hidroxilo presente en los residuos de serina y treonina de las proteínas. La adición del grupo N-Acetilglucosamina sobre estos aminoácidos es catalizada por la OGT quien utiliza la UDPGlcNAc como donante del grupo de glucosamina. (Zeldan & Hart, 2010)

Se ha encontrado que esta modificación post-traducciona es importante, ya que en condiciones de estrés, activa vías de señalización que promueven la supervivencia celular (Jensen, Johnsen, Kristiansen, Zachara, & Botker, 2013). Es por esto que es importante determinar si el efecto protector que dado por el preconditionamiento isquémico está mediado por estas modificaciones

Una fracción de al rededor del 2-3% de la glucosa que consumimos se va a la vía de las hexoxaminas para posteriormente convertirse en UDP-N-acetil-glucosamina (UDP-GlcNAc), quien es el sustrato de la OGT (Issad, 2010). La ruta de las hexoxaminas empieza con la síntesis de glucosamina-6-fosfato a partir de la fructosa-6-fosfato y de la glutamina mediada por la enzima L-glutamina-6-fructosa-fosfato amidotransferasa (GFAT). Esta glucosamina-6-fosfato será el precursor de la uridina-5-difosfato-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), en este punto, la OGT catalizará la adición de O-GlcNAc a los residuos de serina y treonina de las proteínas. Ver Figura 5. (Jensen , Johnsen, Kristiansen, Zachara, & Botker, 2013) (Issad, 2010)

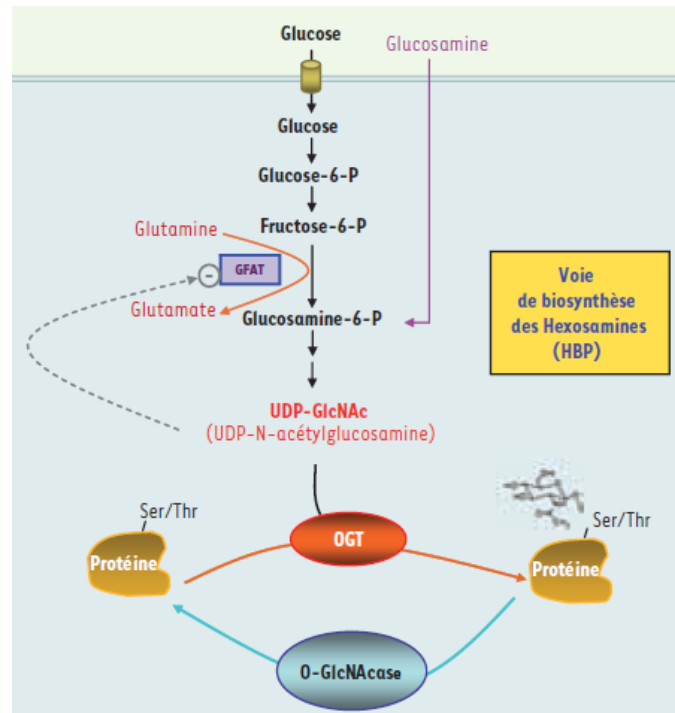


Figura 5. Vía de síntesis de las hexoxaminas. Ciclo de O-GlcNAcación (Issad, 2010)

Por otro lado, a diferencia de las fosforilaciones, las cuales están mediadas por gran cantidad de distintas fosfatasas y quinatas, las glicosilaciones solo están mediadas por la N-acetil-D-glucosamidasa (O-GlcNAcasa) y por la O-link-N-acetil-glucosaminiltransferasa (OGT) (Issad, 2010). Se ha encontrado que pueden existir diversas relaciones entre las fosforilaciones y las glicosilaciones de acuerdo con el sustrato, tal como se puede ver en la Figura 6.

En la Fig 6.A. se puede observar una relación competitiva en el sitio de unión del mismo aminoácido, esto quiere decir que la proteína puede ser fosforilada o glicosilada en el mismo residuo, pero no se pueden dar ambas modificaciones al mismo tiempo. La Fig 6.B. corresponde a la unión recíproca en diferentes residuos, esta relación indica que la proteína se fosforila o se glicosila en residuos distintos de la proteína, pero estas modificaciones post-traduccionales tampoco pueden ocurrir al mismo tiempo. La Fig 6.C. muestra la unión simultánea en diferentes

residuos, en otras palabras explica que las glicosilaciones y las fosforilaciones pueden suceder paralelamente en distintos residuos aminoacídicos de las proteínas. Por último, la Fig 6.D. refleja la situación de unión recíproca dependiente o unión simultánea, en la cual la proteína puede encontrarse fosforilada y glicosilada simultáneamente, o la proteína puede encontrarse solamente glicosilada en un residuo completamente distinto (Zeldan & Hart, 2010).

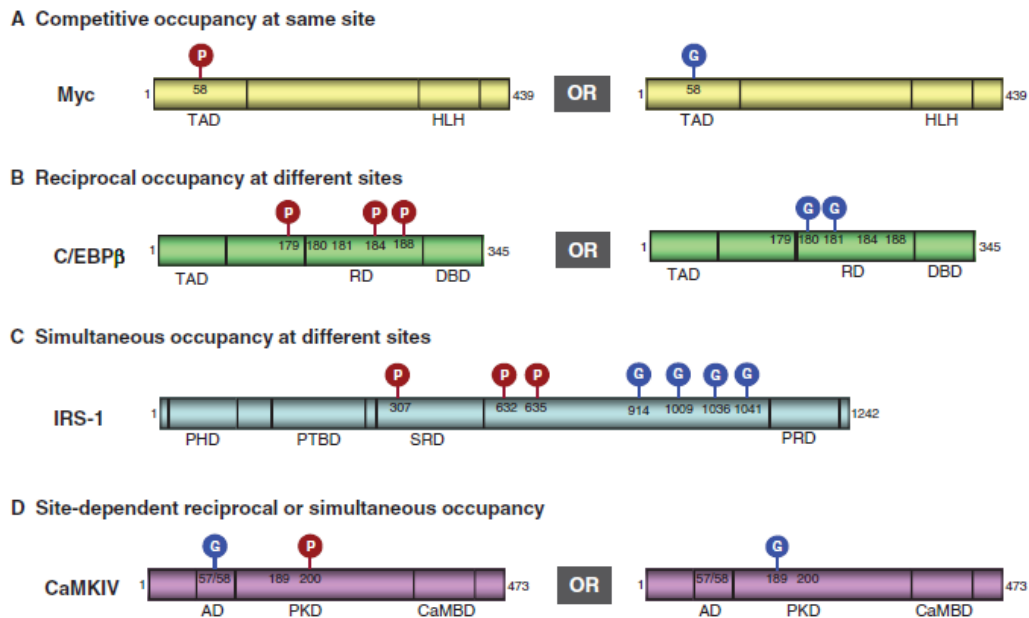


Figura 6. Cuatro relaciones distintas entre la O-GlcNacilación y la fosforilación en los sustratos de distintas proteínas (Zeldan & Hart, 2010)

Se han realizado investigaciones para determinar si el efecto neuroprotector brindado por el preconditionamiento isquémico está mediado por este tipo de glicosilaciones. Una de estas investigaciones fue la realizada por Rebekka Jensen junto con su grupo de investigación, en el cual aislaron corazones de ratas Wistar que fueron sometidas a preconditionamiento isquémico, encontraron que el preconditionamiento causa la disminución significativa en el tamaño del infarto, el aumento en el nivel de O-GlcNAciones, de la enzima O-GlcNA transferasa, además del aumento de la actividad de esta última enzima (Jensen , Johnsen, Kristiansen, Zachara, & Botker, 2013)

2.3. OBJETIVOS

2.3.1. Objetivo general

Evaluar la expresión y fosforilación de la proteína Akt en un modelo in vivo de preconditionamiento isquémico en ratas Wistar por medio de la técnica Western Blot

2.3.2. Objetivos específicos

- Comparar la expresión total de la proteína Akt en la corteza cerebral de ratas Wistar isquémicas sometidas a preconditionamiento isquémico y en ratas isquémicas que no fueron sometidas al tratamiento pre condicionante
- Comparar la fosforilación de la proteína Akt en la corteza cerebral de ratas Wistar isquémicas sometidas a preconditionamiento isquémico y en ratas isquémicas que no fueron sometidas al tratamiento pre condicionante

2.4. METODOLOGÍA UTILIZADA

2.4.1. Biomodelo de estudio

Ya que para la realización de este proyecto, se utilizó un modelo in vivo, fue necesaria la aprobación por parte del comité de ética. Esta aprobación se encuentra en el Anexo 1.

Se seleccionaron ratas macho de la especie *Rattus norvegicus*, de la cepa Wistar, que tenían alrededor de 12 ± 2 meses de edad, cuyo peso era de 320 ± 20 g. Las ratas seleccionadas se repartieron equitativamente en los siguientes grupos, con $n=4$:

Grupo A: Sin preconditionamiento isquémico y con isquemia cerebral

Grupo B: Con preconditionamiento isquémico y con isquemia cerebral

2.4.2. Tratamiento preconditionante

A las ratas que conformaron el grupo B se les realizó el siguiente tratamiento:

Una vez realizada la evaluación neurológica de las ratas, se les puso anestesia general con isoflurano. Después de anestesiadas, se realizó una incisión en su cuello, específicamente en la línea media ventral, seguida de la disección de las fibras nerviosas circundantes, con el fin de ubicar las arterias carótidas comunes. Una vez ubicadas, se pinzaron con un clamp vascular obstruyendo el flujo sanguíneo a todo el cerebro durante tres minutos (durante este periodo ocurrió una isquemia transitoria global no letal). Después de transcurridos los tres minutos, fue permitida la reperfusión sanguínea al cerebro de los animales y se cerró la incisión que se había realizado en el cuello.

Las ratas del grupo B fueron sometidas a isquemia cerebral focal una hora después de haber realizado el tratamiento preconditionante. A las ratas del grupo A se les realizó toda la cirugía mas no fueron sometidas a la obstrucción de las arterias carótidas comunes, por lo cual no tuvieron preconditionamiento, es por esto que este grupo recibió un preconditionamiento SHAM.

En el Anexo 2 se pueden encontrar los parámetros que se tenían en cuenta en la evaluación comportamental de las ratas del test de García, antes y después de haber sido inducida la isquemia y la gráfica del resultado del test de García de los dos grupos objeto de estudio antes del sacrificio. En la Gráfica 3, presente en el mismo anexo, se puede observar que hubo un mayor puntaje del test de García en el grupo que recibió tratamiento pre-condicionante.

2.4.3. Isquemia cerebral focal

Las cirugías fueron ejecutadas bajo en modelo MCAO (Middle Cerebral Artery Occlusion). El modelo MCAO consistió en, una vez anestesiadas las ratas, se realizó un corte longitudinal en su cuello con el fin de ubicar la arteria carótida externa, la cual se aisló para introducir posteriormente un filamento de nylon a través de esta. El filamento se introdujo hasta que llegó al punto de inicio de la arteria cerebral media, de tal forma que se impidió el flujo sanguíneo hacia la parte derecha del cerebro de la rata (Chiang, Messing, & Chou, 2011). Al final de todo el procedimiento se cerró la herida de la rata con el extremo del nylon sobresaliendo. Noventa minutos después de haber iniciado la isquemia se retiró el filamento para permitir que la sangre fluyera nuevamente al cerebro y seguido de esto se realizó la evaluación neurológica de cada una de las ratas. Cuatro horas y media después de haber iniciado la reperfusión sanguínea al cerebro de las ratas, se anestesiaron y sacrificaron para extraer sus cerebros, los cuales se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y conservaron en el congelador a -80 grados centígrados. Antes de congelar los cerebros, se separó la corteza cerebral, quien era el tejido de interés de este proyecto.

A continuación se presenta un esquema de los tratamientos que recibieron los grupos A y B, indicando dentro de cada caja la duración en minutos, de los procedimientos experimentales que regulan la reperfusión sanguínea al cerebro (Esquema 2).

Grupo A	Pre condicionamiento SHAM 3'	Estable	Isquemia 90'	Reperusión 270'	Sacrificio
Grupo B	Pre condicionamiento 3'	Reperusión 60'	Isquemia 90'	Reperusión 270'	Sacrificio

Esquema 2. Duración de los procedimientos experimentales que regularon la reperfusión sanguínea al cerebro

2.4.4. Western Blot

Para la realización de este procedimiento se utilizó como guía el protocolo utilizado por Juliana Quintero en su proyecto de grado (Quintero, 2014), el Procedimiento Operativo Estándar (POE) para la realización de Western Blot del laboratorio de Fisiología Animal y la guía para western blot de la empresa Abcam.

