# CARACTERIZACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA GSK-3β EN UN MODELO ANIMAL DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL EN TRATAMIENTO CON GLUCOSAMINA.

**ELISA VIVEROS ARAQUE**

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

# CARACTERIZACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA GSK-3β EN UN MODELO ANIMAL DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL EN TRATAMIENTO CON GLUCOSAMINA.

**ELISA VIVEROS ARAQUE**

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

**Tutora:**
**Profesora Juliana Rengifo Gómez**
**Doctora en Fisiología Celular y Molecular**

**Cotutor:**
**Profesor Alejandro Vera Gonzales**
**MD, MSc, candidato a doctor**

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

_____

**FIRMA DEL TUTOR**

_____

**FIRMA DEL  COTUTOR**

_____

**FIRMA DEL JURADO**

_____

**FIRMA DEL JURADO**

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN……1
1 INTRODUCCIÓN....3
2 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO....4
2.1 Planteamiento del problema....4
2.2 Marco Teórico....5
2.3 Objetivos e indicadores....16
2.4 Metodología y Matriz del Marco Lógico....17
2.4.1 Aplicación de la glucosamina....17
2.4.2 Acompañamiento en la realización de las microcirugías.....17
2.4.3 Extracción y conservación de los cerebros de rata....18
2.4.4 Realización curva de estandarización....19
2.4.5 Realización de los Western Blots....22
2.4.6 Análisis de los datos....25
2.5 Resultados....26
2.6 Discusión....34
2.7 Conclusiones....39
2.8 Recomendaciones....39
3 REFERENCIAS....40
4 ANEXOS……....46
4.1 Anexo 1. Cálculos efectuados....46
4.2 Anexo 2. ANOVA para expresión de GSK-3β total....47
4.3 Anexo 3. ANOVA para expresión de p-GSK-3β serina 9....50
4.4 Anexo 4. ANOVA para expresión de p-GSK-3β tirosina 216....53
4.5 Anexo 5. Presencia de O-glicosilación en proteínas totales....57
4.6 Anexo 6. Evaluaciones comportamentales a las ratas en el Laboratorio de Fisiología Celular Animal.....58

## Lista de Figuras:

Figura 1. Comportamiento de la expresión de GSK-3β total en corteza de cerebros de ratas sometidas a isquemia, tratadas y no tratadas con glucosamina, evaluadas a diferentes tiempos.....28
Figura 2. Caracterización de p-GSK-3β serina 9 en corteza de cerebros de ratas sometidas a isquemia, tratadas y no tratadas con glucosamina , evaluadas a diferentes tiempos.....31
Figura 3. Caracterización de p-GSK-3β tirosina 216 en la corteza cerebral de ratas sometidas a isquemia, tratadas y no tratadas con glucosamina, evaluadas a diferentes tiempos.....33
Figura 4. Caracterización de la O- glicosilación en las proteínas totales en condición isquémicas tratada o no con glucosamina a diferentes tiempos.....57

## Lista de Tablas:

Tabla 1: Organización grupos experimentales.....18
Tabla 2: Diluciones para construcción de curva estándar con BSA.....19
Tabla 3: concentraciones calculadas por el lector de placas.....20
Tabla 4: absorbancias calculadas por el lector de placas.....20
Tabla 5: Concentraciones calculadas a partir de la curva estándar de proteínas..21
Tabla 6: Cantidad de muestra, buffer y agua para servir 20 µL en el pozo.....21
Tabla 7: composición de un gel al 6% .....22
Tabla 8: Esquema de la siembra de las muestras en los pozos del gel de electroforesis.....23
Tabla 9: Anticuerpos usados en las membranas transferidas .....24
Tabla 10: cálculos para hallar el volumen de muestra a servir en cada pozo con 30ug de proteína.....46
Tabla 11: Pruebas t- student (p<0,05) para gráfica 1C. .....49
Tabla 12: Pruebas t- student (p<0,05) para gráfica 1D.....50
Tabla 13: Pruebas t- student (p<0,05) para gráfica 2C. .....52
Tabla 14: Pruebas t- student (p<0,05) para gráfica 2D.....53
Tabla 15: Pruebas t- student (p<0,05) para gráfica 3C. .....55
Tabla 16: Pruebas t- student (p<0,05) para gráficas 3D y 3E.....56

## Lista de Gráficas

Gráfica 1: Curva estándar de proteínas realizada por ensayo Bio-Rad con BSA a 595 nm.....20
Gráfica 2: Interacciones entre tratamientos y tiempos en GSK-3β total.....47

