

Evaluación del preconditionamiento isquémico en la corteza cerebral de ratas *Wistar* sometidas a isquemia cerebral focal

Sebastián Gómez Cadavid

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

Santiago de Cali

2016

Evaluación del preconditionamiento isquémico en la corteza cerebral de ratas *Wistar* sometidas a isquemia cerebral focal

Sebastián Gómez Cadavid

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO EN PREGRADO EN
Química Farmacéutica

Directora: Juliana Rengifo Gómez, PhD.

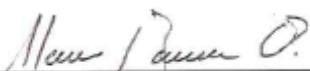
Co- Director: Carlos Fernando Cardozo Hernández, PhD (candidato)

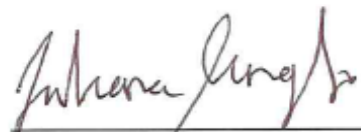
Santiago de Cali

2016



APROBADO POR:


Alvaro Andrés Barrera Ocampo
Evaluador


Juliana Rengifo Gómez
Tutor/a del Proyecto.


Carlos Fernando Cardozo Hernández
Co-Tutor del Proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios porque me ha permitido pasar días enteros dudando de lo sagrado, pero siempre me ha dado señales que atentan contra mi ego y me devuelven nuevamente al punto inicial de mi infancia. El análisis crítico sobre Dios y las historias que se cuentan sobre él han sido necesarios para estimular mi mente hacia otras áreas del conocimiento como lo concerniente al presente trabajo de investigación. Agradezco a mis padres y a mi hermano porque siempre he sentido el apoyo incondicional de ellos en éste proceso de formación. A mis tutores porque me han dado las bases académicas y éticas para el correcto desarrollo de éste proceso investigativo; y finalmente, a la persona que más ha sufrido este proceso, a mi pareja, porque fueron varias fechas especiales en las cuales tuve que estar ausente por la dedicación del presente proyecto. Gracias.

CONTENIDO

CONTENIDO	5
1. RESUMEN DEL TRABAJO	11
2. ABSTRACT	12
3. INTRODUCCIÓN.....	13
4. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	14
4.1. Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia.....	14
5. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	15
5.1. Isquemia cerebral	15
5.2. Glicosilación tipo O-GlcNAc	18
5.3. Precondicionamiento isquémico.....	19
5.4. Modelo experimental: Rattus norvegicus cepa Wistar.....	21
6. OBJETIVOS	22
6.1. Objetivo General	22
6.2. Objetivos específicos.....	22
7. METODOLOGÍA.....	22
7.1. Modelos experimentales	22
7.2. Diseño experimental.....	22
7.3. Test Neurológico	23
7.4. Procedimiento quirúrgico	25
7.4.1. Isquemia cerebral focal	25
7.4.2. Precondicionamiento isquémico	26
7.4.3. Extracción del cerebro	26
7.5. Determinación del tamaño del infarto.....	27
7.6. Realización de la técnica Western Blot	27
7.6.1. Homogeneizado y curva de estandarización para Western Blots	27
7.6.2. Preparación de los geles de poliacrilamida.....	29
7.6.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%.....	30
7.6.4. Transferencia.....	30
7.6.5. Bloqueo e incubación de la membrana de PVDF	31
7.6.6. Etapa de revelado	31

7.6.7. Análisis estadístico de datos	31
8. MATRIZ DE MARCO LÓGICO	32
9. RESULTADOS	33
9.1. Tests neurológicos.....	33
9.1.1. Test de García	34
9.1.2. Test 28P	35
9.2. Volumetría por TTC	35
9.3. Western Blot	38
9.3.1. Experimento SHAM – ISQ – PISQ	38
9.3.2. Experimento SHAM – PSHAM 1h – PSHAM 6h.....	42
10. DISCUSIÓN.....	44
11. CONCLUSIONES.....	50
12. RECOMENDACIONES.....	50
13. REFERENCIAS	51
14. ANEXOS.....	54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Grupos experimentales de volumetría por TTC	23
Tabla 2. Grupos experimentales de Western Blot.....	23
Tabla 3. Grupos experimentales de Western Blot.....	23
Tabla 4. Test de García.....	24
Tabla 5. Test 28P.....	24
Tabla 6. Absorbancias obtenidas de los grupos experimentales	29
Tabla 7. Absorbancias obtenidas de los grupos experimentales	29
Tabla 8. Reactivos empleados para la elaboración de geles de poliacrilamida al 8%.....	30
Tabla 9. Pozos del Western Blot para la medición de los niveles de glicosilación O-GlcNAc en grupos experimentales con preconditionamiento isquémico cerebral en diferentes tiempos de sacrificio.....	30
Tabla 10. Pozos del Western Blot para la medición de los niveles de glicosilación O-GlcNAc en grupos experimentales con isquemia y preconditionamiento-isquemia.	30

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. <i>Curva de calibración</i>	28
Gráfico 2. Comparación de las densidades relativas de los niveles de O- GlcNAcilación de proteínas corticales en la banda superior de cada grupo experimental, medidos por densitometría normalizadas contra el control de carga (media \pm EEM, n=3,*; $p < 0.05$ por la prueba t de student).....	39
Gráfico 3. Comparación de las densidades relativas de los niveles de O- GlcNAcilación de proteínas corticales en la banda media de cada grupo experimental, medidos por densitometría normalizadas contra el control de carga (media \pm EEM, n=3, $p > 0.05$ por la prueba t de student).....	40
Gráfico 4. Comparación de las densidades relativas de los niveles de O- GlcNAcilación de proteínas corticales en la banda inferior de cada grupo experimental, medidos por densitometría normalizadas contra el control de carga (media \pm EEM, n=3, $p > 0.05$ por la prueba t de student).....	40
Gráfico 5. <i>Comparación de las densidades relativas de los niveles de O- GlcNAcilación de proteínas corticales en la banda inferior-inferior de cada grupo experimental, medidos por densitometría normalizadas contra el control de carga (media \pmEEM, n=3, $p > 0.05$ por la prueba t de student)</i>	41
Gráfico 6. <i>Comparación de las densidades relativas de los niveles de O- GlcNAcilación de proteínas corticales en el carril completo de cada grupo experimental, medidos por densitometría normalizadas contra el control de carga (media \pmEEM, n=3, $p > 0.05$ por la prueba t de student)</i>	41
Gráfico 7. <i>Comparación de las densidades relativas de los niveles de O- GlcNAcilación de proteínas corticales en la banda superior de cada grupo experimental, medidos por densitometría normalizadas contra el control de carga (media \pmEEM, n=3, $p > 0.05$ por la prueba t de student)</i>	43
Gráfico 8. Comparación de las densidades relativas de los niveles de O- GlcNAcilación de proteínas corticales en la banda media de cada grupo experimental, medidos por densitometría normalizadas contra el control de carga (media \pm EEM, n=3, $p > 0.05$ por la prueba t de student).....	43
Gráfico 9. <i>Comparación de las densidades relativas de los niveles de O- GlcNAcilación de proteínas corticales en el carril completo de cada grupo experimental, medidos por densitometría normalizadas contra el control de carga (media \pmEEM, n=3, $p > 0.05$ por la prueba t de student)</i>	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Eventos intrínsecos luego de la oclusión arterial (Waikar & Bonventre, 2015) .</i>	16
Figura 2. <i>Efectos del accidente cerebrovascular (Organización Mundial de la Salud, 2005)</i>	17
Figura 3. <i>Esquematización simplificada de las vías de señalización del</i> <i>precondicionam</i> <i>ento isquémico que promueven la neuroprotección(Liu, Sheng, & Qin, 2009)</i>	20
Figura 4. <i>Resultados del test neurológico de García para evaluar la capacidad sensorio- motora de los biomodelos.....</i>	34
Figura 5. <i>Resultados del test neurológico de los 28 puntos (28P) de la Universidad de Stanford para evaluar la capacidad sensorio-motora de los biomodelos.....</i>	35
Figura 6. <i>Fotografías tomadas en el cuarto del microscopio de epifluorescencia de la Universidad Icesi con cámara Nikon acoplada a estereoscopio Nikon, mediante el software NisElements F de Nikon</i>	37
Figura 7. <i>Caracterización de la glicosilación tipo O-GlcNAc en corteza frontoparietal de cerebros de ratas Wistar macho sometidas a isquemia cerebral focal.....</i>	39
Figura 8. <i>Caracterización de la glicosilación tipo O-GlcNAc en corteza frontoparietal de cerebros de ratas Wistar macho sometidas a isquemia cerebral focal.....</i>	42

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Carta del CIUECUAE de la Universidad Icesi para la aprobación del proyecto de investigación en preconditionamiento isquémico cerebral.....	54
Anexo 2. Tests neurológicos.....	55
Anexo 3. Volumetría por TTC.....	57
Anexo 4. Western Blot	58

1. RESUMEN DEL TRABAJO

El presente trabajo de grado hace parte de una línea investigativa en neurociencias que se ha venido desarrollando en el laboratorio de Fisiología animal de la Universidad Icesi y está enfocada en el Accidente Cerebrovascular (ACV) que más prevalencia tiene, la isquemia cerebral. Actualmente no existe una estrategia farmacológica estandarizada que permita disminuir la pérdida de las neuronas de la penumbra isquémica, por ende, se espera profundizar en el entendimiento mediante el cual las neuronas sobreviven frente a un evento de estrés celular, originado por dicho ACV. Se ha observado en otros órganos como el corazón, que el preconditionamiento isquémico es un mecanismo adaptativo intrínseco que aumenta la supervivencia celular del órgano en cuestión, sin embargo, las investigaciones en materia de preconditionamiento isquémico cerebral están en su fase temprana aún, y por lo tanto, falta por esclarecer las vías de señalización mediante las cuales éste opera. Para ello, se estudiaron estos eventos mediante la inducción de isquemia cerebral en ratas albinas *Wistar* (*Rattus norvegicus*) por el modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO, por sus siglas en inglés), y el procedimiento de oclusión de las arterias carótidas comunes para llevar a cabo el preconditionamiento isquémico. Posteriormente, se llevaron a cabo experimentos de tinción que permitieron determinar que el preconditionamiento isquémico reduce significativamente el tamaño del infarto en los biomodelos que fueron sometidos a isquemia cerebral focal. Este hecho se evaluó mediante cloruro de 2,3,5- trifeniltetrazolio (TTC), debido a que dicho reactivo se oxida en presencia de deshidrogenasas presentes en tejido vivo produciendo una coloración roja, mientras que en el tejido muerto no se presenta coloración alguna. Por otro lado, se evaluaron los niveles de O-GlcNAcilación y se observó un aumento en la banda superior del grupo que fue previamente preconditionado respecto al grupo que no lo fue, los marcadores de peso molecular más cercanos a dicha zona corresponden a 111 y 232 KDa respectivamente. Debido a que en investigaciones previas del laboratorio de fisiología animal de la Universidad Icesi y en otros centros de investigación especializados se ha encontrado que dicha modificación post-traduccional aumenta la tasa de supervivencia celular cuando éstas son sometidas a algún tipo de estrés celular, se propone que la relación entre el aumento en los niveles de glicosilación tipo O-GlcNAc en ciertas proteínas corticales está relacionada directamente con un aumento en la supervivencia celular. La evaluación de dichos niveles de O-GlcNAcilación se hizo mediante la técnica de Western Blot.

Palabras clave: O-GlcNAcilación, Isquemia cerebral, Preconditionamiento isquémico, Neuroprotección, Proteínas corticales.

2. ABSTRACT

The present work is part of a research line in neurosciences that has been developed in the laboratory of Animal Physiology at the Icesi University and is focused on the Cerebrovascular Accident (CVA) that has more prevalence, brain ischemia. Currently, there is no standardized pharmacological strategy to reduce the loss of neurons in the ischemic penumbra. Therefore, we hope to deepen the understanding by which neurons survive in the event of a cellular stress caused by such stroke. It has been observed in other organs such as the heart, that ischemic preconditioning is an intrinsic adaptive mechanism that increases the cell survival of the organ, however, research on brain ischemic preconditioning is still in its early stages, therefore, It remains to clarify the signaling pathways through which it operates. To do this, these events were studied by the induction of brain ischemia in *Wistar* rats (*Rattus norvegicus*) by the middle cerebral artery occlusion model (MCAO), and the occlusion procedure of the carotid arteries to carry out ischemic preconditioning. Subsequently, staining experiments were carried out to determine that ischemic preconditioning significantly reduced infarct size in biomodels that underwent focal brain ischemia. This fact was evaluated by means of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC), because this reagent is oxidized in the presence of dehydrogenases present in living tissue producing a red coloration, whereas in the dead tissue no coloration appears. On the other hand, the levels of O-GlcNAcylation were evaluated and an increase was observed in the upper band of the group that was previously preconditioned with respect to the group that was not, the molecular weight markers in that zone corresponds to 111-232 KDa, owing to previous research in the laboratory of animal physiology at Icesi University and other specialized research centers has found that such post-translational modification increases the rate of cell survival when they are subjected to some type of cellular stress, it is proposed that the relationship between the increase in O-GlcNAc glycosylation levels in certain cortical proteins is directly related to an increase in cell survival. Evaluation of such levels of O-GlcNAcylation was done by the Western Blot technique.

Key Words: O-GlcNAcylation, Brain ischemia, Ischemic preconditioning, neuroprotection, cortical proteins

3. INTRODUCCIÓN

Los accidentes cerebrovasculares son la primera causa de incapacidad física en el mundo y la tercer causa de muerte (Lloyd-jones et al., 2009). El ACV de mayor prevalencia es la isquemia cerebral con un 80% de los casos reportados y a medida que la población envejezca los casos reportados de isquemia cerebral irán en aumento ya que éste es uno de los factores de riesgo de la enfermedad (Rang, Dale, Ritter, & Flower, 2012) (Waikar & Bonventre, 2015) . Los tratamientos actuales para tratar la isquemia cerebral o *ictus* isquémico tienen la limitación de que están enfocados en restaurar el flujo sanguíneo cerebral (FSC) pero no se ha estandarizado aún una estrategia terapéutica que promueva la citoprotección de las células cerebrales (Hacke et al., 2005). Lo ideal es que el esquema de prescripción para un paciente que ha sufrido un ictus isquémico es la administración concomitante entre un fármaco que restaure el FSC con uno que promueva la citoprotección del área de penumbra isquémica.

El preconditionamiento isquémico (PI) hace referencia a la estimulación experimental de periodos no letales de interrupción del flujo sanguíneo hacia un órgano (Simon et al., 2006), el PI que más se ha estudiado ha sido en el corazón y ha demostrado aumentar la viabilidad celular de los cardiomiocitos cuando se someten luego a un periodo de isquemia letal (Zachara et al., 2004), aunque también se han realizado estudios en otros órganos como el cerebro y el hígado, obteniéndose resultados similares(John C. Chatham, 2012; Romanque, Pamela M & Videla, 2005). Sin embargo, los mecanismos por los cuales éste ofrece citoprotección no están esclarecido aún (Dawson, Valina L. Dawson, 2000). Con el fin de conocer a fondo la forma en la que el PI promueve la supervivencia celular, se ha proyectado en este estudio evaluar una modificación post-traducciona llamada glicosilación tipo O-GlcNAc (O-GlcNAcilación), que ha promovido en numerosos estudios un mecanismo probable para el entendimiento de los eventos subyacentes a la protección celular en cardiomiocitos. Se cree que la manera en la que la O-GlcNAcilación promueve la protección celular se deba a la estabilización de proteínas o por prevenir la agregación de proteínas desnaturalizadas (Zachara et al., 2004).

Este proyecto de investigación se enmarca en el objetivo de comprobar si el preconditionamiento isquémico aumenta la viabilidad celular en el cerebro de ratas *Wistar (Rattus norvegicus)* cuando son sometidas posteriormente a un insulto isquémico mayor y determinar si la glicosilación tipo O-GlcNAc de proteínas de la corteza frontoparietal derecha experimenta diferencias estadísticamente significativas con este tratamiento experimental. Esto enriquecería el entendimiento de los procesos bioquímicos endógenos que ocurren en el cerebro cuando éste se enfrenta a un periodo de estrés celular ocasionado por una interrupción súbita del FSC.

4. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

4.1. Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia.

En los Estados Unidos de América, el accidente cerebrovascular (ACV) genera alrededor de 200.000 fallecimientos anuales y son considerados como la principal causa de morbilidad y la tercera causa de muerte, lo cual se traduce en un costo aproximado de \$50.000 millones de dólares anuales (OPS, 2004) (Waikar & Bonventre, 2015). Según los datos de la Organización Panamericana de la salud, la incidencia y prevalencia del ACV isquémico ha crecido en Latinoamérica, por cada 100.000 habitantes la prevalencia en Colombia es de 559, Perú de 647, Bolivia de 174 y entre 1969 a 1976 la mortalidad por los accidentes cerebrovasculares en América disminuyó excepto en Guatemala, República Dominicana, El Salvador y Colombia (Vélez, Rojas, Borrero, & Restrepo., 2010).