2.4.4.1. Preparación de la muestra

La corteza de cada uno de los cerebros de las ratas fue homogenizada para evitar la degradación de las proteínas por acción de las fosfatasa, proteasas y O-GlcNAcasas. Se realizó la homogenización de las muestras con buffer de lisis 1:1000 con PUGNAc, inhibidor de fosfatasa e inhibidor de proteasas. La muestra anterior se sometió a centrifugación a 13000 rpm por 3 minutos y bajo una temperatura de 4°C. Se conservó el sobrenadante a -80°C

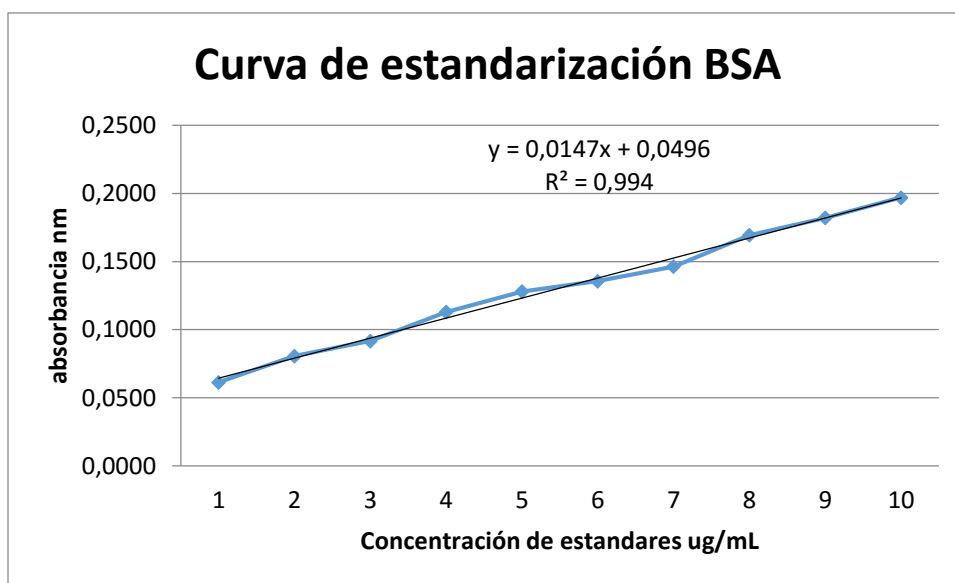
Para la realización del siguiente paso del western blot, que es la electroforesis, era necesario depositar 40µg de proteína en cada carril del gel, por lo cual se realizó una curva de calibración utilizando el método de Bradford. El reactivo de Bradford es hidrofóbico y al unirse a las proteínas (entorno hidrofóbico), tornará la solución de color azul; por el contrario, cuando se encuentra en medio acuoso con ácido fosfórico, la solución es de color pardo.

Se realizó la curva de calibración estándar con diferentes diluciones de un stock de albúmina de suero bovino (BSA) 0,125 µg/µL, con buffer fosfato salino (PBS) 1X a 595nm. De acuerdo con el proveedor del reactivo de Bradford, el rango de la concentración de BSA debe ser entre 1,2-10 µg/mL para poder realizar el ensayo. En la siguiente tabla se observan las concentraciones que se obtuvieron para realizar la curva de calibración y los volúmenes del estándar de BSA y de PSB 1X (Bio-Rad Laboratories, s.f.).

Tabla 1 Diluciones de BSA 0,125 para la realización de la curva de calibración

Concentración final de BSA $\mu\text{g/mL}$	PBS 1X	Volumen del estándar de BSA (0,125 $\mu\text{g/mL}$)	Volumen del reactivo de Bradford
1	792	8	200
2	784	16	200
3	776	24	200
4	768	32	200
5	760	40	200
6	752	48	200
7	744	56	200
8	736	64	200
9	728	72	200
10	720	80	200

La curva de calibración obtenida a partir de las diluciones mostradas en la Tabla 1, se observa en la siguiente gráfica



Gráfica 2. Curva de calibración de las diferentes diluciones del estándar de BSA con el ensayo Bio-Rad a 595nm

Una vez realizada la curva de calibración, se tomó 1 μL del homogenizado realizado en el paso anterior y se diluyó en 1000 μL de PBS 1X. De esta dilución se tomó 1 μL y se diluyó en 1mL de PBS1X (Este paso se repitió una vez más). De la última solución se tomaron 500 μL para ser diluidos en 300 μL de PBS 1X y en 200 μL de reactivo de Bradford. Por último se midió la absorbancia a 595nm, 25 minutos después de haber adicionado el reactivo de Bradford. Esto se realizó con el fin de

determinar la concentración de la proteína en cada grupo homogeneizado y a su vez la cantidad de muestra que se depositó en cada pozo del gel de electroforesis. Las absorbancias obtenidas del homogenizado de la corteza de los grupos experimentales se observa en la Tabla 2.

Tabla 2 Cantidad de muestra, buffer de carga y agua para servir 20 μ L en cada pozo

Grupo Experimental	A	B
Absorbancia promedio	0,135	0,172
Concentración de proteína (μg/mL)	23238	33374
Cantidad de proteína a agregar en cada pozo (μg)	40	40
Volumen a tomar del homogenizado (μL)	1,721	1,119
Volumen del Buffer de Carga (μL)	10	10
Volumen de agua (μL)	8,279	8,801
Volumen a servir en cada pozo (μL)	20	20

*La concentración de proteína presente en el homogenizado se calculó a partir de la ecuación de la recta presente en el Grafico 1, siguiendo la Ley de Beer-Lambert. La muestra de estos cálculos se puede observar en el Anexo 3.

2.4.4.2. Electroforesis

Se realizó la separación de las proteínas del homogenizado obtenido anteriormente utilizando técnicas electroforéticas.

El primer paso es la realización del gel de poliacrilamida al 8% con los componentes y cantidades que se encuentran en la Tabla 3

Tabla 3. Componentes con sus respectivas cantidades, necesarios para hacer el gel de poliacrilamida

Componentes	Running gel	Stacking gel
Agua destilada	11,5mL	4,1mL
Acrilamida 30%	6,7mL	1,0mL
Tris 1,5M	pH 8,8; 6,3mL	pH 6,8; 750 μ L
SDS 10%	250 μ L	60 μ L
Persulfato de amonio 10%	250 μ L	60 μ L
TEMED	15 μ L	6 μ L

La cantidad de muestra que se determinó (con la curva de concentración) que debía depositarse en cada pozo, se diluyó con agua hasta obtener 10 μ L de dilución, adicionalmente se agregaron 10 μ L de buffer de carga Laemmli 2X. Esta solución, presente en un tubo eppendorf, se calentó por 5 minutos a 95°C, se centrifugó durante 30 segundos y por último se sembró en el pozo correspondiente. Este mismo procedimiento se realizó con cada uno de los homogenizados. En la Tabla 4 se muestra la distribución de los grupos experimentales en los 8 pozos del gel de poliacrilamida.

Tabla 4 Distribución de los grupos experimentales en el gel de poliacrilamida

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8
Muestra	MP	A	B	-	MP	A	B	-

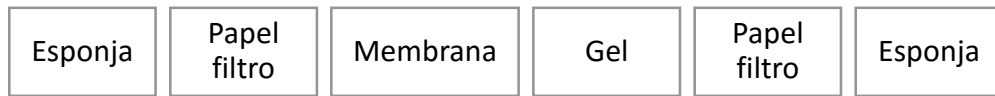
Se encendió la fuente de poder y se empezó a correr la electroforesis bajo las siguientes condiciones:

- Voltaje: 150V
- Corriente: 0,12 amperios
- Tiempo: 107 minutos

2.4.4.3. Transferencia

Una vez realizada la electroforesis, se realizó la transferencia de la proteína desde el gel de poliacrilamida a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) impregnada con metanol. Esto se realizó con el fin de inmovilizar las proteínas para

que pudieran unirse posteriormente al anticuerpo. Para ello se formó la estructura mostrada en el Esquema 3.



Esquema 3. Orden en el que se armó el sandwich para realizar el proceso de transferencia

Después de haber formado esa estructura se realizó el montaje para que las proteínas se transfirieran del gel a la membrana utilizando un buffer de transferencia y se encendió la fuente de poder bajo las siguientes condiciones:

- Voltaje: 150V
- Corriente: 0,6 amperios
- Tiempo: 120 minutos

2.4.4.4. Bloqueo

Con el fin de reducir uniones inespecíficas del anticuerpo, se realizó el bloqueo de la membrana. Para ello, se utilizó una solución de Tris buffer salino (TBS), tween 20 y albúmina de suero bovino (BSA) al 3%, la cual entró en contacto con la membrana durante una hora, a temperatura ambiente, 13rpm y un ángulo de 15°.

2.4.4.5. Hibridación de los anticuerpos

Después de haber realizado el bloqueo de la membrana, se llevó a cabo la incubación de los anticuerpos primarios específicos, a 4°C durante toda una noche y con agitación constante. Estos anticuerpos estuvieron diluidos en la misma solución con la que se realizó el bloqueo de la membrana (TBST + BSA 3%). Los anticuerpos primarios utilizados se encuentran en la Tabla 5.

Una vez terminado el periodo de incubación con anticuerpo primario se lavó la membrana de PVDF cinco veces con TBST 1X durante cinco minutos cada vez, con el fin de eliminar los restos de anticuerpos. Luego de estos lavados, se realizó la incubación del anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente. Este anticuerpo (anti hospedero) estuvo conjugado con peroxidasa de rábano y, al igual que los anticuerpos primarios, se encontraba diluido en la con la solución de bloqueo (TBST + BSA 3%) en una proporción 1:3000

Cuando finalizó el tiempo de incubación se procedió a lavar la membrana con TBST 1X, de la misma forma que se lavó la membrana con anticuerpo primario, con el fin de eliminar restos de anticuerpo secundario

Tabla 5. Anticuerpos primarios que se utilizaron en el Western Blot

Anticuerpo	Dilución (TBST + BSA 3%)	Hospedador	Marca
AKT 1/2/3 H-136	1:500	Conejo	BioRad
B-actina	1:500	Rata	
p- AKT ser 473	1:500	Conejo	
p-AKT thr 308	1:300	Conejo	
RL2 (anti O-GlcNAc)	1:500	Rata	

2.4.4.6. Detección

Se utilizó un método de detección indirecto por medio de quimioluminiscencia. Para esto, se incubó la membrana de PVDF durante cinco minutos con solución quimioluminiscente de revelado, la cual está compuesta por peróxido de hidrógeno y luminol. Una vez que hubieron transcurrido los cinco minutos se retiró la solución de revelado y se expuso la membrana a la película fotográfica. Esta película fotográfica se pasó por el equipo de revelado ubicado en el cuarto oscuro. Esto se realizó con el fin de obtener una película con bandas correspondientes a la proteína Akt total, a la proteína Akt fosforilada y a las glicosilaciones de tipo O-GlcNAc presentes en las membranas.

2.4.4.7. Stripping

Este paso se realizó con el fin de remover todos los anticuerpos que estaban presentes en la membrana PVDF y así poder utilizarla en la hibridación con el anticuerpo de actina y el RL2, donde se retomó desde el paso del bloqueo. Para ello se realizó 1 lavado con TBST 1X de cinco minutos, 2 lavados con la solución de stripping de diez minutos cada uno, 2 lavados con PBS 1X de diez minutos cada uno y un lavado con TBST 1X de cinco minutos.

2.4.5. Densitometría y Análisis estadístico

Se usó el software ImageJ, con el fin cuantificar la intensidad de la banda correspondiente a la proteína AKT, la proteína AKT fosforilada y las proteínas

glicosiladas. Después de esto se llevó a cabo la normalización de los datos utilizando la intensidad de la proteína control de β - actina.

Se calculó el promedio y la desviación estándar de cada uno de los grupos, además de esto se determinó la distribución normal de los residuos por medio de la prueba Kolmogórov-Smirnov, y la homogeneidad de las varianzas a través de la prueba de Levene.

Por último, se realizó y la prueba t-Student para los valores que cumplieron con la distribución normal; en el caso del grupo de p-Akt the308, que no cumplió con la prueba de homogeneidad de las varianzas, se realizó la prueba Mann Whitney la cual es la prueba no paramétrica de la t-Student.

2.4.6. Matriz de marco lógico

Tabla 6 Matriz de marco lógico

Objetivo general	Evaluar la expresión y fosforilación de la proteína AKT en un modelo in vivo de preconditionamiento isquémico en ratas Wistar por medio de la técnica Western Blot		
Objetivos específicos	Actividades	Indicadores	Supuestos
Comparar la expresión total de la proteína Akt en la corteza cerebral de ratas Wistar sometidas a preconditionamiento isquémico y en ratas que no fueron sometidas al tratamiento pre condicionante	<p>Selección de las ratas Wistar y se presenciará la realización de las microcirugías.</p> <p>Realización del tratamiento precondicionante a cuatro ratas Wistar, obstruyendo la arteria cerebral media por 3 minutos, seguida de la reperfusión sanguínea por 60 minutos.</p> <p>Sacrificio de cada una de las ratas con la posterior obtención de las cortezas cerebrales</p>	<p>Resultado del análisis estadístico realizado.</p> <p>Observación de fluorescencia y cuantificación de la intensidad de las bandas correspondientes a la expresión total de la proteína Akt.</p>	<p>Disponibilidad del experto en la realización de las microcirugías.</p> <p>Disponibilidad de equipos y materiales.</p> <p>Disponibilidad del anticuerpo específico para la identificación de la expresión total de la proteína Akt</p>

	<p>y homogenización de las muestras.</p> <p>Corrida de la electroforesis para separar la proteína.</p> <p>Realización del Western Blot con un anticuerpo específico para la expresión total de la proteína Akt.</p> <p>Realización de la densitometría y el análisis estadístico.</p>		<p>Disponibilidad de los laboratorios de microcirugía y fisiología celular animal</p>
<p>Comparar la fosforilación de la proteína Akt en la corteza cerebral de ratas Wistar sometidas a preconditionamiento isquémico y en ratas que no fueron sometidas al tratamiento precondicionante</p>	<p>Selección de las ratas Wistar y se presenciará la realización de las microcirugías.</p> <p>Realización del tratamiento precondicionante a cuatro ratas Wistar, obstruyendo la arteria cerebral media por 3 minutos, seguida de la perfusión sanguínea por 60 minutos.</p> <p>Sacrificio de cada una de las ratas con la posterior obtención de las cortezas cerebrales y homogenización de las muestras.</p> <p>Corrida de la electroforesis para separar la proteína</p> <p>Realización del Western Blot con un anticuerpo específico</p>	<p>Resultado del análisis estadístico realizado.</p> <p>Observación de fluorescencia y cuantificación de las intensidad de las bandas correspondientes a la proteína Akt fosforilada</p>	<p>Disponibilidad del experto en la realización de las microcirugías.</p> <p>Disponibilidad de equipos y materiales.</p> <p>Disponibilidad del anticuerpo específico para la identificación de la expresión total de la proteína Akt</p> <p>Disponibilidad de los laboratorios de microcirugía y fisiología celular animal</p>

	para la proteína Akt fosforilada.		
	Realización de la densitometría y el análisis estadístico.		