Gráfica 3: Comprobación del comportamiento normal de los residuos en GSK-3β total .....48
Gráfica 4: Comprobación del comportamiento normal de las varianzas en GSK-3β total .....48
Gráfica 5: Interacciones entre tratamientos y tiempos en p-GSK-3β serina 9 .....50
Gráfica 6: Comprobación del comportamiento normal de los residuos en p-GSK-3β serina 9 .....51
Gráfica 7: Comprobación del comportamiento normal de las varianzas en p-GSK-3β serina 9 .....51
Gráfica 8: Interacciones entre tratamientos y tiempos en p-GSK-3β tirosina 216..53
Gráfica 9: Comprobación del comportamiento normal de los residuos en p-GSK-3β en tirosina 216 .....53
Gráfica 10: Comprobación del comportamiento normal de las varianzas en p-GSK-3β en tirosina 216 .....54

**Lista de ilustraciones:**

Ilustración 1: Estructura de la Glucógeno Sintasa Quinasa 3β (Dajani et al., 2001). .....10
Ilustración 2: Prueba t - student de dos colas .....47
Ilustración 3: Formato en Excel para registro de resultados del test del cilindro. ..59
Ilustración 4: Formato en Excel para registro de resultados del test del cilindro. ..60

## RESUMEN

El aumento de la unión de O-N-acetilglucosamina (O-GlcNAc) a las proteínas, ayuda a las células a adaptarse al estrés y mejora su supervivencia. Se ha confirmado que, al tratar un evento isquémico con glucosamina aumentan los niveles de O-GlcNAción en las proteínas citoplasmáticas y nucleares de las células. En el cerebro se realizan varios procesos de O-GlcNAción, y se ha demostrado que la glucosamina retrasa o disminuye el daño en los tejidos de cerebros de animales sometidos a isquemia, lo cual sugiere que es una estrategia de neuroprotección, pero la forma en la que actúa la glucosamina para causar dicha neuroprotección aún no se conoce en su totalidad. Con el objetivo de esclarecer los mecanismos celulares por los cuales el tratamiento con glucosamina es capaz de disminuir el tamaño del infarto cerebral, se propuso caracterizar los niveles de expresión de la proteína GSK-3β total y dos de sus formas fosforiladas, las cuales están implicadas en los procesos de apoptosis celular. Se usó la técnica de Western Blot, en muestras de corteza cerebral de ratas sometidas a isquemia cerebral y tratadas con glucosamina a diferentes tiempos de transcurrida la isquemia. Se encontró que la glucosamina no poseía ningún efecto sobre la expresión de GSK-3β en el tiempo pero sí sobre sus modificaciones post-traduccionales, aumentando su forma inhibida (p-GSK-3β serina 9) a las seis horas y disminuyendo la forma que le confiere mayor actividad (p-GSK-3β tirosina 216) a los 15 minutos. Con estos resultados se sugiere la implicación de GSK-3β en los mecanismos de neuroprotección de la glucosamina en isquemia cerebral, enfermedad que es la segunda causa de muerte en el mundo.



**Palabras claves:** Proteína GSK-3β, Isquemia cerebral, glucosamina, neuroprotección, O-GlcNAción.



## ABSTRACT

The increased binding of N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) to proteins, helps cells to adapt to stress and improves its survival. It has been confirmed that treating an ischemic event with glucosamine increases the levels of O-GlcNAcylation in the cytoplasmic and nuclear proteins from cells. In the brain several O-GlcNAcylation processes are performed, and it has been shown that glucosamine delays or reduces tissue damage in the brains of animals subjected to ischemia, which suggests it is a strategy for neuroprotection, but the way in which glucosamine acts to cause such neuroprotection is not yet fully known. With the goal to elucidate the cellular mechanisms by which treatment with glucosamine is able to decrease the volume of cerebral infarction, we characterized the expression levels of GSK-3β total protein and two of its phosphorylated forms, which are involved in apoptosis processes. The technique used was Western blotting from samples of cerebral

cortex of rats subjected to brain ischemia and treated with glucosamine, at different elapsed times from ischemia. It was found that glucosamine had no effect on the expression of total GSK-3β, but it had effects on the post-translational modifications, increasing the inhibited form (p-GSK-3β serine 9) at six hours, and decreasing the form that confers greater activity (p-GSK-3β tyrosine 216) within 15 minutes. With these results, we suggested that GSK-3β is involved in the mechanisms of neuroprotection of glucosamine in cerebral ischemia, disease that is the third leading cause of death worldwide.