El costo estimado para el accidente cerebrovascular es de 73.700 millones de dólares en 2010 (EE.UU.) y se proyecta que será de 1.52 trillones de dólares en 2050 (en dólares de 2005) (Lloyd-jones et al., 2009). A medida que la población de adultos mayores incrementa así mismo lo hará la incidencia de ACV y se cree que para el 2030 el número de fallecimientos se duplique (Waikar & Bonventre, 2015). Según la OMS *“El síntoma más común del accidente cerebrovascular es la pérdida súbita, generalmente unilateral, de fuerza muscular en los brazos, piernas o cara. Otros síntomas consisten en: la aparición súbita, generalmente unilateral, de entumecimiento en la cara, piernas o brazos; confusión, dificultad para hablar o comprender lo que se dice; problemas visuales en uno o ambos ojos; dificultad para caminar, mareos, pérdida de equilibrio o coordinación; dolor de cabeza intenso de causa desconocida; y debilidad o pérdida de conciencia”*.

En la actualidad el único tratamiento para mitigar el ACV isquémico es de tipo trombolítico, el cual tiene la finalidad de restaurar el flujo sanguíneo cerebral (FSC). La ventana terapéutica para el tratamiento trombolítico en estos pacientes es de 3 a 9 horas, sin embargo, pocos pacientes llegan a urgencias cuando presentan una ACV isquémico y por eso solo el 2% puede ser tratados con trombólisis (Hacke et al., 2005) (Zarco, González, & Coral, 2008). Además, este tratamiento trombolítico presenta el problema de que el 60% de los pacientes que lo reciben mueren o quedan discapacitados (Organización Mundial de la Salud, 2005). Es por esto que se hace necesaria la investigación en ciencia básica para la citoprotección de neuronas frente a un evento de estrés celular como los ACV isquémicos. En la realización de éste proyecto de investigación se evaluó el preconditionamiento isquémico en ratas macho (*Rattus norvegicus*, cepa *Wistar*), con el fin de analizar si la glicosilación tipo O-GlcNAc de proteínas en la corteza cerebral de las mismas se ve aumentada en cerebros preconditionados, y si dicha modificación post-traducciona está relacionada con un aumento en la supervivencia celular, con el fin de hacer

una contribución al entendimiento de los procesos bioquímicos que ofrecen protección a las células del cerebro.

5. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

5.1. Isquemia cerebral

El accidente cerebrovascular (ACV) hace referencia a un conjunto de eventos fisiopatológicos que ocurren en un plano vascular, en los cuales se afecta un tejido por un suministro inadecuado de flujo sanguíneo, éstos causan un déficit neurológico y son de origen no convulsivo. Se reconocen dos tipos de ACV: isquémico y hemorrágico, siendo el primero el de mayor prevalencia con aproximadamente un 85 % de casos reportados (Rang, Dale, Ritter, & Flower, 2012), y un 15 % aproximadamente para el ACV hemorrágico o también llamado derrame cerebral. El interés del presente trabajo está dirigido hacia el ACV isquémico, el de mayor prevalencia. El ACV isquémico o isquemia cerebral, consiste en la interrupción del flujo sanguíneo hacia un sitio determinado del cerebro, y gracias al desarrollo de las técnicas de imágenes diagnósticas se ha permitido catalogar el ACV isquémico en transitorio y permanente de acuerdo a la localización del tejido lesionado; aquel que provoca un daño permanente se le conoce como infarto cerebral y representa en Colombia el 70 % de los casos reportados de ACV según el Registro Colombiano de ACV (Vélez, Rojas, Borrero, & Restrepo., 2010). Esta interrupción se puede generar debido a un trombo o un émbolo en una de las arterias que irrigan alguna zona cerebral (Snell, 2009). La interrupción sanguínea hacia el cerebro puede desencadenar una serie de sucesos nocivos en el territorio vascular donde se esté obstaculizando dicho flujo ya que el cerebro está siendo expuesto en un ambiente carente de oxígeno y glucosa, sustratos principales que utilizan las células del cerebro para la generación de energía en forma de ATP (Waikar & Bonventre, 2015).

Las enfermedades cerebrovasculares (ACV, por sus siglas en inglés) son la primera causa de incapacidad permanente en adultos y la tercera causa de muerte en los países desarrollados; en la población de adultos mayores la principal causa de los infartos isquémicos son ocasionado por la oclusión aterotrombótica o cardioembólica de una arteria cerebral, mientras que en la población más joven es el vasoespasma secundario a una hemorragia subaracnoidea (Prieto-arribas, Moreno-gutiérrez, & Simal-hernández, 2008). Las nefastas consecuencias de la reducción en la perfusión sanguínea depende de muchos factores, entre los que se encuentran la circulación sanguínea colateral, que a su vez depende de la anatomía vascular de cada persona, del sitio de la oclusión y probablemente a la presión sanguínea sistémica. La interrupción completa de la circulación sanguínea cerebral origina la muerte del tejido encefálico en un periodo de 4 a 10 min aproximadamente; cuando ésta es menor de 16 a 18 mL/100 g de tejido por minuto se produce un infarto en unos 60 min y si la irrigación sanguínea es

menor de 20 mL/100 g de tejido por minuto aparece isquemia sin infarto cerebral, a menos que se prolongue durante varias horas o días. Si la irrigación sanguínea se restaura antes de que haya muerto un gran número de células, el individuo experimentará únicamente síntomas transitorios (Waikar & Bonventre, 2015).

En un plano molecular, los acontecimientos que suceden en la isquemia cerebral son diversos: Se ha observado un aumento citosólico de iones de calcio debido a que las bombas encargadas de expulsarlo dejan de funcionar (Velandía, Garavro, Caldas, & Hurtado, 2001), estos iones activan una serie de enzimas que conllevan a la muerte celular programada, que van desde endonucleasas y proteasas (González-García, 2000)(Ankarcrona et al., 1995); las especies reactivas de oxígeno (ERO) también aumentan en número debido a la activación de enzimas oxidasas como la xantina oxidasa y algunas enzimas mitocondriales, las cuales causan innumerables daños dentro de la maquinaria celular puesto que son altamente inestables (Faraci, 2006) , y es importante resaltar que el cerebro es un órgano que consume aproximadamente un 20 % del oxígeno que respiramos y el 25 % de la glucosa total del organismo (Godoy, Rabinstein, Videtta, & Murillo- Cabezas, 2010). Además, si se compara la capacidad antioxidante que tiene el cerebro respecto a otros órganos del cuerpo se observará que es mucho menor, por lo tanto, los daños mediados por las ERO son altamente perjudiciales (Adibhata & Hatcher, 2010). En la Figura 1. Se esquematizan los eventos que ocurren luego de la oclusión de una arteria cerebral.

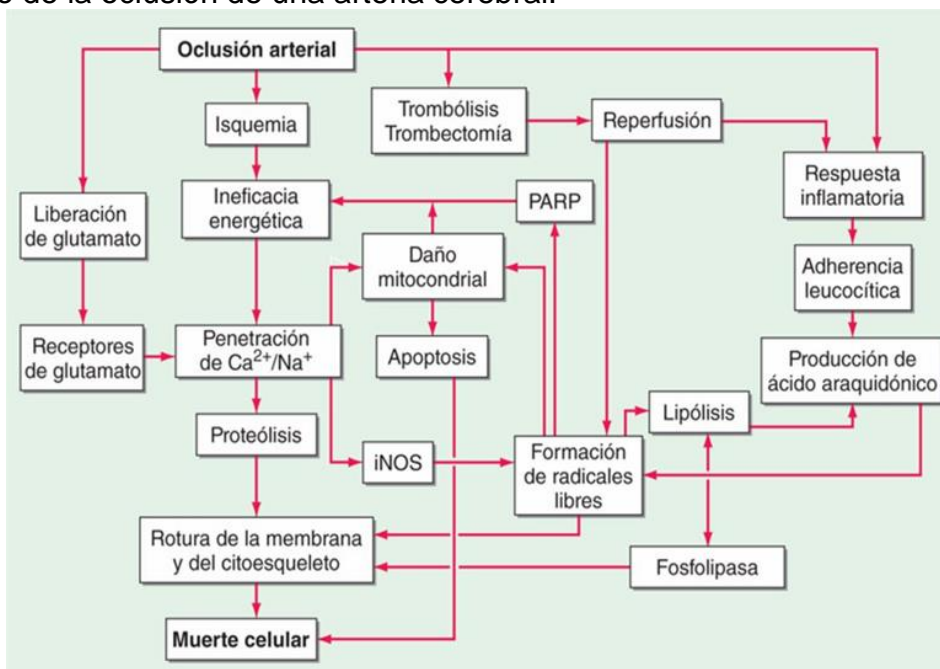


Figura 1. Eventos intrínsecos luego de la oclusión arterial (Waikar & Bonventre, 2015)

La región afectada por la falta de nutrientes y oxígeno en el cerebro se ha caracterizado en dos zonas: el núcleo isquémico y el área de penumbra. La

región más cercana a la arteria ocluida es el más afectado y se conoce como núcleo isquémico. Éste es caracterizado por ser una región de necrosis tisular donde la probabilidad de recuperación del tejido es muy baja. Sin embargo, en los alrededores del núcleo isquémico se puede observar un área, caracterizada por tener poca perfusión sanguínea y por tanto un flujo muy reducido de oxígeno y nutrientes llamada penumbra isquémica. En esta zona en particular, se ha caracterizado que la muerte celular desencadenada sea regulada y que sea susceptible de ser salvada si se trata a tiempo. Hasta el momento no se ha logrado llevar al ámbito clínico una metodología terapéutica que permita la activación de mecanismos de citoprotección de dichas neuronas, por ende, se hace realmente necesaria la investigación en los mecanismos de neuroprotección para contrarrestar dichos efectos (Waikar & Bonventre, 2015).

La estrategia terapéutica más importante llevada a cabo en la isquemia cerebral consiste en la restauración del flujo sanguíneo mediante el uso de fármacos trombolíticos o activadores del plasminógeno tisular. Sin embargo, esto no ofrece una neuroprotección completa hacia aquellas neuronas susceptibles a ser restauradas, ya que sólo se limitan a restaurar la perfusión de sangre (Rodríguez Motuberría, Liván; Galizú Sánchez, Reynaldo; Álvarez González, 2002). *“Los efectos del accidente cerebrovascular dependen de la parte del cerebro que se haya afectado y del grado de afectación. Los accidentes cerebrovasculares pueden dañar únicamente una parte del cuerpo, por ejemplo, la cara, un brazo o una pierna, pero también pueden paralizar todo un lado. Si el accidente es muy intenso puede ocasionar la muerte de forma inmediata”* (Organización Mundial de la Salud, 2005). La Figura 2. Esquematiza de manera apropiada dichos sucesos

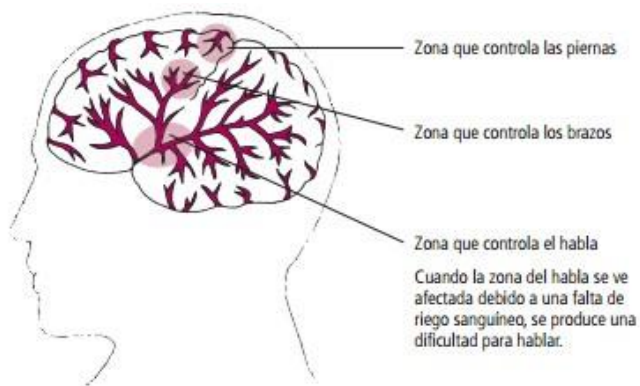


Figura 2. Efectos del accidente cerebrovascular (Organización Mundial de la Salud, 2005)

5.2. Glicosilación tipo O-GlcNAc

La glucosa que ingresa a la célula entra en el proceso de glucólisis en donde es fosforilada en un primer paso a Glucosa-6-fosfato por acción de la hexoquinasa, y posteriormente es metabolizada durante dicho proceso a Fructosa-6-fosfato, el cual puede entrar en rutas metabólicas alternas como la ruta biosintética de las hexosaminas o HBP por sus siglas en inglés. El 5 % de la glucosa en el cuerpo ingresa a esta vía y tiene como producto final la formación de UDP-GlcNAc, molécula usada como sustrato para la modificación post-traducciona l de proteínas en el citoplasma y en el núcleo celular conocida como glicosilación tipo O-GlcNAc (O-GlcNAc ilación) (Dassanayaka & Jones, 2014). La adición del grupo O-GlcNAc desde la UDP-GlcNAc hacia los grupos aminoacídicos serina y treonina de las proteínas blanco es mediado por la proteína O-GlcNAc transferasa (OGT) y la remoción del mismo grupo es mediado por la enzima β -N-acetilglucosaminidasa (O-GlcNAc as a u OGA), tanto OGT como OGA son expresados en cerebro y páncreas en altos niveles (Förster et al., 2014).

Los mecanismos por los cuales actúan las modificaciones post-traduccionales O-GlcNAc son complejos, y se tiene evidencia de que los cambios en los niveles de O-GlcNAc ilación alteran los siguientes comportamientos: 1) la semivida y el procesamiento proteolítico de proteínas; 2) las interacciones proteína-proteína; 3) La unión con el ADN; y 5) la actividad enzimática. Un mecanismo por el cual la O-GlcNAc ilación puede mediar estos eventos es alterando la fosforilación de la proteína. En particular, la fosforilación y la O-GlcNAc ilación son recíprocas en algunas proteínas bien estudiadas (Zachara et al., 2004). Se ha evidenciado que en procesos de estrés celular se activan dentro de la célula una serie de modificaciones post-traduccionales con el propósito de aumentar la probabilidad de supervivencia de la célula. Frente a múltiples factores como el calor, el estrés osmótico y oxidativo, la absorción de glucosa crece ya que aumenta la expresión de los transportadores de glucosa frente a dicho estrés (Zachara & Hart, 2004). Basado en estudios de supervivencia celular se ha evidenciado que los niveles de O-GlcNAc ilación frente al estrés celular se ve incrementado (Zachara & Hart, 2004).

Por otro lado, se han notificado los efectos citoprotectores de la glucosamina, que ha sido objeto de estudio por varios grupos de investigación en neuroprotección (Hwang et al., 2010) y se ha identificado que los cardiomiocitos aumentan el flujo de glucosamina para mejorar la tolerancia del corazón perfundido aislado a la isquemia / reperfusión, un efecto mediado por un aumento de los niveles de la modificación post-traducciona l O-GlcNAc (Liu et al., 2006).

5.3. Precondicionamiento isquémico

Precondicionar un órgano significa someterlo a un estímulo no letal y permitir que el órgano active mecanismos celulares que le permita hacer frente a un estímulo letal. Existen muchos tipos de precondicionamiento en diferentes tejidos, por ejemplo, en el cerebro se han sido descritos varios tipos entre los que se encuentran: periodos de hipoxia, exposición a citoquinas, lipopolisacáridos (LPS), toxinas mitocondriales, y otros (Simón et al., 2006). EL precondicionamiento isquémico hace referencia a una serie de estímulos no letales de reducción del flujo sanguíneo que tienen diferentes órganos, lo cual les confiere un tipo de adaptación a dicha carencia de oxígeno cuando éste se enfrenta a un episodio letal de hipoxia. El precondicionamiento isquémico se puede producir mediante un estímulo farmacológico, físico o metabólico, y es crucial su entendimiento para ser utilizado como una estrategia terapéutica (Puisieux et al., 2004).

Es sabido que en el precondicionamiento isquémico existen muchos mediadores e intermediarios en una inmensa cascada de señalización celular, estos hacen parte de diferentes mecanismos que ofrecen al final neuroprotección. Estudios recientes sugieren que los receptores TLRs juegan un rol muy importante en la protección neuronal mediada en el precondicionamiento isquémico y se da cuando un ligando de TLRs como LPS, MALP-2, LTA, se unen al respectivo receptor (Simón et al., 2006; Wang, Lin, & Yang, 2011) Se ha estudiado también el papel del óxido nítrico en el precondicionamiento isquémico. Los efectos neuroprotectores del óxido nítrico ocurren mediante una modificación post-traducciona de proteínas, la S-nitrosilación, mediante la activación del segundo mensajero cGMP a través de la reacción con superóxido para formar peroxinitrito. La S-nitrosilación puede conferir neuroprotección por la inhibición de la apoptosis, particularmente a través de la activación de caspasas y proteasas que degradan proteínas intracelulares clave (Iadecola, Kahles, Gallo, & Anrather, 2011). En este proyecto, se evaluaron los niveles de otra modificación post-traducciona, la glicosilación tipo O-GlcNAc en las células de la corteza cerebral de ratas *Wistar* cuando han sido sometidas a precondicionamiento isquémico, esto como un apoyo al estudio de neuroprotección en fase preclínica.

Claramente se ha identificado que en el corazón y en el cerebro el precondicionamiento ha tenido una importancia alta en la investigación biomédica (Obrenovitch, 2008), esto se debe a que si se identifican todas las proteínas implicadas con sus respectivas modificaciones, se puede predecir el mapa de la cascada de señalización celular que promueve la neuroprotección en un plano molecular y en un futuro tomar como *targets* o dianas farmacológicas aquellas proteínas implicadas en la protección neuronal. Hasta el momento se han hecho esbozos generales y simplificados

de las vías de señalización que están implicadas en la protección proporcionada por el preconditionamiento isquémico tal como se observa en la Figura 3.