2.5. RESULTADOS

Se realizó la evaluación de expresión y fosforilación de la proteína Akt, además de las glicosilaciones presentes en los grupos experimentales, y para ello se utilizó el control de β -actina (Por cada anticuerpo evaluado, se realizaron cuatro repeticiones). Esto se realizó por medio de la técnica Wester Blot, los resultados de esta técnica se pueden observar en las Figuras 7A-10A. Después de realizar la densitometría se realizó el análisis de normalidad de los datos y la prueba de homogeneidad de las varianzas, los resultados de estas pruebas se pueden encontrar en los Anexos 4 a 7. Posteriormente, se realizó la prueba t-Student para realizar la evaluación por pares, excepto en el grupo de la proteína p-Akt Thr 308, quien no cumplió con la prueba de homogeneidad de las varianzas por lo cual se realizó la prueba de Mann Whitney (todo esto se realizó con un nivel de confianza del 95%).

Evaluación de la proteína Akt total en corteza de rata

Se encontró que para esta proteína, los datos seguían una distribución normal y presentaban homogeneidad en sus varianzas, ya que las pruebas estadísticas arrojaron un valor p de 0,408 y 0,261 respectivamente. Además de esto, se encontró que el grupo con tratamiento precondicionante presentó un mayor efecto sobre la expresión de la proteína Akt total que el grupo A, el cual no tuvo tratamiento precondicionante (Ver Anexo 4). La Figura 7A muestra un resultado de la membrana hibridada con el anticuerpo AKT 1/2/3 H-136. En esta Figura se puede observar una mayor intensidad de la banda correspondiente al grupo B, es decir al grupo que recibió el tratamiento precondicionante. En la Figura 7B, se puede confirmar que hubo una mayor expresión de Akt total en el grupo con tratamiento precondicionante, a pesar de esto, al realizar la prueba t de Student, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos.

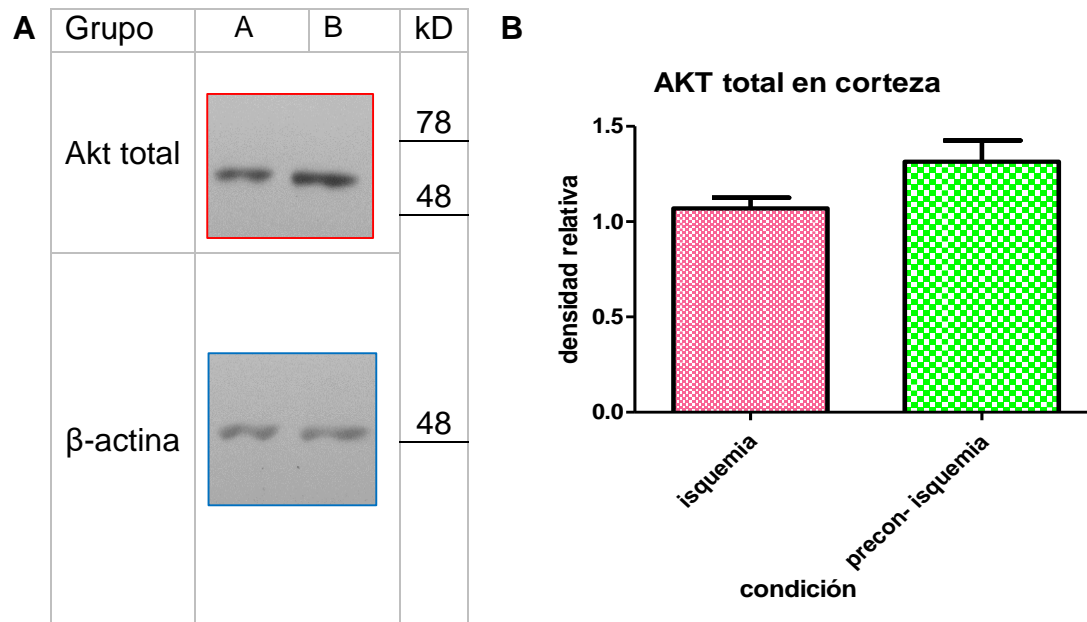


Figura 7. A. Resultados de la expresión de la proteína Akt total detectados por Western Blot. B. Cuantificación de la expresión de la proteína Akt total en la corteza cerebral del grupo control de ratas isquémicas Vs. del grupo de ratas isquémicas que recibió tratamiento preconditionante.

Evaluación de la proteína p-Akt Ser 473

El comportamiento de los datos correspondientes a la proteína Akt fosforilada en la Ser 473 también siguieron una distribución normal y presentaron homogeneidad en las varianzas. Además de esto, también se observó un mayor efecto sobre esta fosforilación en el grupo del preconditionamiento isquémico (Ver Anexo 5). En los resultados de las membranas del Western Blot expuestas en la Figura 8A se puede observar una mayor intensidad en la banda del lado derecho, la cual corresponde al grupo que recibió el preconditionamiento isquémico. Esto se pudo confirmar ya que, una vez realizada la densitometría, se evaluaron los datos utilizando una prueba t-Student y se encontró que hubo diferencias significativas entre los dos grupos evaluados, presentando una mayor densidad relativa el grupo que fue sometido a preconditionamiento isquémico (Figura 8B)

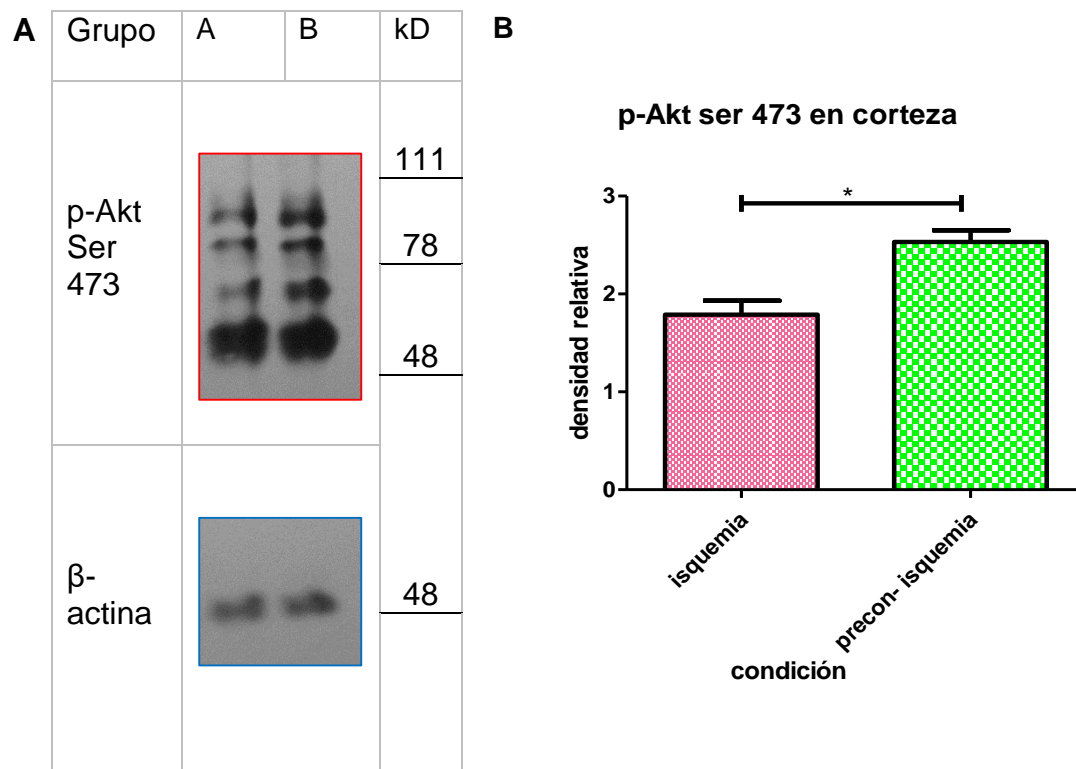


Figura 8. A. Resultados de la fosforilación de la proteína Akt en el residuo de Serina 473 detectados por el Western Blot. B. Cuantificación de la fosforilación de la proteína Akt en el residuo de Serina 473 en la corteza cerebral del grupo control de ratas isquémicas Vs. del grupo de ratas isquémicas que recibió tratamiento preconditionante.

Evaluación de la proteína p-Akt Thr 308

Con respecto a los resultados de la proteína p-Akt Thr 308, estos arrojaron que los datos obtenidos a partir de la densitometría presentaban una distribución normal pero que las varianzas no eran homogéneas, es por esto que no se realizó una prueba t-Student, si no la prueba de Mann Whitney. Con respecto a la gráfica de los principales efectos, en esta se puede observar que la media de los datos del grupo con el tratamiento preconditionante está por encima de la media de todos los datos (Ver Anexo 6). En la Figura 9A se observan los resultados obtenidos de la membrana del Western Blot, esta figura muestra una mayor intensidad en la banda correspondiente al grupo B. Esto se puede confirmar con los resultados de la prueba Mann Whitney, los cuales se encuentran expuestos en la Gráfica 5, donde se obtuvo que habían diferencias significativas entre los grupos A y B, presentándose mayor cantidad de fosforilaciones de Akt en la treonina 308 en el grupo B (Ver Figura 9B).

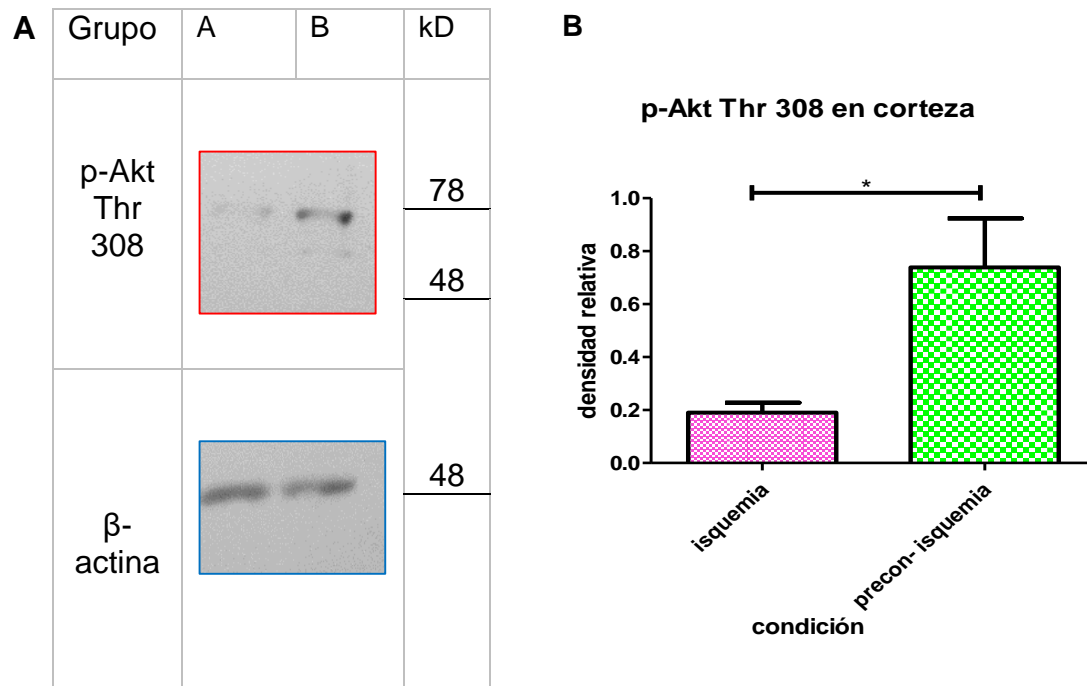


Figura 9. A. Resultados de la fosforilación de la proteína Akt en el residuo de Treonina 308 detectados por Western Blot. B. Cuantificación de la fosforilación de la proteína Akt en el residuo de Treonina 308 en la corteza cerebral del grupo control de ratas isquémicas Vs. Del grupo de ratas isquémicas que recibió tratamiento preconditionante.

Evaluación de la glicosilación tipo O-GlcNAc evaluada con el anticuerpo RL2

Por último, los datos obtenidos para las membranas que se hibridaron con el anticuerpo RL2, seguían una distribución normal de acuerdo con la prueba de Kolmogorov y sus varianzas eran iguales de acuerdo con la prueba de Levene (Ver Anexo 7). Es por ello que se realizó una prueba t-Student para realizar la evaluación por pares de los grupos A y B. En la Figura 10A, donde se ilustra el resultado de la membrana hibridada con el anticuerpo RL2, se observa una mayor intensidad en las bandas correspondientes al grupo B. Esto se pudo confirmar, después de realizar la densitometría, con el resultado de la prueba t-Student la cual arrojó que habían diferencias significativas entre los dos grupos objeto de estudio, presentándose más O-GlcNAcilación en el grupo que fue sometido a preconditionamiento isquémico (Ver Figura 10B).