**Keywords:** Protein GSK-3β, cerebral ischemia (stroke), glucosamine, neuroprotection, O-GlcNAción.

# 1 INTRODUCCIÓN

En la isquemia cerebral, cuando la circulación sanguínea cerebral se ve interrumpida, existe una depleción de oxígeno, glucosa, neurotransmisores, ATP y otros factores que llevan a las células cerebrales a su muerte ya sea por necrosis o apoptosis, dependiendo de la zona del tejido cerebral en la que se encuentren. Las células que pertenecen a la zona de penumbra isquémica son las células que, por perfusión residual, mantienen sus niveles basales de ATP y oxígeno, y continúan siendo metabólicamente estables durante algún tiempo, estas células mueren por apoptosis y son potencialmente salvables (Moskowitz et al., 2010); a estas células van dirigidos principalmente los esfuerzos terapéuticos para lograr atenuar la mortalidad y el daño físico y cognitivo que deja esta enfermedad, que es la segunda causa de muerte en el mundo y la primera en causar incapacidad (Lloyd-Jones et al., 2010) .

En los procesos apoptóticos neuronales están implicadas una serie de vías de señalización celular que confluyen en la activación de la proteína GSK-3β, por lo que su inhibición se ha considerado como una forma de neuroprotección por diferentes mecanismos (Sasaki et al, 2001). Por otro lado, se ha descrito que en los procesos de estrés agudo la célula utiliza como mecanismo de supervivencia la glicosilación del tipo O-GlcNAc de sus proteínas nucleocitoplasmáticas (Zachara et al., 2004); esta modificación se relaciona entre otras acciones con la inhibición de la proteína GSK-3β, al aumentar su fosforilación en la serina 9 (Kazemi et al., 2010).

Se ha comprobado en modelos animales que el tratamiento con glucosamina disminuye el tamaño del infarto cerebral (Hwang et al., 2010). Con la finalidad de contribuir al esclarecimiento de los procesos por los cuales la glucosamina tiene este efecto citoprotector, se llevó a cabo este proyecto en el cual mediante Western Blot se caracterizó la expresión de la proteína GSK-3β total y de dos de sus modificaciones pos-traduccionales en un modelo de isquemia cerebral en rata wistar. La hipótesis planteada fue que se encontrarían cambios significativos en la expresión de esta proteína o de sus formas fosforiladas al comparar los grupos de animales con isquemia tratados y no tratados con glucosamina. Se encontró finalmente que es muy probable que esta proteína esté implicada en los mecanismos neuroprotectores relacionados con el tratamiento con glucosamina ya que se registró que, en el tratamiento de la isquemia con glucosamina, la forma inactiva de GSK-3β (p- GSK-3β serina 9) tiende a aumentar y que una de las formas en la que GSK-3β mejora su actividad (p- GSK-3β tirosina 216) disminuye.

# 2 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

## 2.1 Planteamiento del problema

El infarto cerebral es la segunda causa de muerte en el mundo (Lloyd-Jones et al., 2010) (WHO, 2012). La incapacidad parcial o total, generada por los daños que deja una lesión vascular, genera graves consecuencias en la calidad de vida de las personas quienes al sobrevivir quedan con un compromiso de su capacidad física de aproximadamente el 70% y los gastos en los servicios de salud que genera esta enfermedad se estiman en 1.52 billones de dólares para el 2050 (Moskowitz et al., 2010).

El tratamiento con glucosamina, que tiene baja toxicidad y puede ser administrado por vía oral, logra realizar un efecto neuroprotector en modelos animales. Se ha demostrado que al administrar glucosamina antes o después de ocurrir una isquemia cerebral el volumen del infarto se reduce, pero aún no se conoce con exactitud los mecanismos celulares y moleculares por los cuales se produce esta protección, aunque algunos la relacionan con la inhibición del factor nuclear kappa β (NF-κβ) y la regulación de los procesos inflamatorios (Hwang et al., 2010).

Por otro lado, la participación de la proteína GSK-3β en la neuroprotección se ha confirmado en una amplia variedad de estudios, y varios hallazgos soportan la idea de que la inactivación de la GSK-3β (mediante su fosforilación en serina 9) es un mecanismo común de protección en las neuronas, contra la necrosis y apoptosis, procesos que se dan en isquemia cerebral. (Giménez, Lim, & Díaz, 2012) (Omar, Wang, & Clanachan, 2010) (Tong et al., 2002) (Gidday et al, 2006) (Bhuiyan et al., 2011).

En este proyecto se intentó dilucidar si la proteína GSK-3β está implicada en las vías de señalización por las cuales el aumento de los niveles de O-glicosilación con glucosamina disminuye el tamaño del infarto cerebral, y se planteó la hipótesis de que existe una disminución en la expresión de la proteína GSK-3β, un aumento en la modificación pos- traduccional de la proteína GSK-3β en su forma fosforilada en serina 9 (o inactiva), o una disminución de su forma fosforilada en tirosina 216 (activa), en el modelo de isquemia cerebral focal en la especie *Rattus norvegicus* cepa wistar.