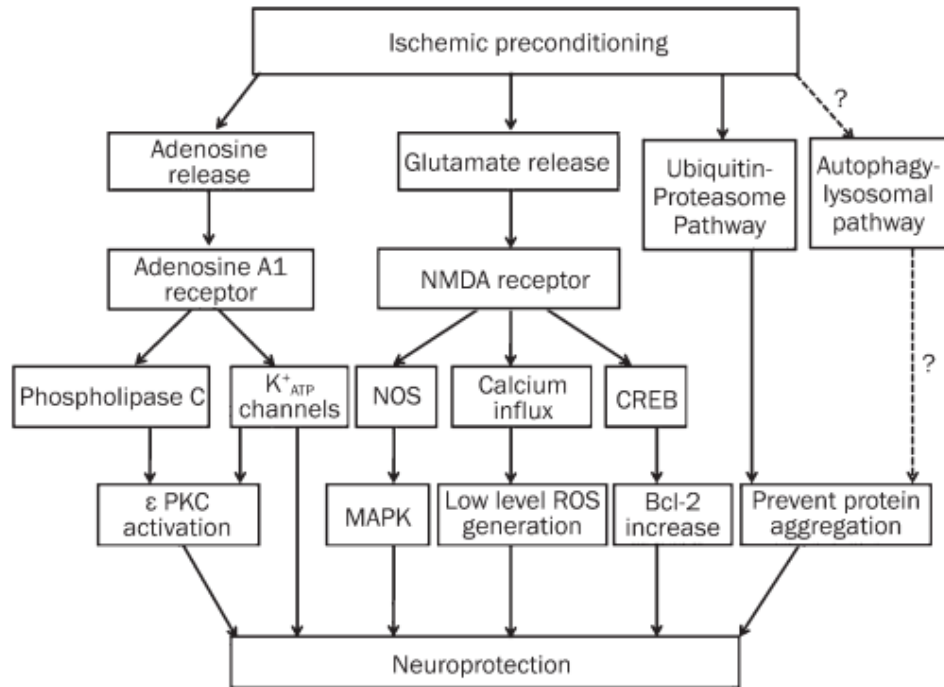


Figura 3. Esquemización simplificada de las vías de señalización del preconditionamiento isquémico que promueven la neuroprotección (Liu, Sheng, & Qin, 2009)

Se han identificado dos tipos de preconditionamiento isquémico en corazón y en el sistema nervioso: El temprano y el tardío. El preconditionamiento isquémico temprano es mediado por modificaciones post-traduccionales, y es independiente de la síntesis de proteínas. Por otro lado, el preconditionamiento isquémico tardío requiere de la síntesis de nuevas proteínas y pueden durar periodos prolongados de días y semanas a diferencia del temprano. En el Sistema Nervioso Central (SNC), se han identificado diversos estímulos de preconditionamiento, que van desde episodios isquémicos breves, despolarización inducida por iones de potasio, inhibición química de la fosforilación oxidativa, así como la exposición a excitotoxinas y citoquinas. Aunque se han identificado varios estímulos, los mecanismos de señalización responsables de muchas de estas diversas formas de preconditionamiento siguen siendo un misterio (Dawson, Valina L. Dawson, 2000).

5.4. Modelo experimental: *Rattus norvegicus* cepa Wistar

“La investigación en Medicina se basa fundamentalmente en tres fuentes de conocimiento: En primer lugar, el hombre enfermo que es la fuente natural del conocimiento en la clínica, en segundo lugar el cadáver, que es la fuente de conocimiento de la Anatomía Patológica y, por último, el animal de experimentación que es la fuente del conocimiento de la Fisiopatología. Los avances experimentados en el último siglo han determinado que el concepto de animal de experimentación deba sustituirse por un concepto mucho más amplio, el de modelo experimental” (Del Cañizo López, López Martín, Lledó García, & García Barreno, 2008).

La mayoría de los estudios realizados en isquemia cerebral deben ser realizados en un modelo experimental apropiado, debido a las complicaciones post-mortem que tienen los cerebros humanos. Los análisis bioquímicos, inmunohistoquímicos, ultramicroscópicos y autoradiográficos requieren de procesos de fijación rápidos y por ello se utilizan animales para este tipo de estudios. Los modelos experimentales utilizados en isquemia cerebral son diversos, aunque principalmente se trabaja con roedores como las ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa *Wistar* debido a su fácil manipulación, bajo costo, relativa homogeneidad genética, rápida procreación y lo más importante de todo es que la fisiología y la anatomía cerebral de dichos especímenes son muy similares a las del ser humano (Arango-Dávila, Pimienta, & Escobar, 2002). En la mayoría de mamíferos, incluidas las ratas, existe una estructura anatómica llamada polígono de Willis similar al del ser humano, en el que existe comunicación entre el sistema carotídeo anterior y el vertebrobasilar posterior (Prieto-arribas et al., 2008). Además, a lo largo de la línea investigativa en Isquemia cerebral que tiene la Universidad Icesi, se ha trabajado siempre con este modelo experimental y se han tenido buenos resultados (Torres, 2015) (Araque, 2014).

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

Determinar si el acondicionamiento isquémico disminuye el tamaño de la zona de muerte cerebral en ratas *Wistar* sometidas a isquemia cerebral focal.

6.2. Objetivos específicos

- Determinar el desempeño neurológico de ratas acondicionadas y sometidas a isquemia cerebral focal mediante el test de García y el test de los 28 puntos.
- Medir mediante TTC el volumen de muerte cerebral en ratas acondicionadas y sometidas a isquemia cerebral focal.
- Registrar los niveles de O-GlcNAcificación de proteínas corticales en ratas acondicionadas y sometidas a isquemia cerebral focal, mediante la técnica de Western Blot.

7. METODOLOGÍA

A continuación se darán a conocer los procedimientos que se llevaron a cabo en el proyecto de investigación.

7.1. Modelos experimentales

El estudio se realizó con el manejo y uso de ratas albinas (*Rattus norvegicus*, cepa *Wistar*) machos, la aprobación por parte del comité de ética de la Universidad Icesi se encuentra en el Anexo 1. Los modelos experimentales estuvieron alojados en el Bioterio de la Universidad Icesi, en condiciones controladas de iluminación, humedad, temperatura, alimentación y estimulación sensorial. El peso de los modelos experimentales estuvo en el rango de 240 a 320 gramos y la edad de los biomodelos que fueron analizados por volumetría de TTC fue de 90 días \pm 10 días y las de Western Blot fueron 360 días \pm 15 días.

7.2. Diseño experimental

El proyecto se estableció en el desarrollo de 3 experimentos. El nivel de confianza con el que se trabajó fue del 95% para todos los experimentos. El primer estudio se realizó empleando la volumetría por TTC para observar diferencias significativas en cuanto al porcentaje de isquemia de los grupos experimentales con un $n=4$, los mismos se encuentran en la Tabla 1. El segundo y tercer estudio desarrollado fueron realizados por la técnica de Western Blot para observar diferencias significativas en niveles de O-

GlcNAcilación de proteínas corticales con un n=3, los grupos experimentales se pueden visualizar en la Tabla 2 y en la Tabla 3 respectivamente.

Tabla 1. Grupos experimentales de volumetría por TTC

	ISQ	PISQ	PSHAM
Precondicionamiento isquémico	-	+	+
Isquemia cerebral	+	+	-

Tabla 2. Grupos experimentales de Western Blot

	ISQ	PISQ	SHAM
Precondicionamiento isquémico	-	+	-
Isquemia cerebral	+	+	-

Tabla 3. Grupos experimentales de Western Blot

	PSHAM1H	PSHAM6	SHAM
Precondicionamiento isquémico– Sacrificio en 1 hora	+	-	-
Precondicionamiento isquémico– Sacrificio en 6 horas	-	+	-

Los grupos experimentales con isquemia cerebral fueron sometidos a la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO, por sus siglas en inglés) para la inducción de isquemia cerebral focal, mientras que los grupos experimentales con precondicionamiento isquémico fueron tratados con la técnica de oclusión de las arterias carótidas comunes por tres minutos.

7.3. Test Neurológico

Cada modelo experimental fue sometido a dos pruebas neurológicas llamadas test de García y test 28P de la Universidad de Stanford (Stanford Medicine, 2016), las cuales relacionan directamente la respuesta sensorio-motora del modelo experimental con el estado neurológico del mismo. El primer test comprende 7 pruebas comportamentales. Cada ítem del test tiene una calificación por parte del investigador de acuerdo a cómo responda el sujeto de prueba. Este test fue realizado antes de la intervención quirúrgica y después de la misma. En la Tabla 4 se puede observar el test de García

(García, Wagner, Liu, & Hu, 1995) y en la Tabla 5 el test 28P (Stanford Medicine, 2016) .

Tabla 4. 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	Escala da normal
Reacción al tocar cualquier lado del tronco		Sin respuesta en el lado izquierdo	Respuesta débil en el lado izquierdo	Res-puesta simétrica
Respuesta a la estimulación de las vibras		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

Tabla 5. Test 28P

Prueba	Calificación				
	0	1	2	3	4
Caminata en círculos	Gira espontáneamente en círculos estrechos (radio <20cm)	Gira en círculos cuando se tira de la cola, o espontáneamente en círculos de tamaño medio (20-50 cm de radio)	Gira en círculos cuando se levanta de la cola	Camina en círculos hacia un solo lado	No camina en círculos, movimiento normal
Movilidad	Reacio a moverse	Inestable	Animado pero dando vueltas	Motilidad normal	

Condición General	Postura encorvada, tono muscular débil.	Buena	Muy bien, pero el aumento de peso es menor de lo normal.	Normal (buen estado, alerta, movimiento alrededor, aumento de peso normal)	
Desplazamiento con las patas	1 punto para cada colocación exitosa de la pata (puntuación máxima 4)				
Reflejo de la derecha	Enderezar sin éxito	Enderezar con éxito			
Barra horizontal	Se cae debido al agarre débil / ausente en menos de 5s	Cuelga al menos 5s, las extremidades traseras no alcanzan la barra	Levanta un miembro posterior en la barra	Levanta ambas extremidades traseras sobre la barra	
Plataforma inclinada	Cae de la rejilla debido al agarre débil / ausente o permanece mirando hacia abajo	Gira después de los 40s	Gira en 20-40s	Se gira para enfrentarse a 'cuesta arriba' dentro de los 20s	
La fuerza de Agarre	Sin agarre	Fuerza de agarre debilitada	Fuerza de agarre normal		
Reflejo contralateral	Reflejo	Sin reflejo			
Alcance visual de la pata delantera	1 punto para cada colocación de pata exitosa (puntuación máxima 2)				
Rotación contralateral	1 punto para cada lado (puntuación máxima 2)				

7.4. Procedimiento quirúrgico

7.4.1. Isquemia cerebral focal

La isquemia cerebral focal se indujo mediante la técnica de la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) con el uso de un monofilamento de nylon

Ethicon 4.0 recubierto con poli-L-lisina de 40 mm. Los modelos experimentales fueron pesados, evaluados con los tests neurológicos y posteriormente anestesiados con isofluorano por vía inhalatoria mediante un vaporizador (Stoelting Vaporizer MatrX VIP 3000) en una cámara de acrílico. Una vez anestesiado el biomodelo se ubicó en la camilla para cirugías patentada por la Universidad Icesi en posición decúbito supino, donde se aseguraron sus miembros anteriores y posteriores para fijar el modelo experimental durante toda la intervención quirúrgica; luego se le acopló una mascarilla, la cual además de fijar los dientes del biomodelo, proveía una administración constante de isofluorano y extraía el dióxido de carbono que el biomodelo emanaba. Posteriormente, se ubicó el cuello del modelo experimental, y se realizó una incisión que tuviese como finalidad ubicar la arteria carótida externa del lado derecho e insertar el monofilamento hasta llegar por la arteria carótida interna y ocluir el flujo sanguíneo de la arteria cerebral media. El tiempo de permanencia del monofilamento fue de 75 minutos. Se llevó a cabo la monitorización de la temperatura rectal del modelo experimental durante el procedimiento quirúrgico, y la regulación del porcentaje de isofluorano suministrado al biomodelo. Finalmente, se llevó a cabo la suturación de la herida en el cuello y la evaluación mediante los tests neurológicos.

7.4.2. Precondicionamiento isquémico

Los grupos experimentales que tuvieron precondicionamiento isquémico se sometieron a un procedimiento en el cual los modelos experimentales fueron pesados, evaluados con los tests neurológicos y posteriormente anestesiados con isofluorano por vía inhalatoria mediante un vaporizador (Stoelting Vaporizer MatrX VIP 3000). Una vez anestesiado el biomodelo se ubicó en la camilla para cirugías patentada por la Universidad Icesi en posición decúbito supino, donde se aseguraron sus miembros anteriores y posteriores para fijar el modelo experimental durante toda la intervención quirúrgica; luego se le acopló una mascarilla, la cual además de fijar los dientes del biomodelo, proveía una administración constante de isofluorano y extraía el dióxido de carbono que el biomodelo emanaba. Posteriormente, se ubicó el cuello del modelo experimental, y se realizó una incisión que tuviese como finalidad ubicar las arterias carótidas comunes para realizarles una oclusión de la perfusión sanguínea por un tiempo de 3 minutos con el uso de “*clamps*” vasculares en cada una de ellas. Los grupos experimentales PISQ de la Tabla 1 y la Tabla 2 Fueron sometidos a la intervención quirúrgica de la isquemia cerebral después de 60 minutos de haber realizado el precondicionamiento isquémico.

7.4.3. Extracción del cerebro

Posteriormente, se extrajeron los cerebros de los biomodelos para ser

procesados por dos vías que se describen en seguida. En el primero, los biomodelos fueron sometidos a perfusión con solución salina al 0.9% con el objetivo de retirar la sangre del cerebro que se va a extraer. El cerebro fue ubicado en una matriz de acrílico con sumo cuidado para la realización de cortes coronales de cerebro de 2.00 mm, el tiempo máximo estipulado para este paso es de 5 minutos. Se describirá en el siguiente apartado cómo se determinó el volumen de infarto cerebral con el uso del reactivo TTC. En el segundo, se llevó cabo una disección que separó la corteza cerebral del resto de encéfalo y fue almacenado a temperatura de -80°C. Luego, se llevó a cabo el análisis técnico y estadístico con tales grupos experimentales.

7.5. Determinación del tamaño del infarto

La determinación del tamaño del infarto se realizó con la visualización directa de la zona lesionada con cloruro de 2, 3,5- trifeniltetrazolio (TTC) al 0.05 %. Se hicieron cortes coronales de 2 mm y se sumergieron en una solución amortiguadora de fosfatos salinos (PBS) 0,1 M pH 7,2 que contuvo TTC al 0,05% por 30 minutos a 37°C. Luego los cortes fueron puestos en una solución de Paraformaldehido Lisina Periodato (PLP) para conservar los cortes. Se hizo el registro fotográfico con cámara Nikon acoplada a estereoscopio Nikon a cada sección de cada cerebro. En cada imagen se midió el tamaño del infarto de cada sección mediante el software Image J de la siguiente forma: Se halló el área del hemisferio contralateral al hemisferio isquémico en milímetros cuadrados (mm^2) y luego el área sana del hemisferio isquémico; la resta del área del hemisferio contralateral menos el área sana del hemisferio isquémico da como resultado el área de muerte cerebral. Finalmente, las secciones cerebrales fueron fijadas en Paraformaldehido Lisina Periodato (PLP) y mantenidas a 4°C. El volumen del daño isquémico se calculó integrando el área de la lesión corregida de los diferentes cortes coronales con el grosor del corte utilizando la ecuación del volumen del cono truncado para obtener un resultado más acertado; de esta manera el resultado se expresa en milímetros cúbicos de lesión (mm^3). El análisis estadístico se hizo mediante Graph Pad de Prism y Minitab.

7.6. Realización de la técnica Western Blot

La realización de la técnica de Western Blot se llevó a cabo de acuerdo al Procedimiento Operativo Estándar (POE) para la realización de Western Blots del laboratorio de Fisiología animal de la Universidad Icesi. Los pasos se detallan a continuación:

7.6.1. Homogeneizado y curva de estandarización para Western Blots

Se conservaron los cerebros de acuerdo al Procedimiento Operativo Estándar (POE) para extracción y conservación de cerebros de rata del laboratorio de

Fisiología animal de la Universidad Icesi. En el cual se utiliza un buffer de lisis con un inhibidor de la O-GlcNAcase para evitar la separación del grupo O-GlcNAc de las proteínas corticales. Se realizó la homogenización con el uso de un rotor estator a una velocidad media por 45 segundos de las muestras con buffer de lisis 1:1000 y PUGNAc, inhibidor de fosfatasa e inhibidor de proteasas. Luego se sometió al proceso de centrifugación a 13000 rpm por 3 minutos con una temperatura de 4°C. Se conservó el sobrenadante a -80°C. Luego se prosiguió a realizar la curva de estandarización del homogenizado para la determinación de la cantidad de proteínas en el mismo y la determinación de proteínas en cada pozo. Se realizó una curva estándar con diferentes diluciones de un Stock de albúmina de suero bovino (BSA) en buffer fosfato salino (PBS) mediante el uso del reactivo de Bradford.

Se llevó a cabo la curva de calibración 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 del stock de albúmina de suero bovino debe ser entre 1,2-10 µg/mL. En la Gráfica 1 se observa la curva de calibración obtenida.