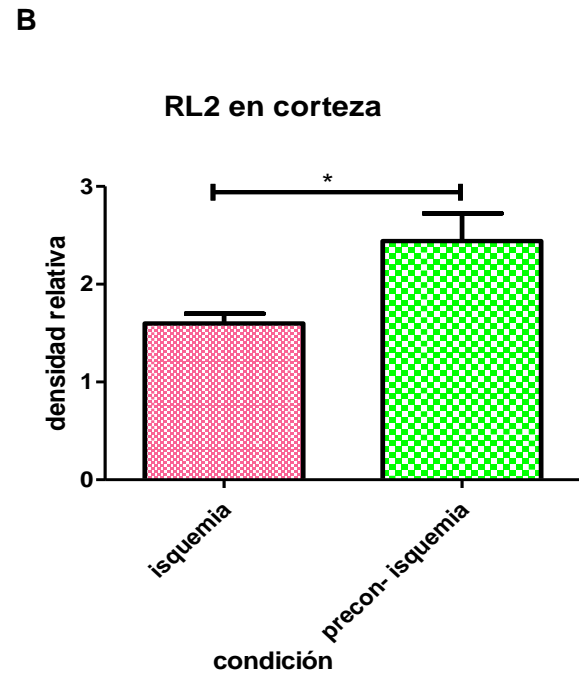
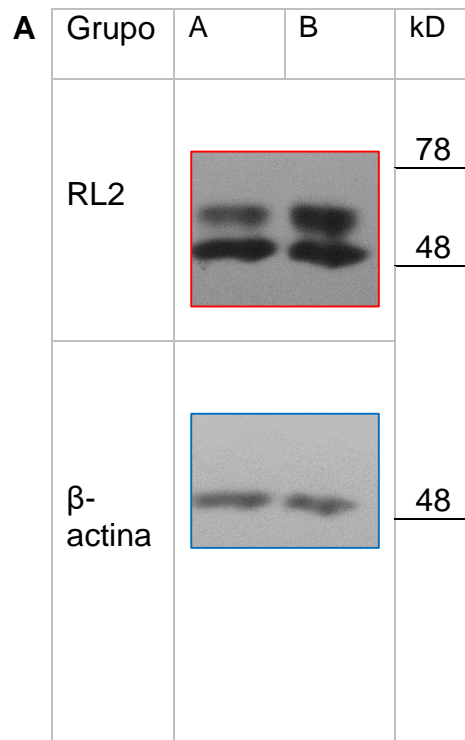


Figura 10. A. Resultados de la O-GlcNAcilación por medio del anticuerpo RL2 detectados por Western Blot. B. Niveles de O-GlcNAcilación en las proteínas de la corteza cerebral del grupo control de ratas isquémicas Vs. del grupo de ratas isquémicas sometidas a tratamiento preconditionante

2.6. DISCUSIÓN

La isquemia cerebral, es una de las dos clases de accidente cerebrovascular y constituye actualmente una de las principales causas de muerte a nivel mundial, es por esto que investigaciones alrededor de esta son importantes con el fin de lograr la reducción de la mortalidad por esta fuente (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, 2016). El ictus isquémico consiste en la obstrucción de un vaso sanguíneo, impidiendo la llegada de oxígeno y nutrientes al lugar de la afección, esto a su vez provoca la activación de la cascada isquémica, quien por diferentes vías va a culminar en la muerte celular por apoptosis (Sosa, y otros, 2008). La cascada isquémica es el evento que ocurre en el sitio principal de la afección, es decir en el área a la cual dejó de llegar el flujo sanguíneo; circundante a esta área, se encuentra la zona de penumbra, en esta zona se produce un daño neuronal, no precisamente causado por el evento isquémico si no por las sustancias citotóxicas producidas por las células del área central del infarto además de que la cantidad de oxígeno que llega a ellas es más baja de la necesaria para sobrevivir (Sánchez-Chávez, 1999).

Hoy en día, el tratamiento utilizado cuando ocurre un evento isquémico es farmacológico, utilizando fibrinolíticos cuyo objetivo es la eliminación del coágulo y la restauración del flujo sanguíneo al área afectada, mas no lo es la recuperación de las células del área de penumbra. Es por ello que se están uniendo esfuerzos en las investigaciones con el fin de recuperar esta zona y disminuir el daño celular, al buscar nuevas alternativas neuroprotectoras que disminuyan el deterioro celular, protegiendo las células cerebrales y que puedan recuperar el área de penumbra (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, 2016).

Estudios previos realizados en el laboratorio de fisiología animal y celular de la universidad Icesi, utilizando el indicador TTC (Cloruro de tetrazolio), encontraron una reducción de más de la mitad en el tamaño del infarto cuando las ratas Wistar eran sometidas a acondicionamiento isquémico, previo a un periodo de isquemia de 90 minutos (Ver Gráfica 1). Estos resultados fueron la base para la realización de este proyecto, ya que se deseó conocer si la cascada molecular en la que está involucrada la proteína Akt fue la responsable de la disminución del tamaño del infarto cuando se daba el acondicionamiento isquémico cerebral.

Además de esto, en el presente proyecto, la evaluación comportamental de las ratas utilizando el test de García (Gráfica 3), aunque no fue un resultado estadísticamente significativo, mostró que los promedios de los puntajes en las ratas con el tratamiento acondicionante fue mayor, y cuando se observó la rata se notó de forma directa, que su aspecto y desempeño en la evaluación neurológica fue mejor en comparación con las ratas que no recibieron el tratamiento acondicionante. Este resultado en la evaluación neurológica no significativo puede ser debido al tamaño de la muestra $n=4$, valor que si fuese aumentado podría arrojar diferencias significativos en este tipo de evaluación. Otro aspecto que puede estar relacionado con el puntaje del Test de García fue la dificultad en aplicar la evaluación de las

vibrisas, por esto se deja como recomendación en el proyecto tratar de evaluar otros ítems a nivel neurológico de las ratas o complementar con otro tipo de test neurológico, para aumentar la sensibilidad de los resultados en la investigación.

Por otra parte, se podría decir que aunque hubo una disminución en el tamaño del infarto, es posible que en esta disminución no se haya visto favorecida parte de la corteza motora afectada. Es decir que la disminución del infarto no incluyó esta región, provocando que los resultados comportamentales para ambos grupos sean estadísticamente similares. Además, el tiempo de evaluación tan temprano (requisito en este tipo de estudio de preconditionamiento temprano) puede enmascarar las mejoras neurológicas, pudiéndose especular que si se evaluaran las ratas en un tiempo mayor, los resultados podrían ser distintos.

En una revisión sobre la proteína Akt realizada por Zhao y su grupo de investigación de la Universidad de Stanford, describieron que la vía de señalización de la proteína Akt ha estado involucrada en los mecanismos de supervivencia celular, incluso después de un accidente isquémico disminuyendo la muerte celular. Además de esto, también encontraron que generalmente la proteína Akt se fosforila en mayor medida cuando ha ocurrido la reperfusión después de un evento isquémico, lo que indica que cuando se da la reperfusión, la proteína Akt está más activa (Zhao, Sapolsky, & Steinberg, 2006). Es por esto que esta fue la proteína blanco de estudio en este proyecto de investigación.

Expresión y fosforilación de la proteína Akt

De acuerdo con los resultados mostrados en la sección anterior, no se encontraron diferencias significativas en la expresión total de la proteína Akt cuando ocurría el tratamiento preconditionante en el grupo B (Figura 7B). Esto significa que los niveles de esta proteína en la corteza cerebral de ratas isquémicas con preconditionamiento y de ratas isquémicas con preconditionamiento SHAM no se modificó; o si se dio el proceso de transcripción de genes que codifican para la proteína Akt en el tiempo de sobrevida del Biomodelo, este proceso fue similar tanto con tratamiento preconditionante como sin este tratamiento. Es por esto que la expresión total de proteína Akt analizada en la corteza de las ratas Wistar objeto de estudio no varió significativamente.

Este resultado puede explicarse ya que como se evaluó el preconditionamiento temprano, no se da el tiempo suficiente para que ocurra la expresión génica de la proteína Akt, debido a que el tratamiento preconditionante se realiza una hora antes de la isquemia letal. Se ha demostrado que la expresión génica en el preconditionamiento tardío, ocurre al menos 24 horas después de realizado el preconditionamiento isquémico.

Por otro lado, la versión fosforilada de la proteína Akt en los residuos objeto de estudio (Ser 473 y Thr 308) es la forma activa de esta proteína y quien se va a encargar de activar vías moleculares de supervivencia celular e inhibir las vías pro-apoptóticas. Debido a esto no se realizó el proyecto de investigación evaluando

solamente la expresión total de esta proteína quinasa, sino que también se evaluaron sus dos versiones fosforiladas (p-Akt Ser 473 y p-Akt Thr 308).

Con respecto a las versiones fosforiladas objeto de estudio de la proteína Akt, se encontró que hubo diferencias significativas de las fosforilaciones entre el grupo A y el grupo B, con un mayor nivel de fosforilación en el grupo B (Ver Figuras 8B y 9B). Este resultado se pudo observar tanto en la fosforilación de la Serina 473 y como de la Treonina 308. Como se mencionó en la sección del marco teórico, la proteína Akt presenta su actividad máxima cuando los dos residuos (Ser 473 y Thr 308) están fosforilados y una actividad parcial cuando sólo se da la fosforilación en la Thr 308 (Song, Ouyang, & Bao, 2005). Al encontrarse que hubo diferencias estadísticamente significativas en la fosforilación de estos dos aminoácidos evaluados en los grupos A y B, y que la tendencia siempre fue a una mayor fosforilación en el grupo B, se puede inferir que al realizar el tratamiento preconditionante, la proteína Akt es fosforilada por distintas vías como mecanismo neuroprotector ante un episodio posterior de isquemia.

Además de lo anterior, al relacionar los resultados obtenidos en las Figuras 8B y 9B, con los presentes en la Figura 7B, se puede concluir que a pesar de que no hubo mayor expresión de la proteína Akt, la cantidad de proteína Akt presente en la corteza cerebral de las ratas va a tender a fosforilarse en mayor medida (en Ser 473 y Thr 308) cuando ocurre el preconditionamiento isquémico como forma de protección celular aumentando su actividad; por otro lado, al observar los resultados de la Gráfica 1, podría inferirse que la disminución en el tamaño del infarto observada en estudios previos del laboratorio, está relacionada con el aumento en la fosforilación de los residuos Ser 473 y Thr 308 de la proteína Akt. Estos resultados sugieren que, aunque el nivel total de la proteína Akt no presentó diferencias significativas entre los dos grupos que fueron objeto de estudio, cuando se da el tratamiento preconditionante sobre las ratas, la proteína Akt va a ser fosforilada en su Ser 473 y Thr 308, lo cual disminuirá la muerte celular y/o aumentará la supervivencia neuronal, y esta a su vez podría ser la causa de la disminución del tamaño del infarto observada en la Gráfica 1.

Por otro lado, investigaciones previas realizadas en el laboratorio de fisiología animal celular de la universidad Icesi, encontraron que la proteína Akt y la proteína GSK-3 β , estuvieron involucradas en el mecanismo de neuroprotección ofrecido por la glucosamina, cuando ocurre un evento isquémico (Quintero, 2014) (Viveros Araque, 2014). La proteína GSK-3 β o glucógeno sintasa quinasa 3-beta es una proteína que se inhibe al ser fosforilada en su Ser 9 por la proteína Akt, cuando esta última se encuentra activada (Endo, Nito, Kamada, Nishi, & Chan, 2010). Se ha encontrado que la proteína GSK-3 β causa la apoptosis al inhibir los factores de transcripción que promueven la supervivencia y activando a factores de transcripción pro-apoptóticos (Jacobs, y otros, 2012)

A partir de lo anterior, podría decirse que si hubo una mayor actividad de la proteína Akt en la corteza cerebral de las ratas del grupo B, se esperaría que también hubiese mayor cantidad de proteína GSK-3 β fosforilada es decir, inactiva, y por ende la

muerte neuronal por vías apoptóticas se vería disminuida. Este mecanismo molecular explica cómo el preconditionamiento isquémico y la proteína Akt promueven la supervivencia celular y disminuyen el tamaño del infarto que se observa en la Gráfica 1, tal y como lo han encontrado otros autores (Song, Ouyang, & Bao, 2005) (Zhao, Sapolsky, & Steinberg, 2006).

O-GlcNAción evaluada con el anticuerpo RL2

Con respecto a la glicosilación de tipo O-GlcNAc evaluada con el anticuerpo RL2, se encontró que esta modificación post-traducciona presentó diferencias significativas entre los dos grupos evaluados, encontrándose que se realizó en mayor medida esta modificación cuando se sometió a la rata a preconditionamiento previo al ictus isquémico. Se ha encontrado que el incremento de las O-GlcNAcificación protege al corazón de las ratas y los ratones contra el daño provocado por los eventos isquémicos, al disminuir el estrés oxidativo mitocondrial (Hirose, y otros, 2011) (Liu J. , 2006) (Vaidyanathan, Durning, & Wells, 2014). Por otro lado, también se encontró que este tipo de glicosilación se ve aumentada en cerebros con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, protegiendo al cerebro contra los efectos neurodegenerativos relacionados con la enfermedad (Vaidyanathan, Durning, & Wells, 2014).

Teniendo en cuenta que varios estudios han encontrado un efecto protector en la glicosilación de tipo O-GlcNAc, y que hubo un aumento en este tipo de modificación post-traducciona en el grupo que recibió tratamiento preconditionante, se puede relacionar que el efecto neuroprotector dado por este tratamiento, además de estar mediado por un aumento en la activación de la proteína Akt, también está mediado por un aumento en esta clase de glicosilación.

A partir de esto puede establecerse una relación entre el aumento de las glicosilaciones de tipo O-GlcNAc y de la activación de la proteína Akt. La técnica Western Blot utilizando el anticuerpo RL2, muestra las glicosilaciones tipo O-GlcNAc total, es decir de todas las proteínas que presenten este tipo de modificación post-traducciona en el homogenizado de corteza cerebral. Esta modificación post-traducciona regula la función de muchas proteínas de distintas formas, puede activarlas, inactivarlas, potenciar su actividad, entre otras. Por lo cual, después de ocurrido el ictus isquémico, puede especularse que la glicosilacion O-GlcNAc activa a proteínas que están encargadas de la activación de la proteína Akt cascada abajo, o por el contrario, inhibe a las proteínas que causan la inactivación de la proteína Akt. Cualquiera de los dos procesos antes mencionados causó el aumento de la fosforilación en los residuos Ser 473 y Thr 308 de la proteína Akt en el cerebro de las ratas con el tratamiento preconditionante, tal como se evidencia en las Gráficas 4 y 5.

Investigaciones previas han encontrado que la proteína PDK1, quien se encarga de la fosforilación de la proteína Akt en el residuo de Thr 308, es O-GlcNAcificada inhibiendo la fosforilación de IRS-1, lo cual, aguas abajo causará la inactivación de Akt (Whelan, Dias, Lakshmanan, Lane, & Hart, 2010). Por otro lado, otro artículo

también encontró que esta proteína puede ser O-GlcNAcilada lo que es un regulador negativo en la señal de la insulina, lo cual reduce al final la activación de la proteína Akt (Ruan, Singh, Li, Wu, & Yang, 2013). Al relacionar esta evidencia con los resultados encontrados en el laboratorio, se puede suponer que el aumento de la O-GlcNAcilación no implica que PDK1 se encuentre O-GlcNAcilada, y por el contrario, se ha O-GlcNAcilado otra quinasa que se encargará del aumento en la fosforilación de la proteína Akt en el residuo de Thr 308. Por otro lado, con respecto a la proteína mTORC2, quien es la encargada de fosforilar a la proteína Akt en el residuo de Serina 473, no se ha encontrado evidencia reciente que sugiera que esta pueda ser glicosilada afectando su actividad.

En relación a las fosfatasas que se encargan de la des-fosforilación de la proteína Akt en los residuos de Serina 473 y Treonina 308, se ha reportado que las proteínas encargadas de la remoción de los grupos fosfato son la PHLPP (PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase) y la PP2A (protein phosphatase 2A) respectivamente (Chan, y otros, 2014); este par de proteínas, al desfosforilar a la proteína Akt se encargarán a su vez de su inactivación. No se encontró algún reporte que mencioné que estas proteínas pueden ser O-GlcNAciladas y su posible efecto sobre estas.

Con respecto a la proteína Akt, se ha encontrado que esta proteína, también puede sufrir O-GlcNAcilaciones sobre diversos residuos (RCSB PDB: Proteín Data Bank, 2016). Relacionando esto con la Figura 6 y con los resultados obtenidos en los cuales hubo un aumento en la fosforilación de la proteína Akt en los residuos Serina 473 y Treonina 308, tendríamos que sugerir que si Akt es una de las proteínas en las que está aumentando la O-GlcNAcilación, esta estaría al parecer coexistiendo con la fosforilación como se muestra en la Figura 6C. Para poder afirmar si la relación entre fosforilación y O-GlcNAcilación sobre Akt es de competencia o de coexistencia, tendríamos que inmunoprecipitar Akt y estudiar por medio de western blot con el anticuerpo RI2 su grado de O-GlcNAcilación.

Con esto se supone que tanto el aumento en las glicosilaciones, como la activación de la proteína Akt podrían ser las responsables de la reducción del tamaño del infarto observada en la Gráfica 1. Lo cual indica el efecto neuroprotector brindado por la vía de señalización de la proteína Akt cuando las ratas son sometidas a preconditionamiento isquémico.

****Inconvenientes técnicos:*** Durante el periodo de realización de las cirugías, las ratas sufrieron una infección pulmonar, por lo cual todas las ratas pertenecientes al grupo de investigación tuvieron que ser sacrificadas. Esto causó que no se pudiese realizar las cirugías correspondientes al grupo control Sham-Sham para evaluar el estado basal de la proteína Akt y de la O-GlcNAcilación.

2.7. CONCLUSIONES

- La proteína Akt podría mediar el efecto neuroprotector brindado por el preconditionamiento isquémico, al aumentar su activación (fosforilación) cuando ocurre un evento isquémico.
- El preconditionamiento isquémico no causa un aumento en la expresión total de la proteína Akt, lo cual indica que no hay una modificación en la traducción de esta proteína cuando ocurre el ictus isquémico.
- La glicosilación de tipo O-GlcNAc aumentó en el grupo de ratas que fueron sometidas a preconditionamiento isquémico como un posible mecanismo de protección neuronal

2.8. RECOMENDACIONES

- Se propone complementar el test de García, con otros tipos de test como el de 28 puntos, como el utilizado por el laboratorio de neurociencias funcional y comportamental de la Universidad de Stanford (Anexo 8)
- Evaluar la realización del tratamiento preconditionante, variando el tiempo de este, de acuerdo con otros artículos, con el objetivo de observar si el tiempo de preconditionamiento provoca un cambio en la expresión total de la proteína Akt
- Realizar el procedimiento utilizando un grupo control Sham-Sham, el cual consiste en que el cerebro de las ratas es extraído sin que a estas hayan sido sometidas a ictus isquémico y a tratamiento preconditionante. Esto se sugiere con el objetivo de conocer las cantidades basales de la proteína Akt total, de su versión fosforilada en los residuos de Ser 473 y Thr 308 y de la O-GlcNAcilación.
- Realizar el procedimiento utilizando un grupo en el cual sólo se sometan las ratas al tratamiento preconditionante, sin necesidad de la inducción a isquemia para conocer la expresión total, la fosforilación (Ser 473 y Thr 308) de la proteína Akt y la O-GlcNAcilación cuando sólo ocurre el preconditionamiento isquémico
- Trabajar con mayor número de animales en cada grupo experimental con el objetivo de aumentar la rigurosidad del análisis estadístico.
- Realizar nuevamente el procedimiento mencionado en este proyecto, evaluando la expresión y fosforilación de la proteína GSK-3 β , con el fin de observar si hay diferencias significativas en su actividad cuando se da el tratamiento preconditionante.

3. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, N., Grimes, L., Bellacosa, A., Chan, T., & Tschlis, P. (1997). Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 3627-3632.
- Arana Chacón, A., Uribe Uribe, C. S., Muñoz Berrio, A., Salinas Durán, F. A., & Celis Mejía, J. I. (s.f.). *Guía de Práctica clínica basada en la evidencia. Enfermedad cerebrovascular*. Medellín, Colombia: Asociación Colombiana de Facultades de Medicina - ASCOFAME.
- Asociación Colombiana de Neurología. (30 de Octubre de 2015). *Guía Neurológica 8. Enfermedad Cerebrovascular*. Obtenido de Capítulo 2. Comportamiento epidemiológico de la enfermedad cerebrovascular en la población colombiana: <http://www.acnweb.org/es/publicaciones/guia-8-ecv/322-comportamiento-epidemiologico-de-la-enfermedad-cerebrovascular-en-la-poblacion-colombiana.html>
- Auriel, E. (2009). Anatomy and Pathophysiology of Stroke. En N. Bornstein, *Stroke: Practical Guide for Clinicians* (págs. 1-8). Israel: Karger.
- Bio-Rad Laboratories. (s.f.). *Bio-Rad Protein Assay*. U.S.A.
- Castillo, J., Blanco, M., Rodríguez-Yañez, M., Sobrino, T., & Leira, R. (2009). Estrategias neuroprotectoras. En J. Montaner, *Tratamiento del ictus isquémico* (págs. 109-125). Barcelona, España: Marge Medica Books.
- Chan, C.-H., Jo, U., Kohrman, A., Rezaeian, A. H., Chou, P.-C., Logothetis, C., & Lin, H.-K. (2014). Posttranslational regulation of Akt in human cancer. *Cell & Bioscience*, 4:59, 1-9.
- Cherry, A., & Stella, N. (2014). G protein-coupled receptors as oncogenic signals in glioma: emerging therapeutic avenues. *Neuroscience*, 222-236.
- Dave, K. R., DeFazio, A., Raval, A. P., Torraco, A., Saul, I., Barrientos, A., & Perez-Pinzon, M. A. (2008). Ischemic preconditioning targets the respiration of synaptic mitochondria via protein kinase C. *Neurobiology of Disease. The Journal of Neuroscience* 28, 4172– 4182.
- Dreixler, J., Hemmert, J., Shenoy, S., Shen, Y., Lee, T., Shaikh, A., . . . Roth, S. (2009). The role of Akt/protein kinase B subtypes in retinal ischemic preconditioning. *Experimental eye research*, 512-521.
- Encinas Martín, M. (2001). *Tesis: Señalización por TrkB y Ret: Vías implicadas en la supervivencia y diferenciación neuronal*. Lleida, España: Universitat de Lleida.

- Endo , H., Nito, C., Kamada, H., Nishi, T., & Chan, P. (2010). Activation of the Akt/GSK3 β signaling pathway mediates survival of vulnerable hippocampal neurons after transient global cerebral ischemia in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 26, 1479-1489.
- Fábregas, N., & Valero, R. (2009). *Fisiología cerebral y monitorización neurológica y de la profundidad anestésica*. Barcelona, España: Societat Catalana d' Anestesiologia.
- Fernandez Travieso, J. C. (2014). Enfermedad cerebrovascular: incidencia y tratamiento actual. *CENIC. Ciencias biológicas* 45, 152-177.
- Friguls, B., Petegnief, V., Justicia, C., Pallás, M., & Planas, A. (2002). Activation of Erk and Akt signaling in focal cerebral ischemia: Modulation by TGF- α and involvement of NMDA receptor. *Neurobiology of disease*, 11, 443-456.
- Hirose, K., Tsutsumi, Y., Tsutsumi, R., Shono, M., Katayama, E., Kinoshita, M., . . . Oshita, S. (2011). Role of the O-linked β -N-acetylglucosamine in the cardioprotection induced by isoflurane. *Anesthesiology*, 115, 955-962.
- Iliodromitis, E., Lazou, A., & Kremastinos, D. (2007). Ischemic preconditioning: Protection against myocardial necrosis and apoptosis. *Vascular Health and Risk Management*, 629-637.
- Ishrat, T., Sayeed, I., Atif, F., Hua, F., & Stein, D. G. (2012). Progesterone is neuroprotective against ischemic brain injury through its effects on the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway. *Neuroscience*, 210, 442-450.
- Issad, T. (2010). O-GlcNAc glycosylation et régulation de la signalisation cellulaire. *Medecine/Sciences*, 26, 753-759.
- Jacobs , K., Bhave, S., Ferraro, D., Jaboin, J., Hallahan, D., & Thotala, D. (2012). GSK-3 β : A Bifunctional Role in Cell Death Pathways. *International Journal of Cell Biology*, 1-11.
- Jensen , R., Johnsen, J., Kristiansen, S., Zachara, N., & Botker, H. (2013). Ischemic preconditioning increases myocardial O-GlcNAc glycosylation. *Scandinavian Cardiovascular Journal*, 168-174.
- Lai, C.-C., Tang, C.-Y., Chiang, S.-C., Tseng, J.-W., & Huang, C.-H. (2015). Ischemic preconditioning activates prosurvival kinases and reduces myocardial apoptosis. *Journal of Chinese Medical Association*, 78, 460-468.
- Liu, J. (2006). *Increased hexosamine biosynthesis and protein O-GlcNAc protect isolated rat heart from ischemia/reperfusion injury*. Birmingham, Alabama: University of Alabama.

- Liu, T., Fang, Y., Liu, S., Yu, X., Zhang, H., Liang, M., & Ding, X. (2015). Limb ischemic preconditioning protects against contrast-induced acute kidney injury in rats via phosphorylation of GSK-3 β . *Free radical biology and medicine*, *81*, 170-182.
- Manning , B., & Cantley, L. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*, *129*, 1261-1274.
- Murry, C. E., Jennings, R. B., & Reimer, K. A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation. Journal of the American Heart Association* *74*, 1124-1136.
- Muscari, C., Giordano, E., Bonafé, F., Govoni, M., Pisini, A., & Guarnieri, C. (2013). Molecular mechanisms of ischemic preconditioning and postconditioning as putative therapeutic targets to reduce tumor survival and malignancy. *Medical Hypotheses* *81*, 1141-1145.
- Namura, S., Nagata, I., Kikuchi, H., Andreucci, M., & Alessandrini, A. (2000). Serine-Threonine protein kinase Akt does not mediate ischemic tolerance after global ischemia in the Gerbil. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, *20*, 1301-1305.
- National Institute of Neurological Disorders and Stroke. (24 de Mayo de 2016). *Accidente cerebrovascular: Esperanza en la investigación*. Obtenido de http://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/accidente_cerebrovascular.htm#CVA
- Organización Panamericana de la Salud. (30 de Octubre de 2015). *Situación de Salud en las Américas. Indicadores Básicos 2012*. Obtenido de Causas Principales de Mortalidad en las Américas: http://ais.paho.org/hip/viz/mort_causasprincipales_lt_oms.asp
- Pinzón, C. E., Serrano, M. L., & Sanabria, M. C. (05 de Noviembre de 2015). *Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos*. Obtenido de Revista Ciencias de la Salud, *7*(2), 47-66: http://www.scielo.unal.edu.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-72732009000200007&lng=es&nrm=
- Quintero, J. (2014). *Efectos del tratamiento con glucosamina sobre los niveles de expresión y de fosforilación de la proteína AKT en un modelo de isquemia cerebral focal*. Cali, Colombia: Universidad Icesi.
- RCSB PDB: Protein Data Bank. (05 de Noviembre de 2015). *RAC-alpha serine/threonine-protein kinase - P31749 (AKT1_HUMAN)*. Obtenido de Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/protein/P31749?evtc=Suggest&evta=ProteinFeature%20View&evtl=OtherOptions>