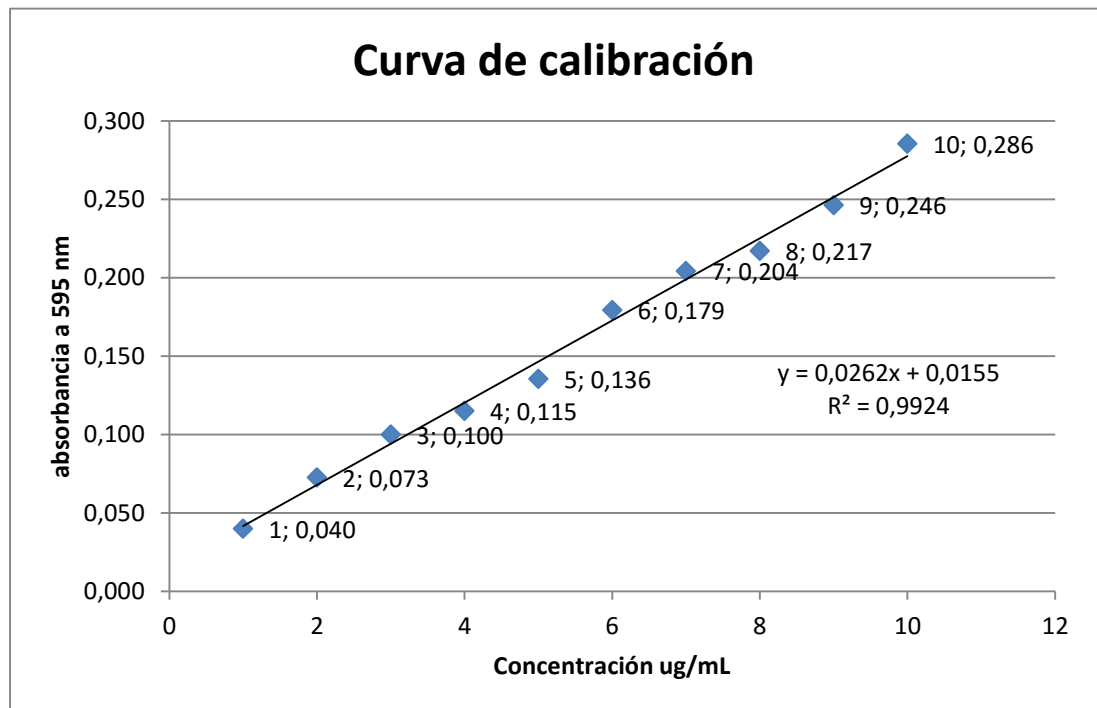


Gráfico 1. Curva de calibración

Una vez obtenida la curva de calibración, se tomó 1 µL del homogenizado en y se diluyó en 1000 µL de PBS 1X. Luego se tomó 1 µL de la dilución obtenida

y se diluyó en 1 mL de PBS1X y se repitió el mismo proceso. Luego se tomaron 500 μ L que fueron diluidos en 300 μ L de PBS 1X y en 200 μ L de reactivo de Bradford. Finalmente, se midió la absorbancia a 595nm, 25 minutos después de haber adicionado el reactivo de Bradford. Las absorbancias obtenidas del homogenizado de la corteza de los grupos experimentales de cada uno de los experimentos se observan en la Tabla 6 y la Tabla 7 respectivamente.

Tabla 6. Absorbancias obtenidas de los grupos experimentales SHAM – ISQ -PISQ

Cortezas	SHAM	ISQ	PISQ
absorbancias	0,1755	0,1905	0,2140
concentración ug /mL	18321	20038	22729
cantidad a agregar ug	40	40	40
volumen a tomar mL	0,00218333	0,00199619	0,00175987
volumen a tomar uL	2,18	2,00	1,76
volumen de buffer de carga	10	10	10
volumen de agua	7,82	8,00	8,24
volumen a servir	20	20	20

Tabla 7. Absorbancias obtenidas de los grupos experimentales SHAM – PSHAM1H –PSHAM6H

cortezas	SHAM	PSHAM1H	PSHAM6H
absorbancias	0,1755	0,1635	0,1990
concentración ug /mL	18321	16947	21011
cantidad a agregar ug	40	40	40
volumen a tomar mL	0,00218333	0,00236036	0,00190372
volumen a tomar uL	2,18	2,36	1,90
volumen de buffer de carga	10	10	10
volumen de agua	7,82	7,64	8,10
volumen a servir	20	20	20

7.6.2. Preparación de los geles de poliacrilamida

La realización de la electroforesis requiere la preparación geles de poliacrilamida al 8% con 3 pozos. Los reactivos utilizados para la realización de los geles son: Agua destilada, Acrilamida al 30%, Tris 1.5 M pH 8,8 para la solución Running, Tris 1M pH 6,7 para la solución Stacking, SDS 10%, persulfato de amonio 10% y TEMED. En la Tabla 8 se declaran las cantidades exactas que se utilizaron para la preparación de los geles de poliacrilamida al 8%

Tabla 8. Reactivos empleados para la elaboración de geles de poliacrilamida al 8%

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

7.6.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%

La cantidad de muestra que se determinada para cada pozo se diluyó con agua hasta obtener 10 µL de dilución, luego se adicionó 10 µL de buffer de carga Laemmli 2X. Esta solución, presente en un tubo eppendorf, se calentó por 5 minutos a 95°C la cual se centrifugó durante 30 segundos y por último se sembró en los pozos correspondientes. En la Tabla 9 y en la Tabla 10 se muestran las distribuciones de los grupos experimentales de cada experimento realizado. La electroforesis se corrió a 150 Voltios (V) y 0,120 Amperios (A), durante 1 hora y 50 minutos.

Tabla 9. Pozos del Western Blot para la medición de los niveles de glicosilación O-GlcNAc en grupos experimentales con acondicionamiento isquémico cerebral en diferentes tiempos de sacrificio.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MP	SHAM	PREC 1H	PREC 6 H	MP	SHAM	PREC 1H	PREC 6 H	-----	SHAM	PREC 1H	PREC 6 H

Tabla 10. Pozos del Western Blot para la medición de los niveles de glicosilación O-GlcNAc en grupos experimentales con isquemia y acondicionamiento-isquemia.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MP	SHAM	ISQUEMIA	PREC-ISQUEMIA	MP	SHAM	ISQUEMIA	PREC-ISQUEMIA	-----	SHAM	ISQUEMIA	PREC-ISQUEMIA

7.6.4. Transferencia

La realización de la transferencia tuvo como objetivo principal que las proteínas que se encontraban en el gel pasasen a una membrana de PVDF (fluoruro de polivilideno) previamente activada con 20 mL de metanol y equilibrada con buffer de transferencia. El proceso se llevará a cabo mediante

la fuerza de migración eléctrica de las proteínas ya que éstas poseen en el gel una carga negativa debido al SDS 10%. Este procedimiento se realizará a 150 Voltios (V) y 0,06 Amperios (A) por 3 horas bajo refrigeración constante. La estructura del *cassette* preparado fue el siguiente:

- 1- Esponja
- 2- Papel filtro
- 3- Membrana de PVDF
- 4- Gel de poliacrilamida al 8%
- 5- Papel filtro
- 6- Esponja

7.6.5. Bloqueo e incubación de la membrana de PVDF

El bloqueo de la membrana de PVDF se llevó a cabo con la adición de los siguientes reactivos: Tris-Buffer Salino y Tween 20 (TBST 1X) y albúmina de suero bovino (BSA) al 3% con agitación en un *shaker* a temperatura ambiente, realizado por una hora, con una velocidad de agitación de 13 rpm y un ángulo de 15°. Posteriormente, se retiró la solución de bloqueo de la membrana de PVDF y se incubó dicha membrana con el anticuerpo RL2 a 4°C durante toda una noche con agitación constante. Estos anticuerpos estuvieron diluidos en la misma solución con la que se realizó el bloqueo de la membrana (TBST + BSA 3%) para identificar la modificación post-traducciona O-GlcNAc en las proteínas de la corteza cerebral. Luego se lavó la membrana de PVDF cinco veces con TBST 1X por cinco minutos cada vez, con la finalidad de eliminar los restos de anticuerpo primario. Luego de estos lavados, se realizó la incubación del anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente. Este anticuerpo (anti hospedero rata) 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

7.6.6. Etapa de revelado

En esta etapa la membrana de PVDF se incubó con solución quimioluminiscente de revelado por 5 minutos, la cual está compuesta por peróxido de hidrógeno y luminol, en el cuarto oscuro de revelado de la Universidad Icesi. Luego, se llevó la membrana a las placas radiográficas para obtener la radiografía de la membrana, la cual se pasó por la máquina de revelado para dar como resultado las bandas de las proteínas con glicosilación tipo O-GlcNAc presentes en las membranas.

7.6.7. Análisis estadístico de datos

Los revelados obtenidos fueron fotografiados y posteriormente, se cuantificó la intensidad de cada una de las bandas obtenidas mediante el software

Image J y luego se normalizaron los datos con el control de carga. Se analizaron diferencias significativas de cada uno de los grupos experimentales mediante el software estadístico Graph Pad de Prism y la prueba de normalidad fue llevada a cabo con el software Minitab mediante la prueba de Ryan Joyner (Similar a Shapiro Wilk). Para la comparación de pares de poblaciones se usó la prueba t-Student de dos colas en aquellos valores que cumplieran con una distribución normal y los que no cumplieron con dicha prueba se les realizó la prueba no paramétrica de Mann Whitney.

8. MATRIZ DE MARCO LÓGICO

Objetivo			
Determinar si el preconditionamiento isquémico disminuye el tamaño de la zona de muerte cerebral en ratas Wistar sometidas a isquemia cerebral focal.			
Objetivo específico	Actividades	Indicadores	Supuestos
Determinar el desempeño neurológico de ratas preconditionadas y sometidas a isquemia cerebral focal mediante el test de García.	Elaborar un protocolo al comité de ética de la Universidad Icesi para el uso de ratas <i>Wistar</i> como modelos experimentales. Llevar a cabo la evaluación comportamental de las ratas a ser utilizadas como modelos experimentales. Participar como asistente en la extracción, disección y conservación de los cerebros de las ratas.	Determinar si las ratas han quedado con buena isquemia cerebral basado en los resultados del test de García.	Las ratas no queden con buena isquemia cerebral.

<p>Medir mediante TTC el volumen de muerte cerebral en ratas precondicionadas y sometidas a isquemia cerebral focal.</p>	<p>Llevar a cabo la prueba de volumetría con TTC en cortes de cerebros de ratas <i>Wistar</i> en forma coronal cada 2 mm a partir del polo frontal utilizando una matriz cerebral.</p> <p>Comparar el volumen de muerte neuronal en ambos grupos experimentales mediante el software Image J.</p> <p>Realizar un tratamiento estadístico mediante el software Prism de Graph Pad.</p>	<p>Determinar si existen diferencias significativas en los volúmenes de muerte neuronal de ambos grupos experimentales.</p>	<p>Disponibilidad del cloruro de 2,3,5-Trifeniltetrazolio (TTC) para llevar a cabo el experimento.</p> <p>Disponibilidad del software Prism, Image J y Minitab.</p>
<p>Registrar los niveles de O-GlcNAcilación de proteínas corticales en ratas precondicionadas y sometidas a isquemia cerebral focal, mediante la técnica de Western Blot.</p>	<p>Realizar Western Blot de glicosilación de proteínas corticales de acuerdo al Procedimiento Operativo Estándar (POE) del laboratorio de Fisiología animal de la Universidad Icesi.</p> <p>Comparar la intensidad de bandas obtenidas de la transferencia de membrana con el software Image J</p> <p>Realizar un tratamiento estadístico mediante el software Prism de Graph Pad.</p>	<p>Determinar si los modelos experimentales del grupo que tiene precondicionamiento isquémico poseen mayores niveles de glicosilación que aquellos que no lo tienen.</p>	<p>Disponibilidad de los reactivos y elementos necesarios para la realización del Western Blot.</p>

9. RESULTADOS

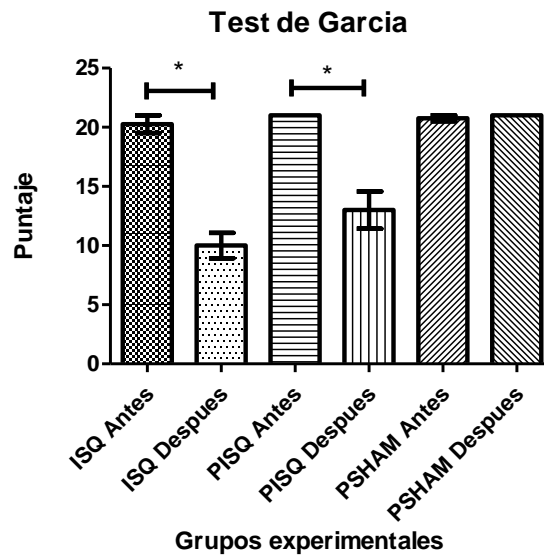
9.1. Tests neurológicos

Los tests neurológicos son una serie de pruebas a las cuales se somete el modelo experimental para evaluar de forma semi-cuantitativa el estado neurológico del mismo. Estos tests desafían al biomodelo con pruebas sensoriales y motoras con el objetivo de ver sus respuestas a los mismos antes y después de la intervención quirúrgica. Para ello se llevaron a cabo dos tests ampliamente utilizados en otros centros de investigación para evaluar modelos experimentales de neuroprotección como con los que se

trabajaron. Las pruebas llevadas a cabo son el test de García y el test de 28 puntos elaborado por la Universidad de Stanford.

9.1.1. Test de García

A



B

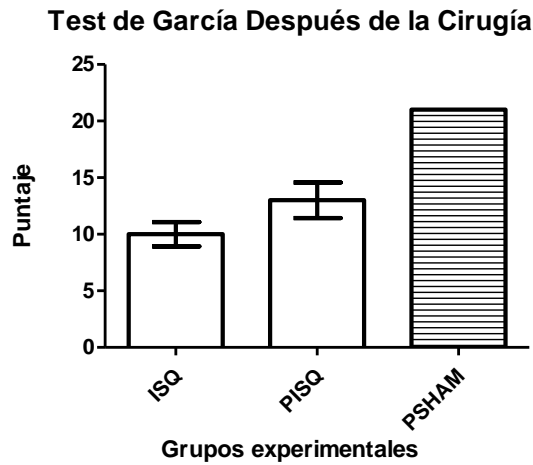
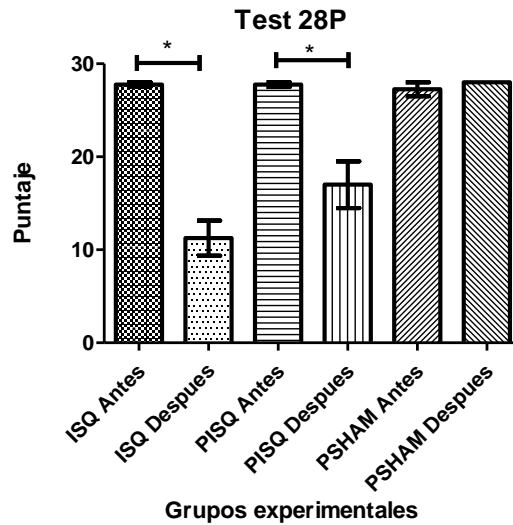


Figura 4. Resultados del test neurológico de García para evaluar la capacidad sensorio-motora de los biomodelos. **A.** Comparación del puntaje del test de García para cada grupo experimental antes y después de la las respectivas intervenciones quirúrgicas (media ±EEM, n=4, *, p<0.05 por la prueba de t-student). **B.** Comparación del puntaje del test de García para cada grupo experimental después de la las respectivas intervenciones quirúrgicas (media ±EEM, n=4, p>0.05 por la prueba de t-student).

9.1.2. Test 28P

A



B

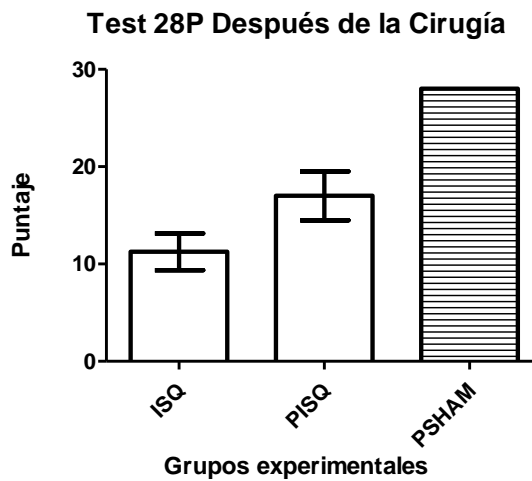


Figura 5. Resultados del test neurológico de los 28 puntos (28P) de la Universidad de Stanford para evaluar la capacidad sensorio-motora de los biomodelos. **A.** Comparación del puntaje del test de 28P para cada grupo experimental antes y después de las respectivas intervenciones quirúrgicas (media \pm EEM, $n=4$, *, $p<0.05$ por la prueba de *t*-student). **B.** Comparación del puntaje del test de 28P para cada grupo experimental después de las respectivas intervenciones quirúrgicas (media \pm EEM, $n=4$, $p>0.05$ por la prueba de *t*-student).

9.2. Volumetría por TTC

La volumetría por TTC es una técnica de biología molecular utilizada para medir el tamaño de muerte celular de un órgano. Ésta se fundamenta en el uso del reactivo 2, 3,5-Trifeniltetrazolio (TTC), las sales de tetrazolio se oxidan fácilmente en presencia de las deshidrogenasas producidas en las mitocondrias presentes en tejido vivo exhibiendo una coloración roja;

aquellas zonas donde el tejido está muerto no presenta coloración alguna porque carecen de mitocondrias que produzcan enzimas capaces de oxidar el reactivo. En la Figura 6A se pueden observar las diferencias en el área de muerte celular de diferentes grupos experimentales evaluados en este proyecto de investigación. En el momento de realizar el análisis de áreas de tejido vivo se tuvo la precaución de no tomar las zonas de proyecciones axónicas como zonas de muerte celular.