- RCSB PDB: Proteín Data Bank. (29 de Junio de 2016). *RAC-beta serine/threonine-protein kinase - P31751 (AKT2_HUMAN)*. Obtenido de <http://www.rcsb.org/pdb/protein/P31751>
- Ruan, H.-B., Singh, J. P., Li, M.-D., Wu, J., & Yang, X. (2013). Cracking the O-GlcNAc Code in Metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism*, 24, 301-309.
- Sadidi, M., Lentz, S., & Feldman, E. (2009). Hydrogen peroxide-induced Akt phosphorylation regulates Bax activation . *Biochimie*, 577-585.
- Sánchez-Chávez, J. J. (1999). El área de penumbra. *Revista de Neurología*, 28, 810-816.
- Sisalli, M. J., Annunziato, L., & Scorziello, A. (2015). Novel cellular mechanisms for neuroprotection in ischemic preconditioning: a view from inside organelles. *Frontiers in Neurology* 6, Artículo 115.
- Snell, R. S. (2007). *Neuroanatomía clínica 6ed*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Song, G., Ouyang, G., & Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of Cellular and molecular Medicine*, 9, 59-71.
- Sosa, I., Mengana, Y., García, J. D., Subiros, N., Cruz, J., Muñoz, A., & García, J. (2008). La eritropoyetina humana recombinante como terapia para la neuroprotección en la isquemia cerebral. *Bioteccnología aplicada*, 25, 216-222.
- Stanojlovic, M., Gusevac, I., Grkovic, I., Zlatkovic, J., Mitrovic, N., Zaric, M., . . . Drakulic, D. (2015). Effects of chronic cerebral hypoperfusion and low-dose progesterone treatment on apoptotic processes, expression and subcellular localization of key elements within Akt and Erk signaling pathways in rat hippocampus. *Neuroscience*, 311, 308-321.
- Stenzel-Poore, M. P., Stevens, S. L., & Simon, R. P. (2004). Genomics of preconditioning. *Stroke. Journal of the American Heart Association* 35, 2683-2686.
- Tanaka, H., Yokota, H., Jover, T., Cappuccio, I., Calderone, A., Simionescu, M., . . . Zukin, S. (2004). Ischemic Preconditioning: Neuronal Survival in the Face of Caspase-3 Activation. *Cellular/Molecular. The Journal of Neuroscience* 24, 2750 –2759.
- Torregrosa, G., Salom, J. B., Jover-Mengual, T., & Alborch, E. (2007). Fisiopatología básica: de la oclusión arterial a la muerte neuronal. En J. Montaner, *Fisiopatología de la isquemia cerebral* (págs. 13-33). Barcelona, España: Marge Medical Books.

- Tsutsui, H., Tanaka, R., Yamagata, M., Yukimura, T., Ohkita, M., & Matsumura, Y. (2013). Protective effect of ischemic preconditioning on ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury through sympathetic nervous system in rats. *European Journal of Pharmacology*, 718, 206-212.
- Vaidyanathan, K., Durning, S., & Wells, L. (2014). Functional O-GlcNAc modifications: Implications in molecular regulation and pathophysiology. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 49(2), 140-163.
- Viveros Araque, E. (2014). *Caracterización de los niveles de expresión de la proteína GSK-3 β en un modelo animal de isquemia cerebral focal en tratamiento con glucosamina*. Cali, Colombia: Universidad Icesi.
- Wang, Y., Reis, C., Applegate II, R., Stier, G., Martin, R., & Zhang, J. H. (2015). Ischemic conditioning-induced endogenous brain protection: Applications pre-, per- or post-stroke. *Experimental Neurology*, <http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.04.009>.
- Whelan, S., Dias, W., Lakshmanan, T., Lane, D., & Hart, G. (2010). Regulation of Insulin Receptor 1 (IRS-1)/AKT Kinase Mediated Insulin Signaling by O-linked β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) in 3T3-L1 Adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 5204-5211.
- Williams, T., Waksman, R., De Silva, K., Jacques, A., & Mahmoudi, M. (2015). Ischemic preconditioning-an unfulfilled promise. *Cardiovascular revascularization medicine*, 16, 101-108.
- World Health Organization . (30 de Octubre de 2015). *Prevención y control de las enfermedades cardiovasculares*. Obtenido de Enfermedades Cardiovasculares: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/es/
- World Health Organization. (1989). World Health Organization recommendations for prevention, diagnosis and treatment of strokes. *InPharma*, 11.
- World Health Organization. (30 de Octubre de 2015). *Accidente Cerebrovascular*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: http://www.who.int/topics/cerebrovascular_accident/es/
- World Health Organization. (30 de Octubre de 2015). *Projection of number of deaths for 2015-2030*. Obtenido de Global Health Observatory Data Repository: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.PROJNUMWORLD?lang=en>
- Zarco, L. A., Gonzáles, F., & Casas, J. C. (2008). Tratamiento actual del ataque cerebrovascular isquémico (ACV) agudo. *Revista Universitas Médica, Colombia*, 467-498.

- Zeldan, Q., & Hart, G. (2010). The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. *Journal of Cell Science*, 123, 13-22.
- Zhao, H., Sapolsky, R., & Steinberg, G. (2006). Phosphoinositide-3-Kinase/Akt survival signal pathways are implicated in neuronal survival after stroke. *Molecular Neurobiology*, 34, 249-269.
- Zhou, J., Du, T., Li, B., Rong, Y., Verkhatsky, A., & Peng, L. (2015). Crosstalk Between MAPK/ERK and PI3K/AKT Signal Pathways During Brain Ischemia/Reperfusion. *American Society for Neurochemistry*, 1-16.

4. ANEXOS

Anexo 1. Aprobación del comité de ética CIECUAE



Santiago de Cali, Febrero 25 de 2013
CIECUAE-009/2013

Dr. César Augusto Arango Dávila, MD Psiquiatra, MSc, PhD
Investigador principal -
Dr. Juliana Rengifo Gómez, MSc, PhD
Dr. Alejandro Vera González, MD, Estudiante de Doctorado
Cali

Asunto: Aprobación de Proyecto -Isquemia Cerebral con preconditionamiento

El día 8 de Febrero del presente año, los miembros del CIECUAE de la Universidad Icesi, se reunieron y aprobaron el siguiente proyecto de investigación, dando cumplimiento a la Ley 84 de 1989 y a la resolución de Rectoría N° 847 (9 de julio de 2012):

"Evaluación proteómica y funcional de los fenómenos de glicosilación tipo O-glcNAc y sus implicaciones terapéuticas en un modelo experimental de preconditionamiento, isquemia y reperusión cerebral" -Versión 2.

La presente se firma, el día (25), mes (Febrero), del año (2013)

Cordialmente,

Gabriel Jaime Echeverri, M.D
Presidente -CIECUAE- Universidad Icesi

Calle 18 No. 122-135
PBX: (57-2) 555 2334, Fax (57-2) 555 2345
Cali - Colombia
www.icesi.edu.co

Anexo 2. Parámetros para la evaluación neurológica de las ratas pre y post-isquémica utilizando el test de García.

Prueba	Calificación			
	0	1	2	3
Actividad espontánea (en la jaula por 5 min)	Sin movimiento	Pocos movimientos	Se desplaza para tocar 1 o 2 lados de la caja	Se desplaza para tocar 3 o 4 lados de la caja
Simetría de los movimientos (cuatro extremidades)	Lado izquierdo: sin movimiento	Lado izquierdo: Movimiento muy pequeño	Lado izquierdo: Se mueve muy despacio	Ambos lados: Movimiento simétrico
Simetría de las patas delanteras (extensión mientras está sujeta por la cola)	Lado izquierdo: sin movimiento, sin extensión	Lado izquierdo: leve movimiento de extensión	Lado izquierdo: Se mueve y extiende menos que el lado derecho	Extensión simétrica
Escalada de la jaula de metal		No escala	Lado izquierdo débil	Escalada normal
Reacción al tocar cualquier lado del tronco		Sin respuesta en el lado izquierdo	Respuesta débil en el lado izquierdo	Respuesta simétrica
Respuesta a la estimulación de las vibrisas		Sin respuesta en el lado izquierdo	Respuesta débil en el lado izquierdo	Respuesta simétrica
Caminata sobre el piso	No camina	Camina en círculos solamente	Sigue un camino curvilíneo	Camina derecho

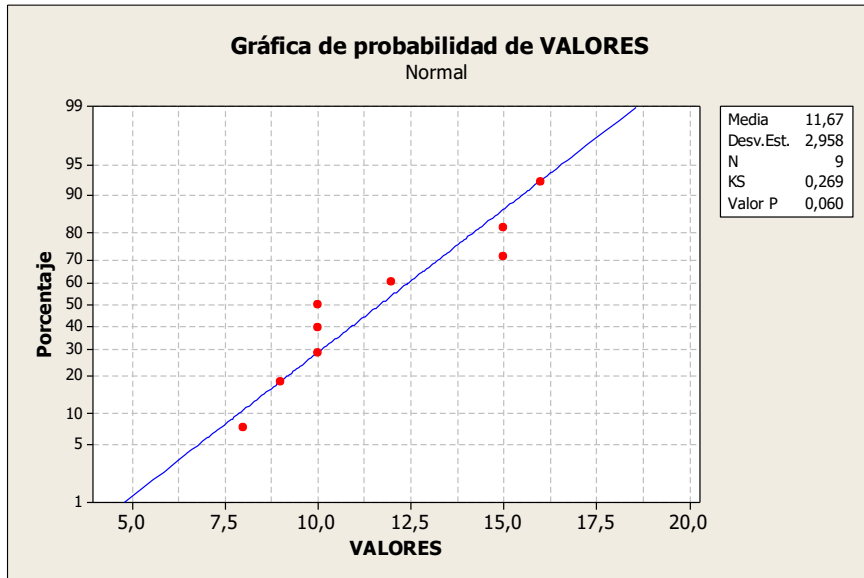


Gráfica 3. Resultados promedio de la evaluación neurológica de las ratas aplicando el test de García antes del sacrificio. Donde ISQ=Grupo A y PISQ=Grupo B

Ya que las pruebas estadísticas realizadas, tienen un nivel de confianza del 95%, se plantearon las siguientes hipótesis para los supuestos de normalidad y de homogeneidad de las varianzas. Si el valor P es mayor a 0,05 se acepta la hipótesis nula

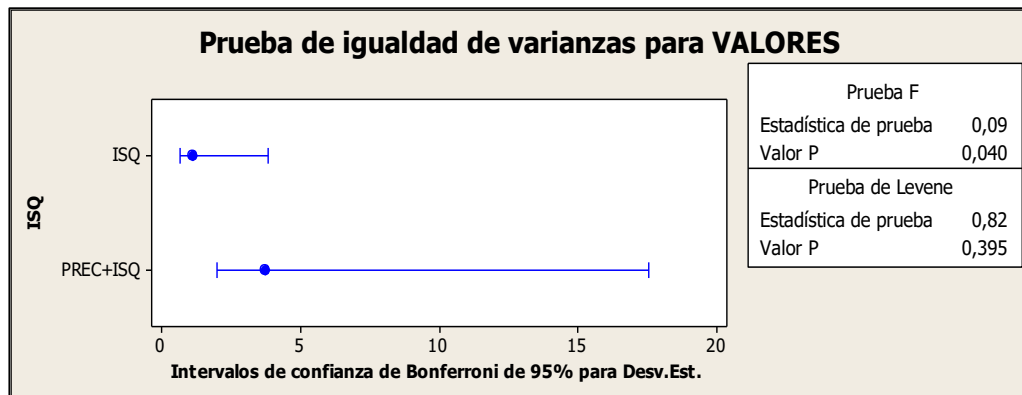
- Normalidad de los datos
 - Ho: Los datos tienen comportamiento normal
 - Ha: Los datos no tienen comportamiento normal

- Homogeneidad de las varianzas
 - Ho: Las varianzas son iguales
 - Ha: Las varianzas no son iguales



Gráfica 4. Prueba de normalidad de los datos comportamentales al realizar la evaluación neurológica de las ratas obtenidos a partir del Test de García antes del sacrificio

Ya que el valor $P=0,060$, se puede afirmar con un nivel de significancia de 0,05 que los datos tiene comportamiento normal



Gráfica 5. Prueba de igualdad de las varianzas de los datos comportamentales al realizar la evaluación neurológica de las ratas obtenidos a partir del Test de García antes del sacrificio

Ya que el valor $P=0,395$, se puede afirmar con un nivel de significancia de 0,05 que las varianzas son iguales

Como los datos siguen un comportamiento normal y las varianzas son iguales se decidió realizar una prueba t-Student para comparar las medias de los grupos A y B. Se plantearon las siguientes hipótesis con un $\alpha=0,05$

Ho= Las medias de los dos grupos son iguales
 Ha= Las medias de los dos grupos son distintas

Tabla 7. Resultados de la prueba t-Student para comparar las medias de los datos correspondientes a la evaluación neurológica de las ratas antes del sacrificio utilizando el test de García.

Table Analyzed	Unpaired t test data
Column B	PREC+ISQ
vs. Column A	vs, ISQ
Unpaired t test	
P value	0,0959
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=1,923 df=7
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	10,2 ± 0,4899, n=5
Mean ± SEM of column B	13,5 ± 1,848, n=4
Difference between means	3,3 ± 1,716
95% confidence interval	-0,7574 to 7,357
R squared (eta squared)	0,3457
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	11,39, 3, 4
P value	0,0397
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes

Ya que el valor P=0,2540, se acepta la hipótesis nula, por lo cual se puede afirmar que no hay diferencias significativas entre las medias de los grupos A y B

Anexo 3. Muestra de cálculos realizados

- Muestra del cálculo para determinar la concentración de proteína en el homogenizado (Grupo A)

$$y = mx + b$$

$$y = 0,0147x + 0,0496$$

$$A = \epsilon cl$$

$$y = A = 0,135$$

$$m = \epsilon l = 0,0147$$

$$x = c$$

$$b = 0,0496$$

$$c = \frac{A - b}{\epsilon l} = \frac{0,1350 - 0,0496}{0,0147 \frac{\mu g}{mL}} = \frac{5,8095 \frac{\mu g}{mL}}{1/4000} = 23238 \frac{\mu g}{mL}$$

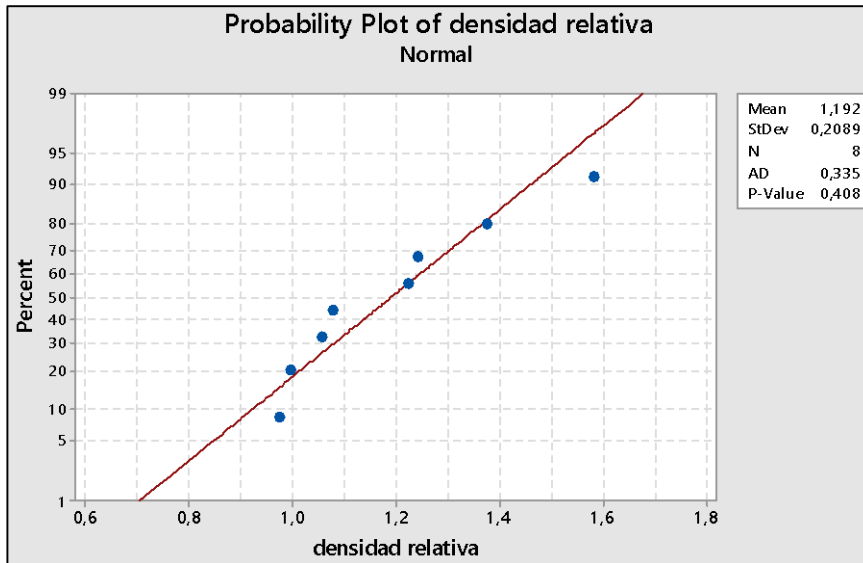
-
- Muestra del cálculo para determinar la cantidad de muestra a servir en cada pozo (Grupo A)

$$\frac{40 \mu g \text{ por pozo}}{23238 \frac{\mu g}{mL}} \times \frac{1000 \mu L}{1 mL} = 1,721 \mu L$$

$$V_{\text{agua}} = 20 \mu L - (1,721 \mu L + 10 \mu L) = 8,279 \mu L \text{ de agua}$$

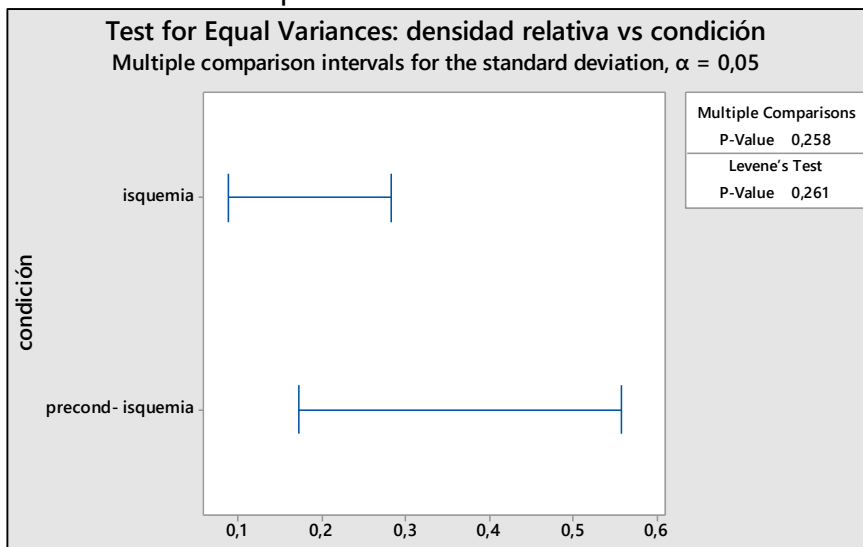
Anexo 4. Resultados de la prueba de normalidad, homogeneidad de las varianzas y de efectos principales para la evaluación de la expresión total de la proteína Akt en la corteza cerebral de las ratas objeto de estudio

*Se aplican las mismas hipótesis del Anexo 2



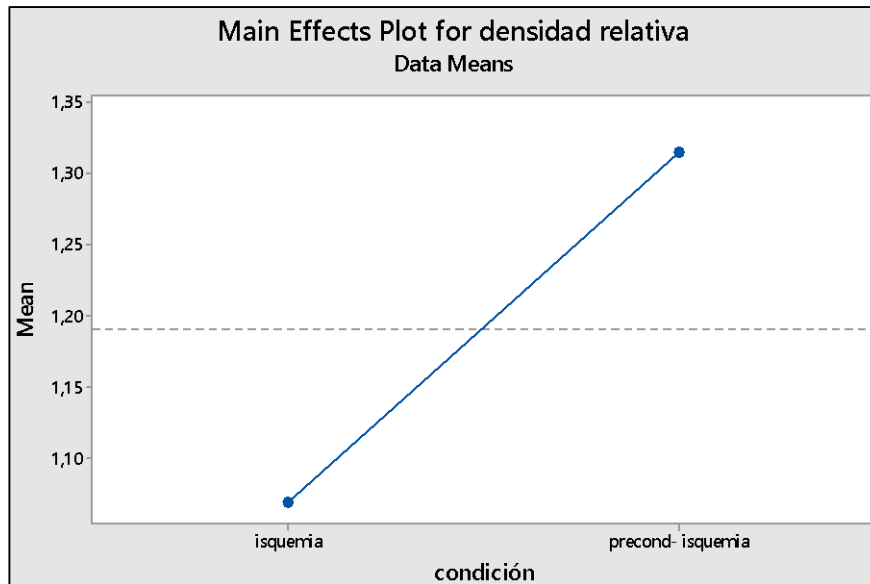
Gráfica 6. Prueba de normalidad de los datos de la expresión de la proteína Akt-total

Ya que el valor $P=0,408$, se puede afirmar con un nivel de significancia de 0,05 que los datos tiene comportamiento normal



Gráfica 7. Prueba de igualdad de las varianzas de los datos de la expresión de la proteína Akt-total

Ya que el valor $P=0,261$, se puede afirmar con un nivel de significancia de 0,05 que las varianzas son iguales



Gráfica 8. Principales efectos del tratamiento preconditionante sobre la expresión de la proteína Akt-total

Ya que los datos tienen un comportamiento normal y las varianzas son iguales, se decidió realizar una prueba t-Student para comparar las medias de los grupos A y B. Con un nivel de significancia de 0,05 se plantearon las siguientes hipótesis

H_0 = Las medias de los dos grupos son iguales

H_a = Las medias de los dos grupos son distintas

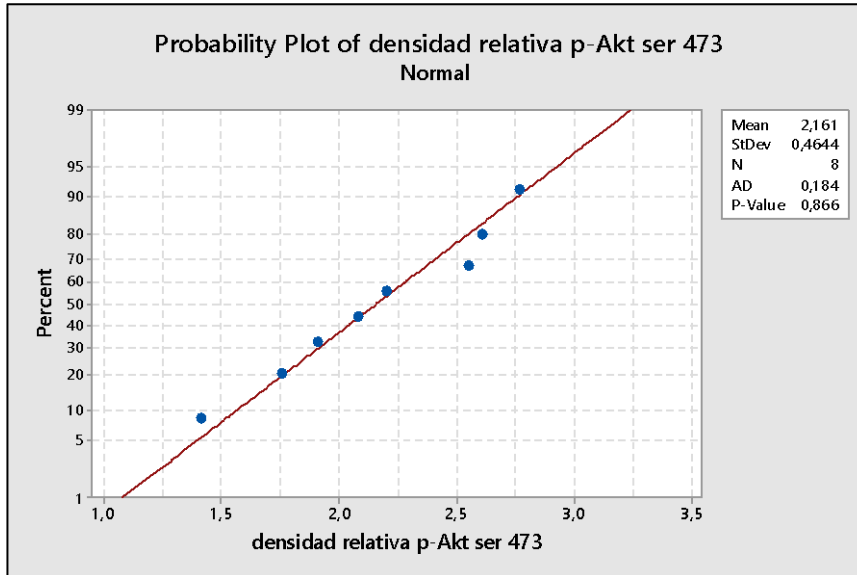
Tabla 8. Resultados de la prueba t-Student para comparar las medias de los datos correspondientes a la expresión de la proteína Akt-total.

Table Analyzed	Data 2
Column C	isquemia
vs	vs
Column D	precon- isquemia
Unpaired t test	
P value	0,0951
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=1.979 df=6
How big is the difference?	
Mean \pm SEM of column C	1.069 \pm 0.05625 N=4
Mean \pm SEM of column D	1.315 \pm 0.1106 N=4
Difference between means	-0.2457 \pm 0.1241
95% confidence interval	-0.5494 to 0.05808
R squared	0,3950
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	3.870, 3, 3
P value	0,2957
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Ya que el valor $P=0,0951$, se acepta la hipótesis nula, por lo cual se puede afirmar que no hay diferencias significativas entre las medias de los grupos A y B

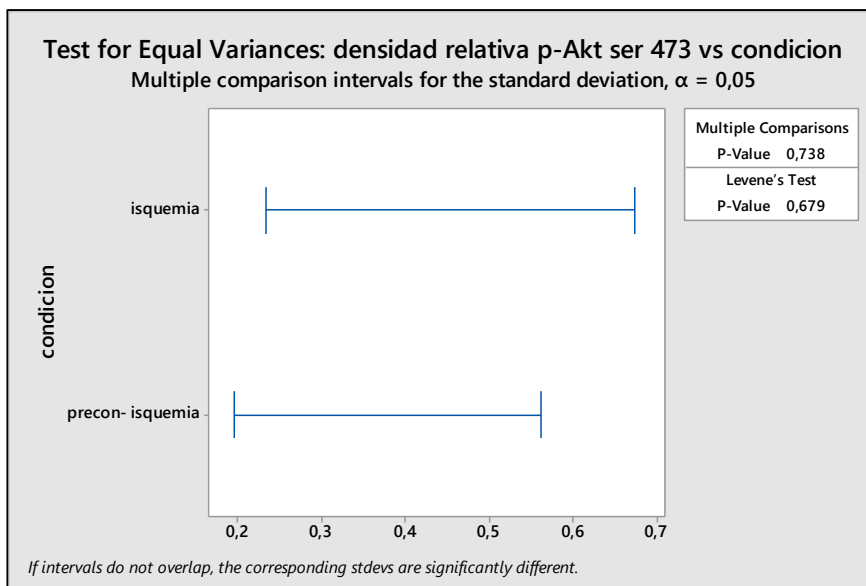
Anexo 5. Resultados de la prueba de normalidad, homogeneidad de las varianzas y de efectos principales para evaluar la fosforilación de la proteína Akt en el residuo de Ser 473

*Se aplican las mismas hipótesis del Anexo 2



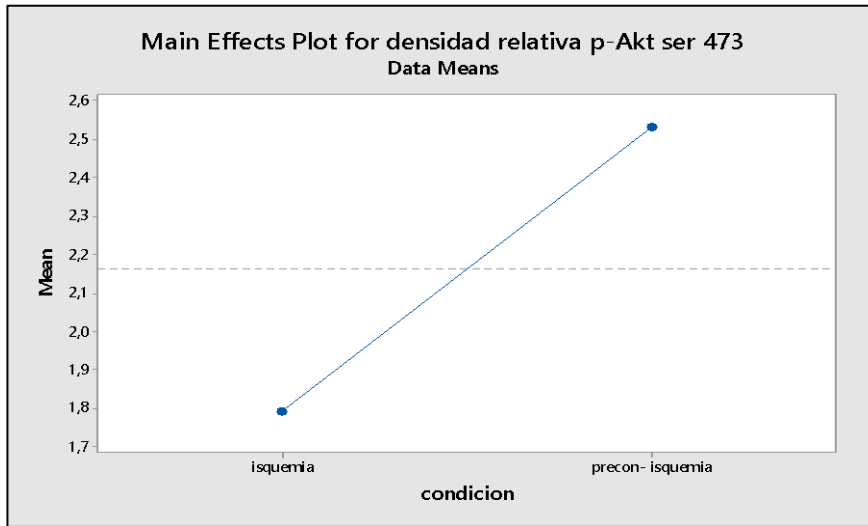
Gráfica 9. Prueba normalidad de los datos de la proteína Akt fosforilada en el residuo de Serina 473

Ya que el valor $P=0,866$, se puede afirmar con un nivel de significancia de 0,05 que los datos tienen comportamiento normal



Gráfica 10. Prueba de igualdad de las varianzas de los datos de la proteína Akt fosforilada en el residuo de Ser 473

Ya que el valor $P=0,679$, se puede afirmar con un nivel de significancia de 0,05 que las varianzas son iguales



Gráfica 11. Principales efectos del tratamiento preconditionante sobre la fosforilación de la proteína Akt en el residuo de Ser 473

Ya que los datos tienen un comportamiento normal y las varianzas son iguales, se decidió realizar una prueba t-Student para comparar las medias de los grupos A y B. Se plantean las mismas hipótesis del Anexo 2.