Se realizó una medición semi-automática con el software image J del porcentaje de isquemia cerebral de los modelos experimentales tal como se indicó en la metodología y se obtuvieron los resultados resumidos en la Figura 6B. Luego con el software Graph Pad se llevó a cabo la prueba t de student para la comparación del grupo con isquemia cerebral y el grupo con preconditionamiento isquémico-isquemia cerebral, puesto que los datos seguían una distribución normal según la prueba de Ryan Joyner (Ver Anexo 3). En los resultados se observa que con un nivel de confianza del 95%, los datos obtenidos entre el grupo con preconditionamiento isquémico-isquemia y el grupo con isquemia presentaban diferencias estadísticamente significativas. El test realizado para la comparación de las dos poblaciones de datos fue la t de student (ver Anexo 3).

A



B

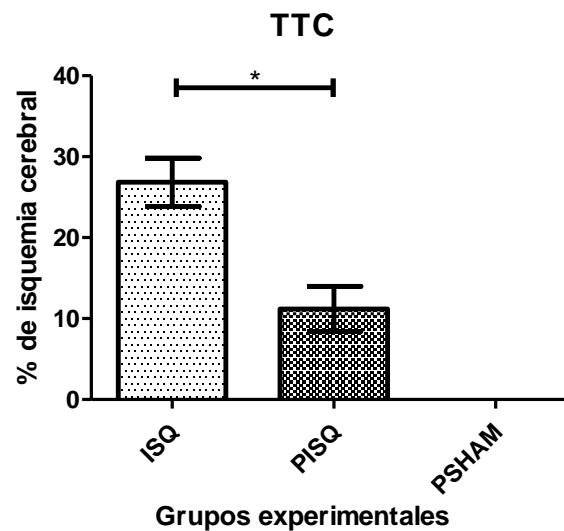


Figura 6. A. Fotografías tomadas en el cuarto del microscopio de epifluorescencia de la Universidad Icesi con cámara Nikon acoplada a estereoscopio Nikon, mediante el software NisElements F de Nikon. Las fotografías corresponden a cortes de 2,00 mm aproximadamente de los cerebros de los biomodelos empleados; en cada corte se fotografió la cara anterior y posterior. Las fotografías de la izquierda corresponden a los modelos experimentales tratados con isquemia, las del centro de los biomodelos que fueron tratados con preconditionamiento isquémico- isquemia y la derecha corresponde al grupo control. **B.** Comparación del porcentaje de isquemia cerebral en los grupos experimentales de isquemia y preconditionamiento isquémico-isquemia (media \pm EEM, $n=4$, *, $p<0.05$ por la prueba de t-student).

9.3. Western Blot

Se evaluaron los niveles de glicosilación tipo O-GlcNAc de las proteínas presentes en la corteza frontoparietal derecha de ratas *Wistar (Rattus norvegicus)* albinas machos. Estos niveles fueron medidos por la técnica de Western Blot, la cual es utilizada para medir niveles de expresión de proteínas y de presencia de modificaciones post-traduccionales. Para medir los niveles de O-GlcNAcilación se empleó el anticuerpo de β -actina como control de carga para el experimento en el cual se compararon tales niveles de grupos experimentales con preconditionamiento isquémico SHAM a 1 hora y 6 horas respectivamente (experimento SHAM- PSHAM 1h- PSHAM 6h). Mientras que para la comparación de niveles de O-GlcNAcilación de los grupos experimentales con isquemia y preconditionamiento isquémico-isquemia se utilizó el control de carga de la β -Tubulina (experimento SHAM-ISQ- PISQ). En cada experimento se obtuvo diferentes bandas correspondientes a los niveles de glicosilación O-GlcNAc de proteínas totales presentes en el determinado peso molecular analizado. Luego por densitometría se midió la densidad relativa de cada grupo experimental con el software image J. Finalmente, se llevó a cabo el análisis estadístico con el software Graph Pad de Prism y Minitab, en donde se hizo el test de normalidad con la prueba de Ryan Joyner para determinar si los datos seguían una distribución normal con un nivel de confianza del 95%. Para la comparación de pares de poblaciones del experimento SHAM – ISQ – PISQ, se elaboró la prueba t de Student puesto que los datos seguían una distribución normal, mientras que para los pares de poblaciones del experimento SHAM- PSHAM 1h- PSHAM 6h se llevó a cabo la prueba no paramétrica de Mann Whitney. Los resultados de las bandas de cada experimento se pueden ver a continuación.

9.3.1. Experimento SHAM – ISQ – PISQ

El control de carga utilizado en el presente experimento fue la β -Tubulina, con la cual se normalizaron los datos de cada grupo experimental. Se observaron cuatro bandas en la membrana de PVDF con el anticuerpo RL2 así que se prosiguió a analizar por densitometría las bandas por separado desde la más superior hasta la más inferior y finalmente, el carril completo. Las pruebas de normalidad de cada banda junto con el análisis estadístico obtenido se encuentran en el Anexo 4

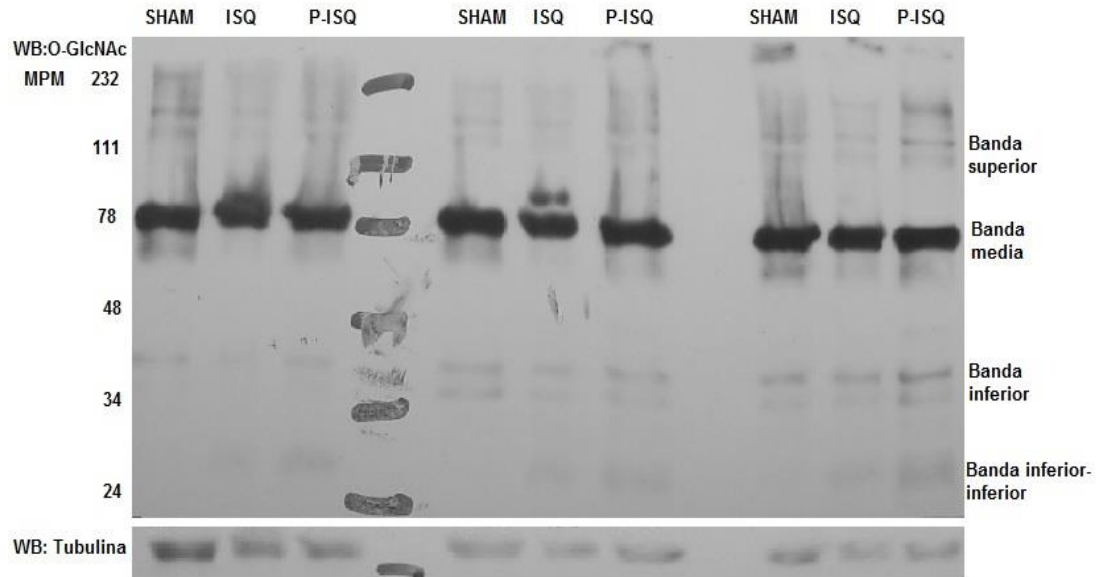


Figura 7. Caracterización de la glicosilación tipo O-GlcNAc en corteza frontoparietal de cerebros de ratas Wistar macho sometidas a isquemia cerebral focal. Los grupos experimentales analizados fueron: SHAM=Grupo control (no fue sometido a isquemia cerebral focal ni al estímulo del preconditionamiento isquémico), ISQ= Grupo que sólo fue sometido a isquemia cerebral focal, P-ISQ= Grupo que fue sometido a preconditionamiento isquémico y una hora después a isquemia cerebral focal. En la imagen se encuentra el Immunoblot con anticuerpo monoclonal RL2 contra proteínas O-GlcNAcizadas mostrando detección de O-GlcNAc y su control de carga β -Tubulina, WB: Western Blot, MPM: Marcador de Peso Molecular en KDa.

9.3.1.1. Banda Superior

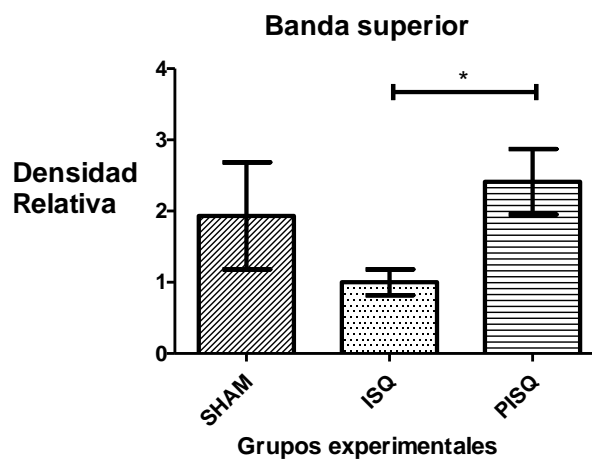


Gráfico 2. Comparación de las densidades relativas de los niveles de O-GlcNAcización de proteínas corticales en la banda superior de cada grupo experimental, medidos por densitometría normalizadas contra el control de carga (media \pm EEM, $n=3$, *; $p < 0.05$ por la prueba t de student).

9.3.1.2. Banda media

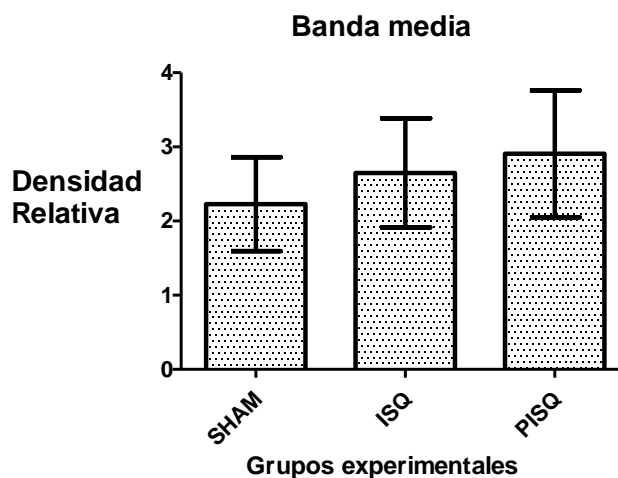


Gráfico 3. Comparación de las densidades relativas de los niveles de O-GlcNAcificación de proteínas corticales en la banda media de cada grupo experimental, medidos por densitometría normalizadas contra el control de carga (media ±EEM, n=3, p>0.05 por la prueba t de student).

9.3.1.3. Banda Inferior

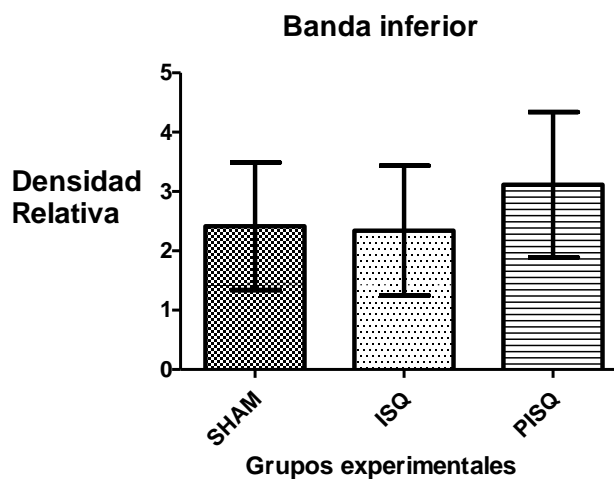


Gráfico 4. Comparación de las densidades relativas de los niveles de O-GlcNAcificación de proteínas corticales en la banda inferior de cada grupo experimental, medidos por densitometría normalizadas contra el control de carga (media ±EEM, n=3, p>0.05 por la prueba t de student).

9.3.1.4. Banda inferior-inferior

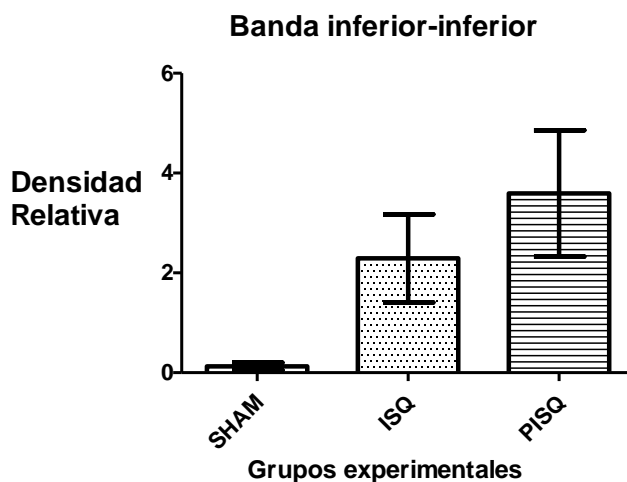


Gráfico 5. Comparación de las densidades relativas de los niveles de O-GlcNAcificación de proteínas corticales en la banda inferior-inferior de cada grupo experimental, medidos por densitometría normalizadas contra el control de carga (media ±EEM, n=3, p>0.05 por la prueba t de student).

9.3.1.5. Carril Completo

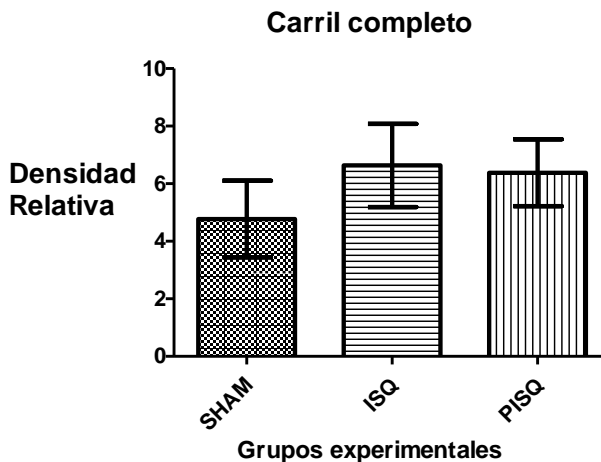


Gráfico 6. Comparación de las densidades relativas de los niveles de O-GlcNAcificación de proteínas corticales en el carril completo de cada grupo experimental, medidos por densitometría normalizadas contra el control de carga (media ±EEM, n=3, p>0.05 por la prueba t de student).

9.3.2. Experimento SHAM – PSHAM 1h – PSHAM 6h

El control de carga utilizado en el presente experimento fue la β -Actina, con la cual se normalizaron los datos de cada grupo experimental. Se observaron dos bandas en la membrana de PVDF con el anticuerpo RL2 así que se prosiguió a analizar por densitometría las bandas por separado desde la más superior hasta la más inferior y finalmente, el carril completo. Las pruebas de normalidad de cada banda junto con el análisis estadístico obtenido se encuentran en el Anexo 4

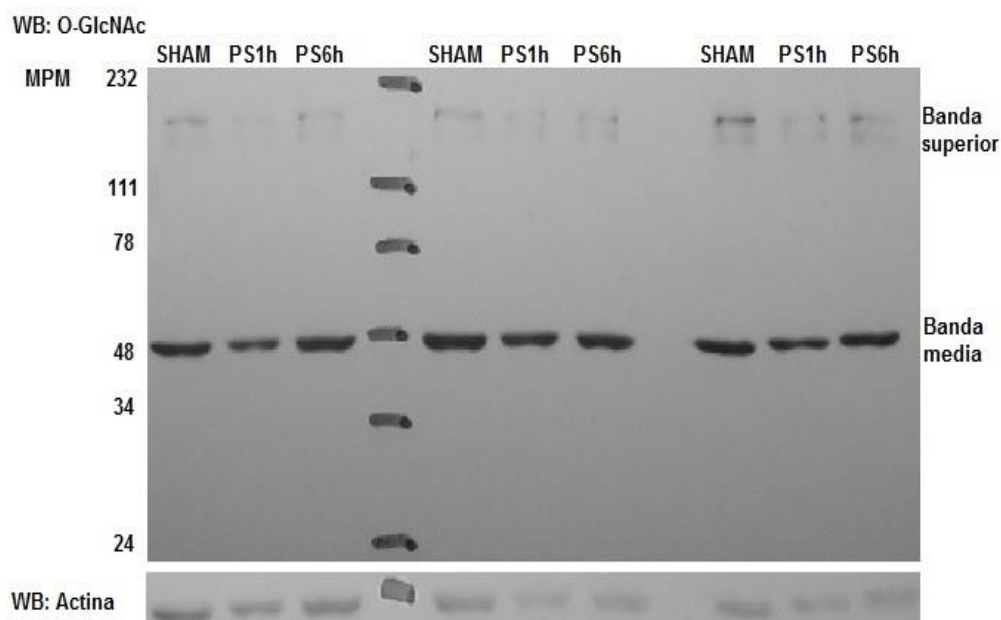


Figura 8. Caracterización de la glicosilación tipo O-GlcNAc en corteza frontoparietal de cerebros de ratas Wistar macho sometidas a isquemia cerebral focal. Los grupos experimentales analizados fueron: SHAM=Grupo control (no fue sometido a isquemia cerebral focal ni al estímulo del preconditionamiento isquémico), PS1h= Grupo que sólo fue sometido a preconditionamiento isquémico y fue sacrificado en 1 hora, PS6h= Grupo que sólo fue sometido a preconditionamiento isquémico y fue sacrificado en 6 horas. En la imagen se encuentra el Inmunoblot con anticuerpo monoclonal RL2 contra proteínas O-GlcNAcizadas mostrando detección de O-GlcNAc y su control de carga β -Tubulina, WB: Western Blot, MPM: Marcador de Peso Molecular en KDa.

9.3.2.1. Banda superior

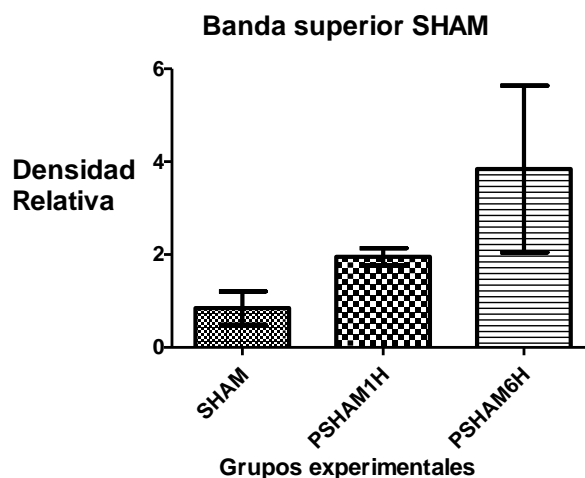


Gráfico 7. Comparación de las densidades relativas de los niveles de O-GlcNAcilación de proteínas corticales en la banda superior de cada grupo experimental, medidos por densitometría normalizadas contra el control de carga (media ±EEM, n=3, p>0.05 por la prueba t de student).

9.3.2.2. Banda media

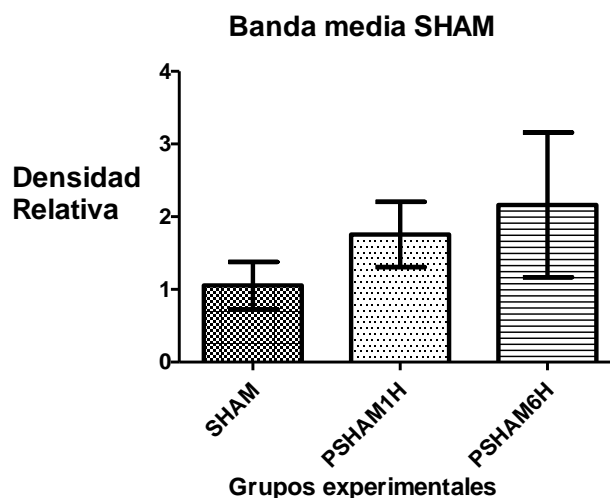


Gráfico 8. Comparación de las densidades relativas de los niveles de O-GlcNAcilación de proteínas corticales en la banda media de cada grupo experimental, medidos por densitometría normalizadas contra el control de carga (media ±EEM, n=3, p>0.05 por la prueba t de student).

9.3.2.3. Carril completo

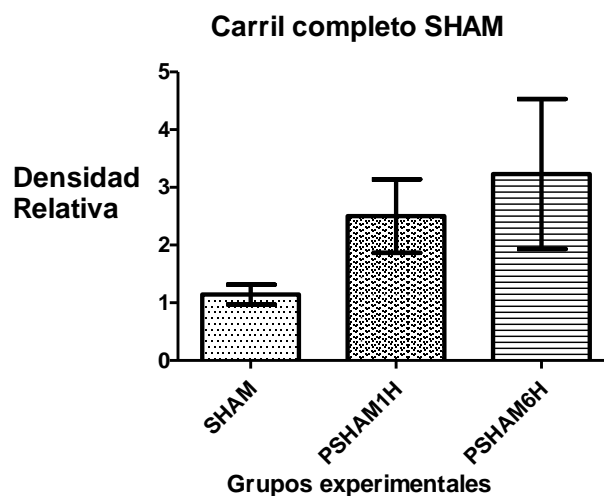


Gráfico 9. Comparación de las densidades relativas de los niveles de O-GlcNAcilación de proteínas corticales en el carril completo de cada grupo experimental, medidos por densitometría normalizados contra el control de carga (media \pm EEM, $n=3$, $p>0.05$ por la prueba t de student).

10. DISCUSIÓN

Los accidentes cerebrovasculares (ACV) en la actualidad son la primera causa de incapacidad física en el mundo y la tercera causa de muerte (Lloyd-jones et al., 2009). El ACV que más prevalencia tiene es la isquemia cerebral, la cual consiste en la interrupción de sangre hacia una zona particular del cerebro y puede llegar a causar problemas motores, cognitivos e incluso la muerte de la persona que los padece (Rang, Dale, Ritter, & Flower, 2012). Por ello, se ha tratado de invertir recursos en investigación para mitigar los daños ocasionados por los ACV, uno de ellos corresponde al preconditionamiento isquémico, el cual consiste en la estimulación del órgano a periodos no letales de isquemia para adaptar de alguna forma al órgano a un insulto mucho mayor. Numerosos estudios que se han dedicado a evaluar el preconditionamiento isquémico han demostrado que este podría estimular vías endógenas que confluyan finalmente en brindar protección celular a las células cerebrales (Dawson, Valina L. Dawson, 2000) .

El presente trabajo de investigación se enmarcó en un estudio preclínico con modelos experimentales de la especie *Rattus norvegicus* machos de la cepa *Wistar*, los cuales son apropiados por su bajo costo, fácil manipulación y relativa homogeneidad genética (Arango-Dávila, Pimienta, & Escobar, 2002). Se evaluó el efecto citoprotector del preconditionamiento isquémico y su

relación con la glicosilación del tipo O-GlcNAc de proteínas corticales. Para ello, los modelos experimentales fueron sometidos a dos tests neurológicos: El test de García y el test de los 28 puntos de la Universidad de Stanford. Ambos tests han sido documentados por medir las características sensorio-motoras de los modelos experimentales estudiados en el laboratorio (Stanford Medicine, 2016). La Figura 4 y la Figura 5 resumen los resultados obtenidos en el test de García y el test 28P respectivamente después de la intervención quirúrgica. Con un nivel de confianza del 95% (Valor $p < 0.05$) se obtuvo que no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales con isquemia y preconditionamiento isquémico-isquemia después de las cirugías, dado que el valor p obtenido fue de 0,1682 y 0,1173 respectivamente. Sin embargo, para cada grupo experimental si hubo diferencias estadísticamente significativas de los puntajes de ambos tests antes y después de las cirugías, lo cual indica que el estrés celular provocado por las mismas propició un fallo sensorio-motor en los modelos experimentales que fueron sometidos a dicha intervención quirúrgica, tanto para los sujetos con isquemia como los que fueron previamente preconditionados. . Para ello, se debe tener en cuenta que el preconditionamiento isquémico se trata de todas maneras de un insulto al tejido cerebral, aunque menor, y tiene el efecto de generar la tolerancia del mismo contra un insulto isquémico mayor, según lo medido por volumetría con TTC que se explicará más adelante (Ver figura 6).

Por otro lado, a pesar de no haber diferencias significativas entre los biomodelos con isquemia cerebral y preconditionamiento isquémico-isquemia después de la intervención quirúrgica, se puede señalar que hay una tendencia a aumentar el puntaje en el grupo con preconditionamiento isquémico-isquemia, lo cual indica que el daño sensorio-motor fue ligeramente menor en el grupo experimental que fue previamente preconditionado que en el grupo que sólo tuvo isquemia cerebral. Esta tendencia observada se puede ser sustentada por lo siguiente: Se han demostrado varios mecanismos implicados en los efectos neuroprotectores que ofrece el preconditionamiento isquémico (PI), dependiendo si se trata de un PI tardío o temprano. El PI tardío está relacionado con cambios en la expresión de proteínas, por ejemplo, factores de crecimiento celular tales como el factor de crecimiento similar a la insulina, el factor de crecimiento 2 de fibroblastos, el factor de crecimiento epidermal, la eritropoyetina humana, etc. Tales proteínas promueven la tolerancia isquémica del tejido que después es afectado por un insulto mayor haciendo resistencia a los procesos apoptóticos e inflamatorios (Wang et al., 2016)(Dawson, Valina L. Dawson, 2000) . Mientras que el preconditionamiento isquémico temprano, con el cual se trabajó en éste proyecto de investigación, está relacionado con la regulación de proteínas mediante cambios en las modificaciones post-traduccionales, tales como la fosforilación, la S-nitrosilación, la O-GlcNAcilación, la O-GalNAcilación, etc. En un estudio publicado en enero del 2016 se concluye que el preconditionamiento isquémico cerebral promueve

la neuroprotección por la vía de CaMKII a través de un mecanismo de fosforilación de la sintasa de óxido nítrico (Wang et al., 2016) (Iadecola, Kahles, Gallo, & Anrather, 2011) lo cual se relaciona íntimamente con la respuesta sensorio-motora de los modelos experimentales.

Se realizó un experimento de tinción de cortes cerebrales de ratas Wistar mediante el reactivo 2,3,5 Cloruro de Trifeniltetrazolio (TTC) al 0.05%. Los resultados del estudio se pueden resumir en la Figura 6. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo experimental que tuvo sólo isquemia cerebral y el grupo que tuvo preconditionamiento isquémico y luego fue sometido una hora después a un insulto isquémico mucho mayor mediante la metodología MCAO (Middle Cerebral Artery Occlusion). El porcentaje de isquemia cerebral fue mayor en el grupo experimental que sólo fue sometido a isquemia cerebral, lo cual infiere que el tratamiento preconditionante promovió la viabilidad celular en la zona del insulto. Estos resultados se complementan mutuamente con la tendencia observada en los test neurológicos a mejorar la respuesta sensorio-motora de los biomodelos que fueron previamente preconditionados y estudios de viabilidad celular donde se ha investigado el efecto citoprotector del preconditionamiento isquémico en cardiomiocitos, los cuales señalan que dicho tratamiento experimental promueve la supervivencia celular cardiaca, sin embargo, los mecanismos por los cuales éste opera son desconocidos aún (Marsh, Collins, & Chatham, 2014).

Se ha estudiado el preconditionamiento isquémico cerebral en ratas macho *Sprague-Dawley*, en donde los investigadores concluyen que dicho tratamiento podría proteger las neuronas mediante el bloqueo de la fosforilación de las proteínas c-Jun y la expresión de FasL (Wang et al., 2016). Por otro lado, varios investigadores han realizado estudios *in vitro* en donde se simulan las condiciones proporcionadas por el preconditionamiento isquémico, tales estudios se hacen con cultivos celulares en condiciones de privación de glucosa y oxígeno (OGD, por sus siglas en inglés); los cuales han señalado que periodos breves de OGD aumentan la viabilidad celular cuando se someten los cultivos celulares a periodos de OGD más extensos. Dentro de los posibles mecanismos observados en los estudios *in vitro* se encuentran la activación de Ras, la estimulación de los receptores NMDA y la activación de la sintasa de óxido nítrico (Dawson, Valina L. Dawson, 2000), los cuales podrían ser parte de los mecanismos subyacentes al experimento realizado.

Con el objetivo de complementar los resultados obtenidos por volumetría de TTC se llevaron cabo dos experimentos con la técnica de Western Blot, en la cual se identificaron los niveles totales de glicosilación O-GlcNAc de proteínas presentes en la corteza cerebral de los modelos experimentales. La razón por la cual se quiso evaluar dicha modificación post-traducciona, es porque en experimentos realizados en nuestro laboratorio se ha

encontrado que con la administración intraperitoneal de Clorhidrato de glucosamina, han aumentado los niveles de O-GlcNAcilación de varias proteínas, tales como AKT (Mosquera, 2013) y GSK3 β (Araque, 2014); a su vez, el aumento en los niveles de glicosilación O-GlcNAc podría estar relacionado con un aumento en la tolerancia de órganos como el corazón o el cerebro al estrés celular (Dawson, Valina L. Dawson, 2000; Zachara & Hart, 2004; Zachara et al., 2004), por ende, se quiso saber si en el preconditionamiento isquémico también existe un aumento en tales niveles de O-GlcNAcilación.

En el primer experimento se analizaron las bandas obtenidas con el anticuerpo RL2 de grupos experimentales que fueron sometidos a isquemia, preconditionamiento isquémico-isquemia y un grupo control SHAM, el cual ni fue sometido al estímulo del preconditionamiento isquémico ni al insulto isquémico mayor (Ver Figura 7). Se llevó a cabo la comparación de pares para la banda superior mediante la prueba t de student, en donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con isquemia y el grupo con preconditionamiento isquémico-isquemia a ese nivel de confianza (Ver Gráfico 2), lo cual parece indicar que el preconditionamiento isquémico permitió que los niveles de glicosilación O-GlcNAc aumentasen respecto al grupo experimental con isquemia cerebral significativamente, sin embargo, frente al grupo SHAM no hubo diferencias significativas; éste resultado señala que por alguna razón el preconditionamiento isquémico promueve que los niveles de glicosilación O-GlcNAc en ciertas proteínas corticales con un peso molecular aproximado entre ~111 a 232 KDa, y susceptibles a tal modificación post-traducciona sean aumentados, logrando así mismo mantener los niveles normales de O-GlcNAcilación cuando es comparada con el grupo control SHAM. Éste resultado podría estar relacionado con la diferencia significativa obtenida entre el grupo de isquemia y preconditionamiento isquémico-isquemia en el experimento de tinción con TTC, en donde el aumento en la viabilidad celular de los cortes cerebrales analizados probablemente están directamente relacionados con el aumento en los niveles de glicosilación O-GlcNAc de las proteínas presentes en esta banda superior. Un estudio realizado en corazones de ratón podría estar relacionado con lo obtenido en nuestro laboratorio, en éste estudio se ha demostrado que el preconditionamiento isquémico cardíaco aumenta los niveles de glicosilación O-GlcNAc en cardiomiocitos y a su vez, el aumento farmacológico de los niveles de O-GlcNAcilación fue suficiente para reducir el tamaño de infarto miocárdico (Jones et al., 2008).

Por otro lado, se llevó a cabo la prueba de comparación de pares en la banda media y en la banda inferior por la prueba t de student (Ver Gráficos 3 y 4 respectivamente). Los resultados señalaron que los niveles de O-GlcNAcilación que se encuentran en condiciones normales se mantienen estadísticamente constantes en los tres grupos experimentales, lo cual indica

que ciertas proteínas corticales susceptibles a la O-GlcNAcilación con pesos moleculares cercanos a 34 y 78 KDa aproximadamente, no presentan cambios en los niveles de O-GlcNAcilación por el tratamiento preconditionante ni por el insulto isquémico. Por otro lado, los resultados de la banda más inferior se señalan que no existen diferencias significativas entre los tres grupos experimentales, tal como sucedió con la banda media y la banda inferior. Sin embargo, éstos resultados presentan la particularidad de que el error estándar de la media (EEM) de los grupos experimentales con isquemia y preconditionamiento isquémico-isquemia no se traslapan con los del grupo SHAM, lo cual infiere que los niveles de glicosilación O-GlcNAc de los grupos experimentales con isquemia y con preconditionamiento isquémico-isquemia tienen una tendencia a aumentar, el último en mayor medida con un valor p de 0.0520 (Ver Gráfico 5). Por ende, a pesar de que no hay diferencias estadísticamente significativas, existe una tendencia al aumento en las O-GlcNAcilaciones de dichas proteínas corticales, lo cual podría estar relacionado con un aumento en la viabilidad celular proporcionada por el preconditionamiento isquémico cerebral en el experimento de tinción con el reactivo TTC. En un estudio publicado sobre O-GlcNAcilación de quinasas se menciona que tal modificación post-traduccional es dinámica y modula la función de muchas proteínas. En el estudio realizado se evaluaron 108 quinasas, de las cuales 42 fueron identificadas por ser susceptibles a la O-GlcNAcilación; además, hay una gran evidencia de que la OGT y la OGA modifican tanto dinámica como específicamente a cientos de proteínas, las cuales probablemente pertenezcan a las proteínas analizadas en este experimento (Dias, Cheung, & Hart, 2012).

En el segundo experimento realizado con Western Blot se determinaron los cambios en los niveles de glicosilación O-GlcNAc de proteínas corticales a diferentes tiempos de realizado el tratamiento preconditionante. Los biomodelos evaluados fueron sometidos únicamente al tratamiento de preconditionamiento isquémico cerebral y sacrificados a 1 hora y 6 horas respectivamente (Ver Figura 8). Se obtuvo 2 bandas, una banda media y una banda superior. Los resultados obtenidos en la banda superior y en el carril completo señalan que los niveles de O-GlcNAcilación de los grupos experimentales con tiempos de sacrificio de una hora y seis horas tienen una tendencia a aumentar con respecto al grupo control SHAM, a pesar de no existir diferencias significativas (Ver Gráficos 7 y 9 respectivamente). Esta tendencia puede ser explicada porque en experimentos realizados en corazón se ha demostrado que el preconditionamiento isquémico aumenta los niveles de glicosilación O-GlcNAc de proteínas cuando se compara con un control, al parecer éste aumento se ha relacionado con un aumento en la actividad de la enzima OGT (Jensen, Johnsen, Kristiansen, Zachara, & Tker, 2013). Lo cual pudo haber permitido la tendencia a aumentar los niveles glicosilación O-GlcNAc de proteínas con pesos moleculares cercanos a los

111 - 232 KDa y en promedio los de todas las bandas observadas, teniendo en cuenta que la glicosilación O-GlcNAc se ha involucrado en procesos de citoprotección (Zachara et al., 2004). Se ha descrito que el preconditionamiento isquémico temprano dura aproximadamente de 1 a 3 horas y es independiente de la síntesis de proteínas (Romanque, Pamela M & Videla, 2005), los resultados obtenidos sugieren que entre una y seis horas los niveles de O-GlcNAcilación se mantienen constantes pero ligeramente aumentados con respecto al grupo control, lo cual infiere que si la glicosilación O-GlcNAc hace parte de los mecanismos del preconditionamiento isquémico temprano, no es la única forma en la que éste proporciona protección celular puesto que a las seis horas evaluadas no hay una reducción de los niveles de O-GlcNAcilación; se han descrito otros mecanismos involucrados en el preconditionamiento isquémico temprano en donde participan moléculas clave como la adenosina y las especies reactivas de oxígeno (Juan C. Cutin, Maria Giulia Ferreri, Barbara Cavalieri, Catafau, & Poli, 2002; Korthuis, Gute, Cepinskas, & Kvietys, 1998) Por otro lado, los resultados específicos obtenidos en la banda media señalan que no existen diferencias estadísticamente significativas ni tampoco existe la tendencia a aumentar en ninguno de los grupos experimentales evaluados frente al grupo SHAM a ese nivel de confianza (Ver Gráfico 8).