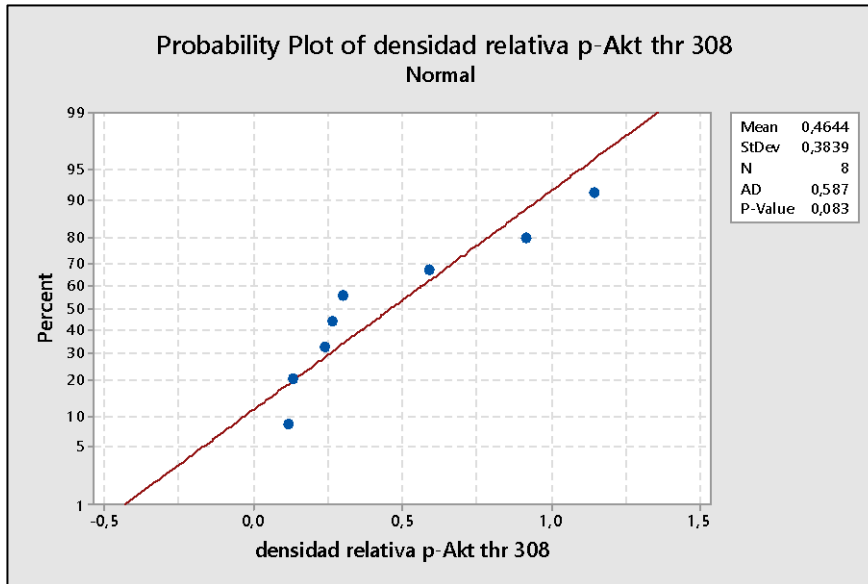
Tabla 9. Resultados de la prueba t-Student para comparar las medias de los datos correspondientes a la fosforilación de la proteína Akt en el residuo de Ser 473

Table Analyzed	Data 1
Column A	isquemia
vs	vs
Column B	precon- isquemia
Unpaired t test	
P value	0,0070
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=4.020 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	1.790 ± 0.1417 N=4
Mean ± SEM of column B	2.532 ± 0.1183 N=4
Difference between means	-0.7419 ± 0.1846
95% confidence interval	-1.194 to -0.2903
R squared	0,7293
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	1.435, 3, 3
P value	0,7737
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Ya que el valor $P=0,0070$, se rechaza la hipótesis nula, por lo cual se puede afirmar que hay diferencias significativas entre las medias de los grupos A y B

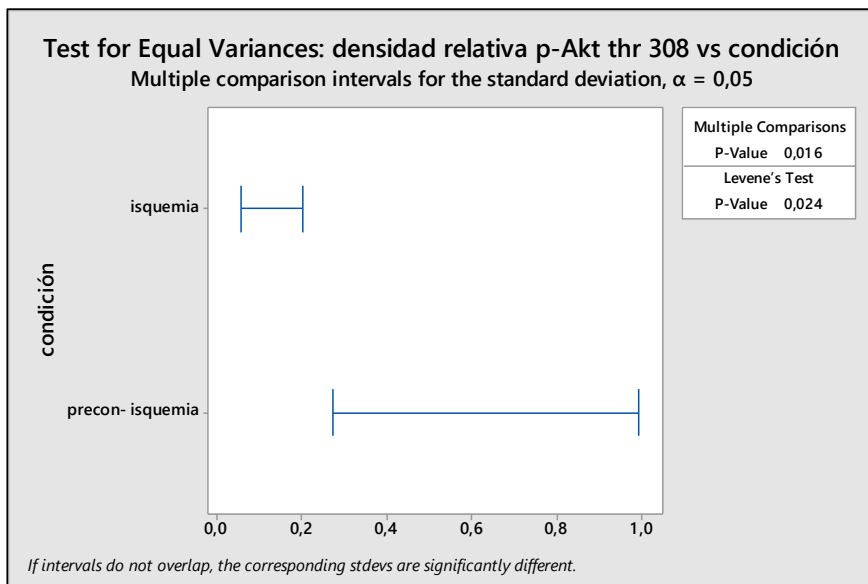
Anexo 6. Resultados de la prueba de normalidad, homogeneidad de las varianzas y de efectos principales de la proteína Akt fosforilada en el residuo de Thr 308

*Se aplican las mismas hipótesis del Anexo 2.



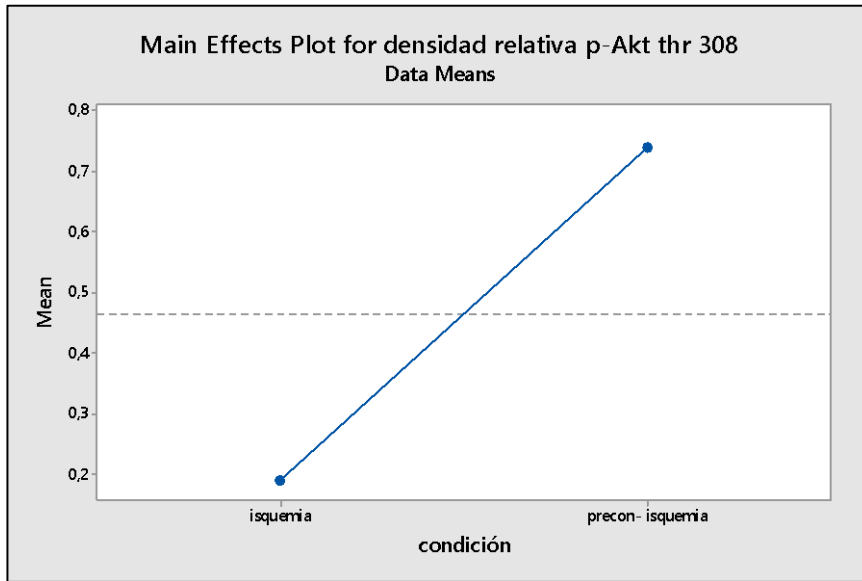
Gráfica 12. Prueba normalidad de los datos de la proteína Akt fosforilada en el residuo de Thr 308

Ya que el valor $P=0,083$, se puede afirmar con un nivel de significancia de 0,05 que los datos siguen un comportamiento normal



Gráfica 13. Prueba homogeneidad de las varianzas de los datos de la proteína Akt fosforilada en el residuo de Thr 308

Ya que el valor $P=0,024$, se puede afirmar con un nivel de significancia de 0,05 que las varianzas no son iguales



Gráfica 14. Principales efectos del tratamiento preconditionante sobre la fosforilación de la proteína Akt en el residuo de Thr 308

A pesar de que los datos siguieron un comportamiento normal, las varianzas no eran iguales, por lo cual se decidió realizar la prueba de Mann Whitney con las mismas hipótesis de la prueba t-Student presente en el Anexo 2.

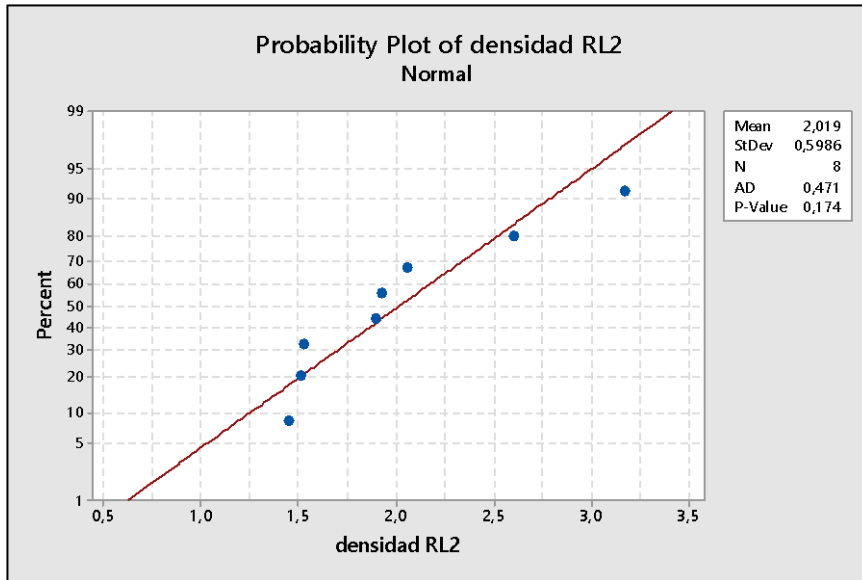
Tabla 10. Resultados de la prueba Mann Whitney para comparar las medias de los datos correspondientes a la fosforilación de la proteína Akt en el residuo de Thr 308

Table Analyzed	Data 1
Column A	isquemia
vs	vs
Column B	precon- isquemia
Mann Whitney test	
P value	0,0286
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	*
Are medians signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	10 , 26
Mann-Whitney U	0,0000

Ya que el valor $P=0,02860$, se rechaza la hipótesis nula, por lo cual se puede afirmar que hay diferencias significativas entre las medias de los grupos A y B

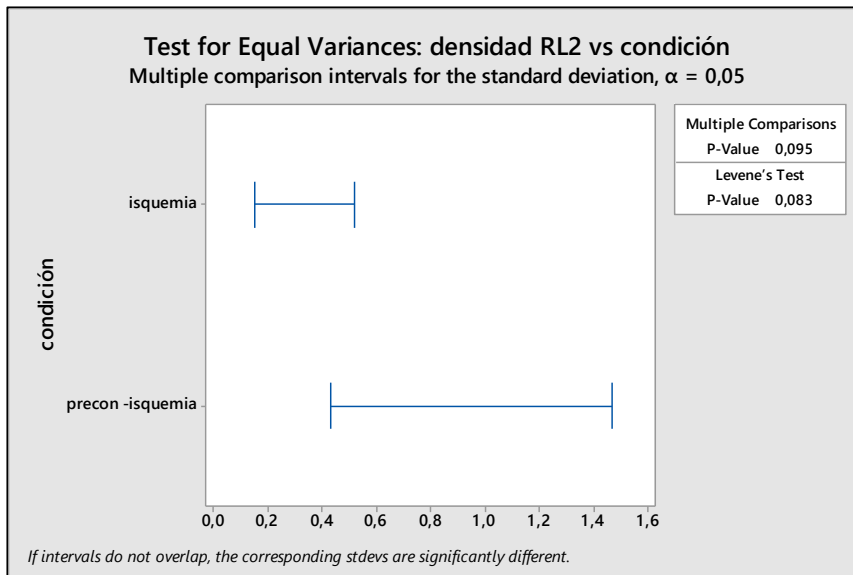
Anexo 7. Resultados de la prueba de normalidad, homogeneidad de las varianzas y de efectos principales de la O-GlcNAcificación total evaluada con el anticuerpo RL2

*Se plantean las mismas hipótesis presentadas en el Anexo 2



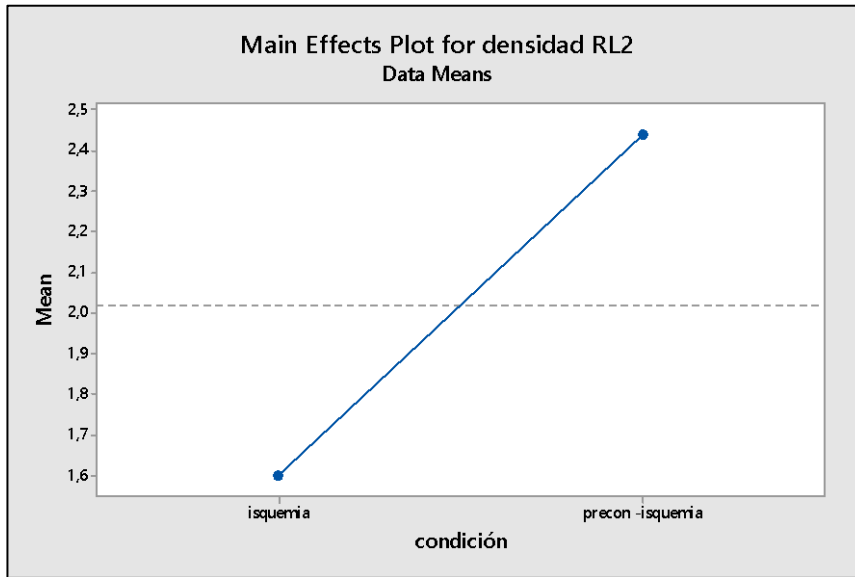
Gráfica 15. Prueba normalidad de los datos de la O-GlcNAcificación total evaluada con el anticuerpo RL2

Ya que el valor $P=0,174$, se puede afirmar con un nivel de significancia de 0,05 que los datos siguen un comportamiento normal



Gráfica 16. Prueba homogeneidad de las varianzas de los datos de la O-GlcNAcificación total evaluada con el anticuerpo RL2

Ya que el valor $P=0,083$, se puede afirmar con un nivel de significancia de 0,05 que las varianzas son iguales



Gráfica 17. Principales efectos del tratamiento preconditionante sobre la O-GlcNAcilación total evaluada con el anticuerpo RL2

Como los datos tienen un comportamiento normal y las varianzas son iguales se decidió realizar una prueba t-Student para comparar las medias de los grupos A y B. Se plantearon las mismas hipótesis expuestas en el Anexo 2.

Tabla 11. Resultados de la prueba t-Student para comparar las medias de los datos correspondientes a la O-GlcNAcilación total evaluadas con el anticuerpo RL2.

Table Analyzed	Data 1
Column A	isquemia
vs	vs
Column B	precon- isquemia
Unpaired t test	
P value	0,0313
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.797 df=6
How big is the difference?	
Mean \pm SEM of column A	1.598 \pm 0.09998 N=4
Mean \pm SEM of column B	2.440 \pm 0.2841 N=4
Difference between means	-0.8424 \pm 0.3012
95% confidence interval	-1.579 to -0.1053
R squared	0,5659
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	8.077, 3, 3
P value	0,1200
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Ya que el valor $P=0,0313$, se rechaza la hipótesis nula, por lo cual se puede afirmar que hay diferencias significativas entre las medias de los grupos A y B

Anexo 8. Aspectos evaluados por el test de 28 puntos realizado por el laboratorio de neurociencias funcional y comportamental de la Universidad de Stanford

1. Dar vueltas (Máx 4 puntos)
2. Motilidad (Máx 3 puntos)
3. Estado general (Máximo 3 puntos)
4. Reflejo de enderezamiento (Máximo 1 punto)
5. Colocación de la pata (Máximo 4 puntos)
6. Comportamiento en una barra horizontal (Máximo 3 puntos)
7. Comportamiento en una barra inclinada (Máximo 3 puntos)
8. Fuerza de prensión (Máximo 2 puntos)
9. Reflejo contralateral (Máximo 1 punto)
10. Colocación de las patas delanteras (Máximo 2 puntos)
11. Rotación contralateral (Máximo 2 puntos)