Así pues, los resultados sugieren que probablemente existe una relación directamente proporcional entre el aumento en los niveles de glicosilación O-GlcNAc de proteínas de alto peso molecular (~111 - 232 KDa) y la tendencia de tales niveles a aumentar en proteínas de bajo peso molecular (~24 - 34 KDa) con un aumento en la supervivencia celular en relación al tratamiento experimental del preconditionamiento isquémico cerebral. No obstante, está fuera del alcance de éste proyecto de investigación determinar específicamente cuáles son las proteínas involucradas, ya que para ello se requerirían otras técnicas instrumentales de biología molecular en donde se hagan experimentos de inmunoprecipitación. Por otro lado, se determinó que la O-GlcNAcilación podría ser parte de los mecanismos relacionados con la citoprotección proporcionada por el preconditionamiento isquémico temprano, sin embargo no es la única. Es por ello, que éste proyecto puede servir como guía para futuros proyectos de investigación en materia de preconditionamiento isquémico cerebral que pretendan evaluar niveles de O-GlcNAcilación de proteínas específicas.

11. CONCLUSIONES

- El preconditionamiento isquémico promueve la viabilidad celular en un modelo experimental de isquemia cerebral cuando éste es sometido a un periodo letal de isquemia.
- El aumento de la glicosilación tipo de O-GlcNAc de proteínas de alto peso molecular (~111 - 232 KDa) susceptibles a la O-GlcNAcilación podría estar relacionada con un aumento en la viabilidad de las células cerebrales cuando éstas se someten a preconditionamiento isquémico
- La O-GlcNAcilación de proteínas con pesos moleculares aproximados de 24 y 34 KDa tiende a aumentar en modelos experimentales que fueron previamente preconditionados. Estos resultados podrían estar relacionados también con el aumento en la viabilidad celular observado.
- La O-GlcNAcilación de proteínas corticales podría estar involucrado en conferir citoprotección a células cerebrales en el preconditionamiento isquémico temprano, sin embargo, no es el único mecanismo involucrado.

12. RECOMENDACIONES

- Se deberían realizar estudios de inmunoprecipitación para identificar cuáles proteínas probablemente estén involucradas en promover la citoprotección en los pesos moleculares observados.
- Se deben hacer estudios computacionales que complementen los resultados obtenidos, evaluando la glicosilación tipo O-GlcNAc de proteínas que posiblemente estén involucradas en ofrecer citoprotección.
- Los resultados deben ser abiertos al público en general para que sirvan como guía de futuros proyectos de investigación y se obtengan resultados oportunos.

13. REFERENCIAS

- Ankarcrona, M., Dypbukt, J. M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S. A., & Nicotera, P. (1995). Glutamate-induced neuronal death: A succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*, 15(4), 961–973. [http://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90186-8](http://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90186-8)
- Arango-Dávila, C. A., Pimienta, H. J., & Escobar, M. I. (2002). Evaluación de un modelo de isquemia cerebral experimental en ratas. *Salud UIS*.
- Araque, E. V. (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. Universidad Icesi. Icesi.
- Dassanayaka, S., & Jones, S. P. (2014). O-GlcNAc and the cardiovascular system. *Pharmacology and Therapeutics*, 142(1), 62–71. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.11.005>
- Dawson, Valina L. Dawson, T. (2000). Neuronal ischaemic, 21(November), 423–424.
- Del Cañizo López, J. F., López Martín, D., Lledó García, E., & García Barreno, P. (2008). Diseño de modelos experimentales en investigación quirúrgica. *Actas Urológicas Españolas*, 32(1), 27–40. [http://doi.org/10.1016/S0210-4806\(08\)73794-X](http://doi.org/10.1016/S0210-4806(08)73794-X)
- Dias, W. B., Cheung, W. D., & Hart, G. W. (2012). O -GlcNAcylation of kinases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 422(2), 224–228. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.124>
- Förster, S., Welleford, A. S., Triplett, J. C., Sultana, R., Schmitz, B., & Butterfield, D.A. (2014). Increased O-GlcNAc levels correlate with decreased O-GlcNAcase levels in Alzheimer disease brain. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1842(9), 1333–1339. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.05.014>
- Godoy, D. A., Rabinstein, A., Videtta, W., & Murillo-Cabezas, F. (2010). Manejo óptimo de la glucemia en el paciente neurocrítico. *Revista de Neurología*, 51(12), 745–756.
- González-García, C. (2000). Cisteína proteasas y neurodegeneración. *Revista de Neurología*, 31(4), 333–340
- Hacke, W., Albers, G., Al-Rawi, Y., Bogousslavsky, J., Davalos, A., Eliasziw, M., ... Warach, S. (2005). The Desmoteplase in Acute Ischemic Stroke Trial (DIAS): A phase II MRI-based 9-hour window acute stroke thrombolysis trial with intravenous desmoteplase. *Stroke*, 36(1), 66–73. <http://doi.org/10.1161/01.STR.0000149938.08731.2c>
- Hwang, S., Shin, J., Hwang, J., Kim, S., Shin, J., & Oh, E. (2010). Glucosamine Exerts a Neuroprotective Effect via Suppression of Inflammation in Rat Brain Ischemia / Reperfusion Injury, 1892(July), 1881–1892. <http://doi.org/10.1002/glia.21058>
- Iadecola, C., Kahles, T., Gallo, E. F., & Anrather, J. (2011). Neurovascular

- protection by ischaemic tolerance: role of nitric oxide. *The Journal of Physiology*, 589(Pt 17), 4137–45. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.210831>
- Jensen, R. V., Johnsen, J., Kristiansen, S. B., Zachara, N. E., & Tker, H. E. B. Ø. (2013). Ischemic preconditioning increases myocardial O-GlcNAc glycosylation, (September 2012), 168–174. <http://doi.org/10.3109/14017431.2012.756984>
- John C. Chatham, R. B. M. (2012). response to stress, 5(1), 49–59.
- Jones, S. P., Zachara, N. E., Ngoh, G. A., Hill, B. G., Teshima, Y., Bhatnagar, A., ... Marbán, E. (2008). Cardioprotection by N -Acetylglucosamine Linkage to Cellular Proteins. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.730515>
- Juan C. Cutin, Maria Giulia Ferreri, Barbara Cavalieri, C. P., Catafau, J. R., & Poli, G. (2002). MICROVASCULAR DYSFUNCTION INDUCED BY REPERFUSION INJURY, 33(9), 1200–1208.
- Korthuis, R. J., Gute, D. C., Cepinskas, G., & Kvietys, P. R. (1998). Cellular mechanisms of acute versus delayed preconditioning, 5, 35–48.
- Liu, J., Pang, Y., Chang, T., Bounelis, P., Chatham, J. C., & Marchase, R. B. (2006). Increased hexosamine biosynthesis and protein O -GlcNAc levels associated with myocardial protection against calcium paradox and ischemia, 40, 303–312. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2005.11.003>
- Liu, X., Sheng, R., & Qin, Z. (2009). The neuroprotective mechanism of brain ischemic preconditioning, 1071–1080. <http://doi.org/10.1038/aps.2009.105>
- Lloyd-jones, D., Adams, R., Carnethon, M., Simone, G. De, Ferguson, T. B., Flegal, K., ... Hong, Y. (2009). Heart Disease and Stroke Statistics — 2009 Update A Report From the American Heart Association Statistics Committee. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.191261>
- Marsh, S. A., Collins, H. E., & Chatham, J. C. (2014). Protein O -GlcNAcylation (Patho) physiology *, 289(50), 34449–34456. <http://doi.org/10.1074/jbc.R114.585984>
- Mosquera, L. I. (2013). Evaluación de los efectos de la glicosilación tipo O-GlcNAc y la O-Fosforilación sobre la proteína AKT y su posible repercusión en la viabilidad neuronal en eventos de isquemia cerebral. Universidad Icesi. Icesi.
- Obrenovitch, T. P. (2008). Molecular physiology of preconditioning-induced brain tolerance to ischemia. *Physiological Reviews*, 88(1), 211–247. <http://doi.org/10.1152/physrev.00039.2006>
- OPS. (2004). Accidentes cerebrovasculares en estadounidenses de origen mexicano. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 16(6), 420–421. <http://doi.org/10.1590/S1020-49892004001200009>
- Organización Mundial de la Salud. (2005). Evite los infartos de miocardio y los accidentes cerebrovasculares. *Organizacion Mundial de La Salud*, 48
- Prieto-arribas, R., Moreno-gutiérrez, A., & Simal-hernández, P. (2008). Modelos experimentales de isquemia cerebral, 47(8), 414–426.
- Puisieux, F., Deplanque, D., Bulckaen, H., Maboudou, P., Gelé, P., Lhermitte, M., Bordet, R. (2004). Brain ischemic preconditioning is abolished by antioxidant drugs but does not up-regulate superoxide dismutase and glutathion peroxidase. *Brain Research*, 1027(1-2), 30–

37. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.08.067>
- Rodriguez Motuberría, Liván; Galizú Sánchez, Reynaldo; Álvarez Gonzalez, E. (2002). Neuromodulación farmacológica en la enfermedad Cerebrovascular. *Cerebrovascular Diseases*, 41(2).
- Romanque, Pamela M, M. U., & Videla, L. A. (2005). Mecanismos moleculares hepática y en el preacondicionamiento isquémico, 469–476.
- Simon, R. P., Stevens, S. L., Sharp, F. R., Xu, H., Ran, R., Gidday, J. M., ... Rangel, Y. M. (2006). Colloquium C03: Ischemic tolerance in the brain: deciphering endogenous neuroprotective pathways induced by preconditioning, 96, 10–11.
- Stanford Medicine. (2016). *Behavioral and Functional neurosciences laboratory*. Obtenido de Neurological testing: <http://med.stanford.edu/sbfnl/services/bm/sm/neurological.html>
- Torres, L. F. (2015). *Caracterización de la expresión de un marcador de astrogliosis reactiva en un modelo animal de isquemia cerebral en ratas en tratamiento con glucosamina. Universidad Icesi. Icesi.*
- Velandia, M. L., Garavro, Z. V, Caldas, M. L., & Hurtado, H. (2001). ATPasa de calcio en el sistema nervioso. *Biomédica*, (21), 62–69.
- Waikar, S. S., & Bonventre, J. V. (2015). *Enfermedades Cerebrovasculares. Harrison's Principles of Internal Medicine* (18th ed.). McGraw Hill. <http://doi.org/10.1073/pnas.0703993104>
- Wang, M., Qi, D., Zhou, C., Han, D., Li, P., Zhang, F., ... Zhang, G. (2016). Ischemic preconditioning protects the brain against injury via inhibiting CaMKII – nNOS signaling pathway. *Brain Research*, 1634, 140–149. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.01.008>
- Zachara, N. E., Donnell, N. O., Cheung, W. D., Mercer, J. J., Marth, J. D., & Hart, G. W. (2004). Dynamic O- GlcNAc Modification of Nucleocytoplasmic Proteins in, 279(29), 30133–30142. <http://doi.org/10.1074/jbc.M403773200>
- Zachara, N. E., & Hart, G. W. (2004). O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1673(1-2), 13–28. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.03.016>
- Zarco, L. A., González, F., & Coral, J. (2008). Tratamiento actual del ataque cerebrovascular isquémico (ACV) agudo. *Univ. Méd. Bogotá*, 49(4), 467–498.

14. ANEXOS

Anexo 1. Carta del CIECUAE de la Universidad Icesi para la aprobación del proyecto de investigación en preconditionamiento isquémico cerebral.



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 reperfusión cerebral" -Versión 2.

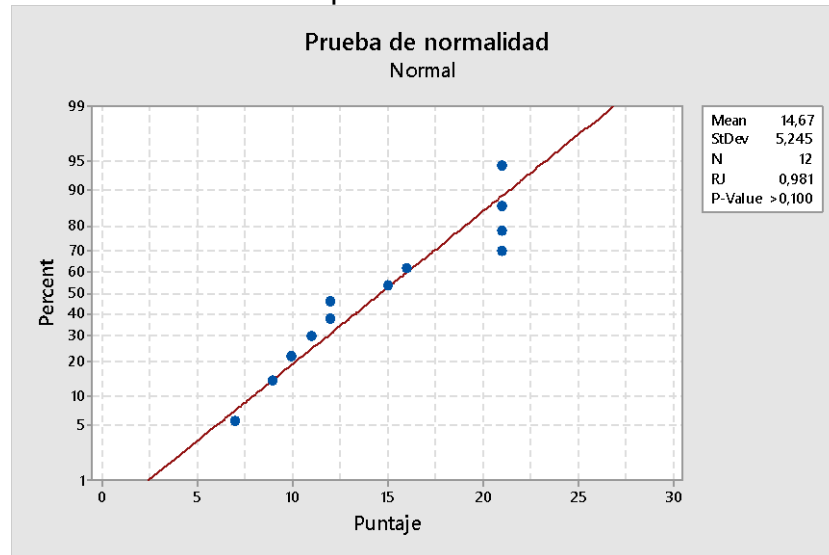
La presente se firma, el día (25), mes (Febrero), del año (2013)

Cordialmente,

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

Anexo 2. Tests neurológicos

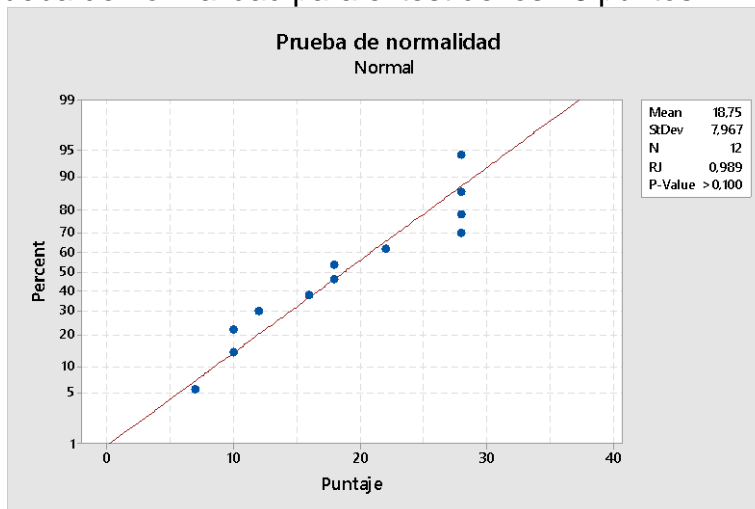
Anexo 2.1. Prueba de normalidad para el test de García



Anexo 2.2. Prueba t de student en test de García

Table Analyzed	Test de García Después
Column A	ISQ
vs	vs
Column B	PISQ
Unpaired t test	
P value	0,1682
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=1.567 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	10.00 ± 1.080 N=4
Mean ± SEM of column B	13.00 ± 1.581 N=4
Difference between means	-3.000 ± 1.915
95% confidence interval	-7.686 to 1.686
R squared	0,2903
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	2.143, 3, 3
P value	0,5474
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Anexo 2.3. Prueba de normalidad para el test de los 28 puntos

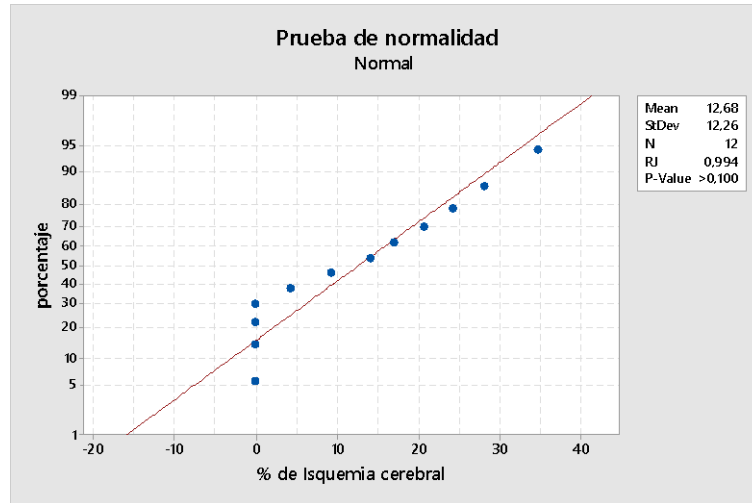


Anexo 2.4. Prueba t de student en test de los 28 puntos

Table Analyzed	Test 28P
Column A	ISQ
vs	vs
Column B	PISQ
Unpaired t test	
P value	0,1173
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=1.828 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	11.25 ± 1.887 N=4
Mean ± SEM of column B	17.00 ± 2.517 N=4
Difference between means	-5.750 ± 3.146
95% confidence interval	-13.45 to 1.948
R squared	0,3577
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	1.778, 3, 3
P value	0,6482
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Anexo 3. Volumetría por TTC

Anexo 3.1. Prueba de normalidad



Anexo 3.2. Prueba t de student

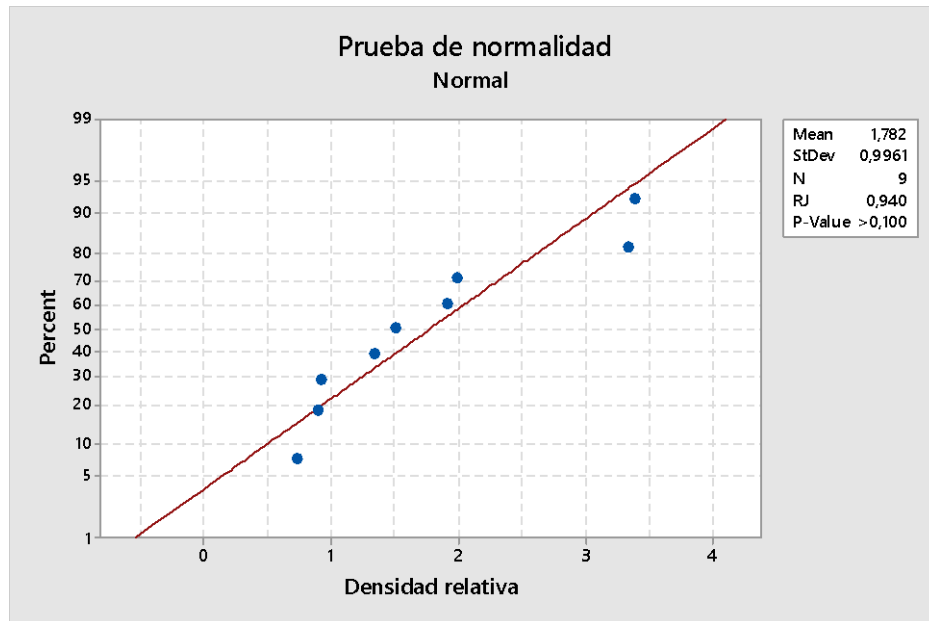
Table Analyzed	TTC
Column A	ISQ
vs	vs
Column B	PISQ
Unpaired t test	
P value	0,0088
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.821 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	26.83 ± 2.999 N=4
Mean ± SEM of column B	11.19 ± 2.787 N=4
Difference between means	15.64 ± 4.094
95% confidence interval	5.624 to 25.66
R squared	0,7087
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	1.157, 3, 3
P value	0,9072
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Anexo 4. Western Blot

Anexo 4.1. Experimento SHAM-ISQ-PISQ

Anexo 4.1.1. Banda superior

Anexo 4.1.1.1. Prueba de normalidad

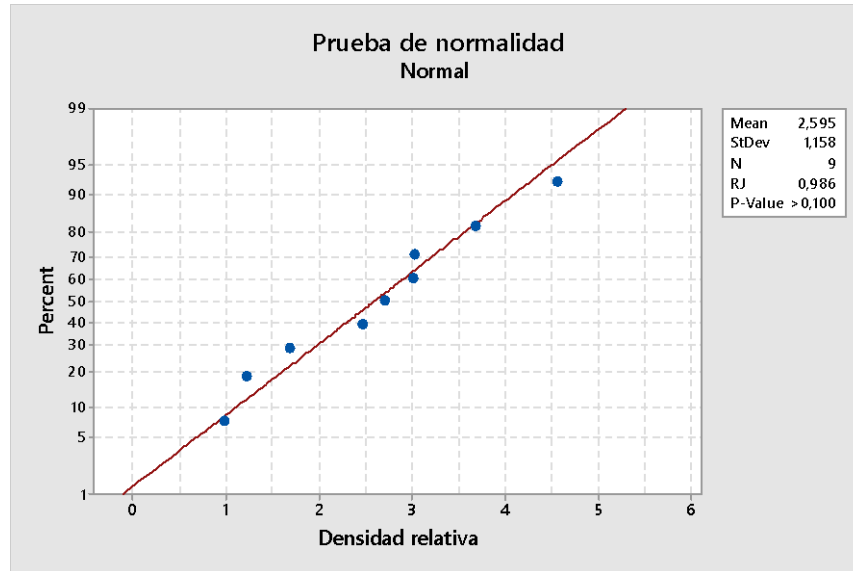


Anexo 4.1.1.4. Prueba t de student

Table Analyzed	SUP TUB RL2
Column B	ISQ
vs	vs
Column C	PISQ
Unpaired t test	
P value	0,0465
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.848 df=4
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column B	1.001 ± 0.1815 N=3
Mean ± SEM of column C	2.412 ± 0.4606 N=3
Difference between means	-1.410 ± 0.4951
95% confidence interval	-2.785 to -0.03589
R squared	0,6698
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	6.438, 2, 2
P value	0,2689
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Anexo 4.1.2. Banda media

Anexo 4.1.2.1. Prueba de normalidad

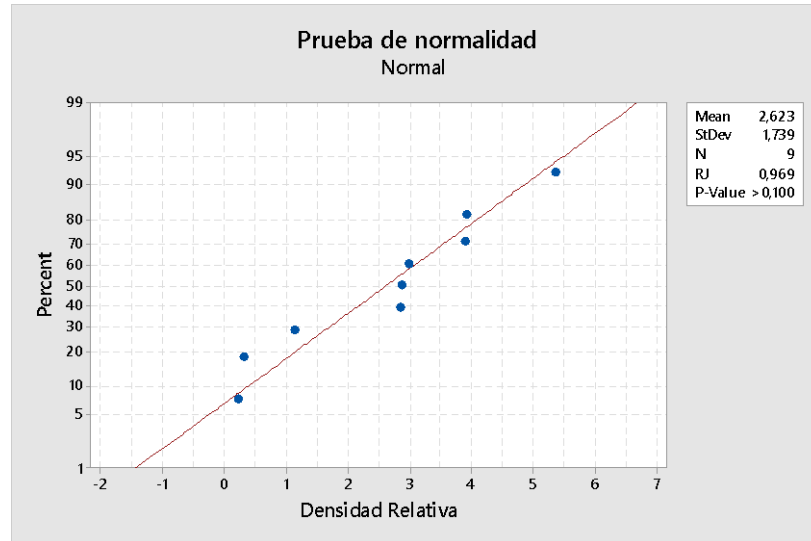


Anexo 4.1.2.4. Prueba t de student

Table Analyzed	MED TUB RL2
Column B	ISQ
vs	vs
Column C	PISQ
Unpaired t test	
P value	0,8304
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.2286 df=4
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column B	2.649 ± 0.7350 N=3
Mean ± SEM of column C	2.907 ± 0.8544 N=3
Difference between means	-0.2576 ± 1.127
95% confidence interval	-3.386 to 2.871
R squared	0,01290
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	1.351, 2, 2
P value	0,8506
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Anexo 4.1.3. Banda inferior

Anexo 4.1.3.1. Prueba de normalidad

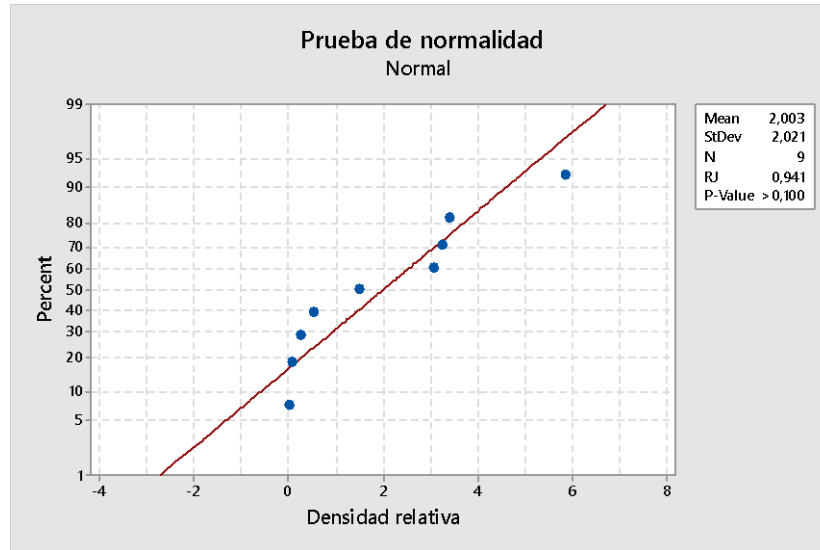


Anexo 4.1.3.4. Prueba t de student

Table Analyzed	INF TUB RL2
Column B	ISQ
vs	vs
Column C	PISQ
Unpaired t test	
P value	0,6624
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.4706 df=4
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column B	2.342 ± 1.094 N=3
Mean ± SEM of column C	3.114 ± 1.224 N=3
Difference between means	-0.7726 ± 1.642
95% confidence interval	-5.330 to 3.785
R squared	0,05246
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	1.251, 2, 2
P value	0,8884
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Anexo 4.1.3. Banda inferior-inferior

Anexo 4.1.3.1. Prueba de normalidad

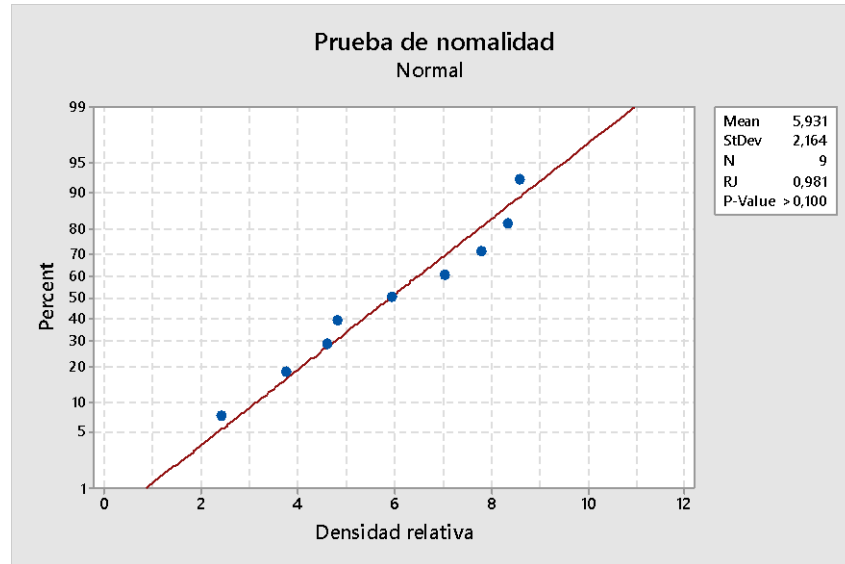


Anexo 4.1.3.4. Prueba t de student

Parameter	
Table Analyzed	INF -INF TUB RL2
Column B	ISQ
vs	vs
Column C	PISQ
Unpaired t test	
P value	0,4458
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.8448 df=4
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column B	2.290 ± 0.8823 N=3
Mean ± SEM of column C	3.592 ± 1.264 N=3
Difference between means	-1.302 ± 1.541
95% confidence interval	-5.580 to 2.976
R squared	0,1514
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	2.051, 2, 2
P value	0,6556
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Anexo 4.1.3. Carril completo

Anexo 4.1.3.1. Prueba de normalidad



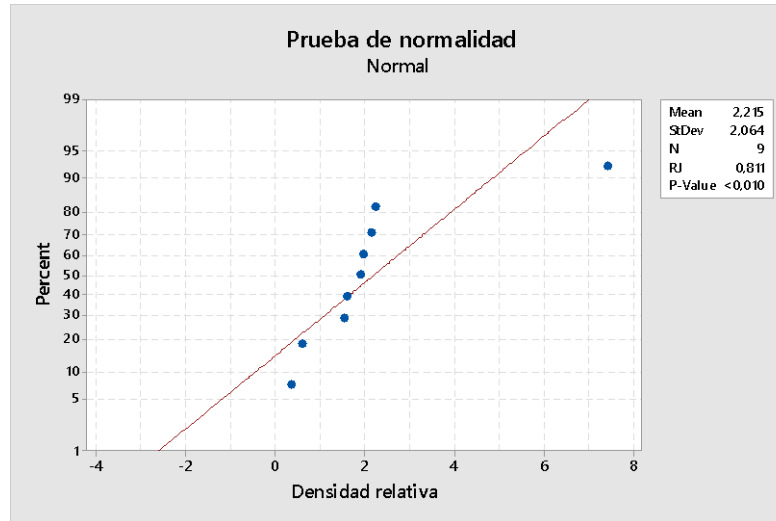
Anexo 4.1.3.4. Prueba t de student

Table Analyzed	COMP TUB RL2
Column B	ISQ
vs	vs
Column C	PISQ
Unpaired t test	
P value	0,8979
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.1367 df=4
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column B	6.637 ± 1.447 N=3
Mean ± SEM of column C	6.383 ± 1.166 N=3
Difference between means	0.2540 ± 1.858
95% confidence interval	-4.904 to 5.412
R squared	0,004649
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	1.540, 2, 2
P value	0,7875
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Anexo 4.2. Experimento SHAM – PSHAM 1h – PSHAM 6h

Anexo 4.2.3. Banda superior

Anexo 4.2.3.1. Prueba de normalidad

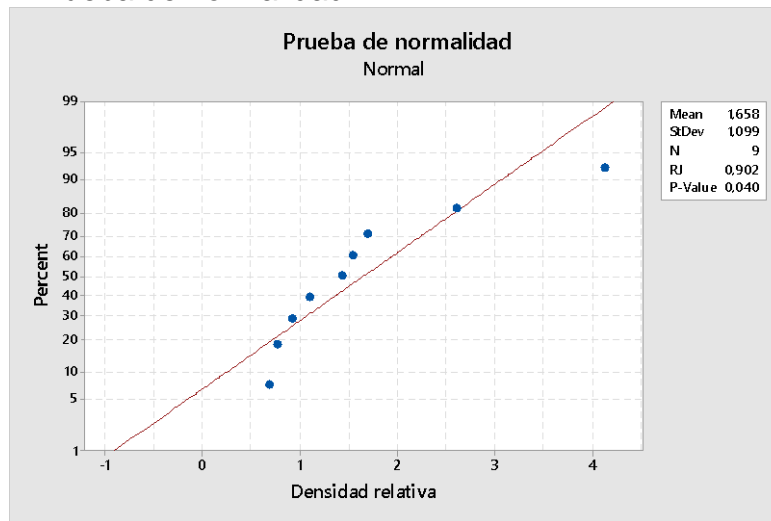


Anexo 4.2.3.4. Prueba Mann Whitney

Parameter	
Table Analyzed	SHAM ACT RL2 SUP
Column B	PSHAM1H
vs	vs
Column C	PSHAM6H
Mann Whitney test	
P value	0,7000
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Are medians signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column B,C	9 , 12
Mann-Whitney U	3,000

Anexo 4.2.3. Banda media

Anexo 4.2.3.1. Prueba de normalidad

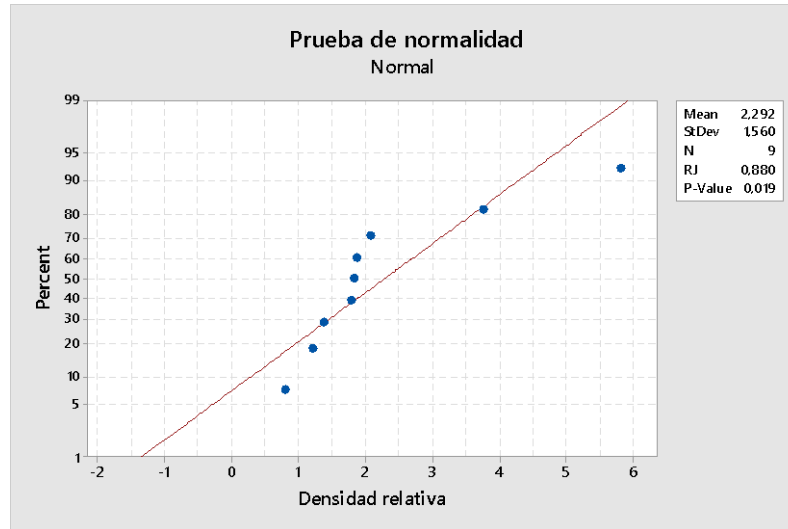


Anexo 4.2.3.4. Prueba Mann Whitney

Parameter	
Table Analyzed	SHAM ACT RL2 MED
Column B	PSHAM1H
vs	vs
Column C	PSHAM6H
Mann Whitney test	
P value	1,0000
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Are medians signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column B,C	11 , 10
Mann-Whitney U	4,000

Anexo 4.2.3. Carril completo

Anexo 4.2.3.1. Prueba de normalidad



Anexo 4.2.3.4. Prueba Mann Whitney

Parameter	
Table Analyzed	SHAM ACT RL2 COMP
Column B	PSHAM1H
vs	vs
Column C	PSHAM6H
Mann Whitney test	
P value	1,0000
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Are medians signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column B,C	10 , 11
Mann-Whitney U	4,000