Al resolver esta pregunta se pretende apoyar algunos estudios, brindando información acerca de las proteínas implicadas en los procesos de neuroprotección que otorga la glucosamina. Esta información podría contribuir a la consolidación de la línea de investigación para la utilización posterior de este tratamiento como un posible fármaco, desarrollado para prevenir o atenuar los efectos del infarto cerebral.

## 2.2 Marco Teórico

### Enfermedad cerebrovascular y esfuerzos clínicos para amortiguar sus efectos

La enfermedad cerebrovascular (ECV) es la primera causa de incapacidad física en el mundo y la segunda causa de muerte (WHO, 2012) (Smith et al, 2005). Se reporta que aproximadamente el 80% de los accidentes cerebrovasculares son ocasionados por una obstrucción de los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro, también llamada isquemia; el 20% restante se le atribuye a hemorragias que pueden ser intracerebrales o subaracnoideas. (Smith et al., 2005) (Lloyd-Jones et al., 2010).

Las sustancias con potencial neuroprotector que se han probado en ensayos preclínicos, han demostrado, en su mayoría, una disminución del daño isquémico en el modelo experimental, en cuanto a que es menor el tamaño del infarto en cerebro, pero a nivel clínico no muestran mejoría neurológica en los pacientes (O´Collins et al, 2006). Es por esto que aún no se tiene una terapéutica farmacológica definida para la isquemia cerebral. (Ginsberg et al., 2009). El activador de plasminógeno tisular (tPA) es el único medicamento aprobado por la FDA para la destrucción del coágulo y restablecimiento del flujo sanguíneo en infarto cerebral, pero es utilizado en menos del 10% de los casos de infarto cerebral por el riesgo a sufrir hemorragia en el tejido isquémico y se debe dar en menos de 3 horas de ocurrido el infarto, además tiene efectos secundarios como excitotoxicidad y daño en la barrera hematoencefálica. (Moskowitz et al., 2010).

En los experimentos en los que se ponen a prueba las células sometiéndolas a estrés, se ha encontrado que se aumenta la modificación O-unión-N-acetilglucosamina (O-GlcNAc) (Zachara et al., 2004), permitiéndoles sobrevivir, por lo que se pensó que aumentando esta modificación agregando un sustrato como la glucosamina ayudaría a disminuir los daños celulares provocados en un infarto cerebral. Esto se comprobó con un modelo de isquemia cerebral en cerebros de rata en los cuales el tratamiento con glucosamina redujo los volúmenes de infarto en un 14,3%, planteando como mecanismo de acción la supresión de factores pro inflamatorios (Hwang et al., 2010).

Pero aún falta dilucidar completamente los mecanismos celulares por los que ocurre la isquemia cerebral y las proteínas que se modifican en estas cascadas al aplicar un tratamiento con glucosamina. Esto sería muy útil a la hora de plantear una estrategia para la prevención y mitigación de los efectos del infarto cerebral. Tal vez la solución para los problemas derivados de la ECV se encuentra muy cerca, justo dentro de las células (Gidday et al, 2006).

## Isquemia cerebral

El infarto cerebral o isquemia cerebral sucede cuando la circulación sanguínea que irriga a este tejido es suprimida, suprimiendo a su vez el oxígeno, la glucosa, los neurotransmisores, los factores de vasodilatación, antiplaquetarios, entre otras moléculas que se encuentran en la sangre. Debido a que el cerebro tiene una gran demanda metabólica y una gran concentración de neurotransmisores, la disfunción neurológica ocurre en pocos segundos por la cesación de estímulos eléctricos después de completada la oclusión circulatoria, pero la lesión isquémica y la muerte celular pueden seguir después de minutos, horas y hasta días. Histológicamente la lesión isquémica puede asemejarse a un eclipse. Existe una zona en el centro, donde repercute directamente la oclusión y hay muerte celular necrótica y daño irreparable, esta zona es la que se deteriora segundos después de la oclusión porque no existe perfusión que entregue ATP, glucosa u oxígeno a las células. Sin embargo hay una zona alrededor de este núcleo, una zona donde existe lesión celular pero que es meta estable durante algunas horas ya que por acción de la perfusión residual de alguna manera alcanza a conseguir los niveles mínimos de ATP y oxígeno. A esta zona que trabaja en condiciones límites se le llama zona de transición o área de penumbra y es el área donde apuntan los esfuerzos terapéuticos pues puede ser salvable si se atenúa el proceso de apoptosis hasta que se restaure la perfusión o si la perfusión se restablece rápidamente. Como el núcleo isquémico se expande y las vías para apoptosis se desencadenan en el área de penumbra, estas células cerebrales con el tiempo tienden a morir. (Moskowitz et al., 2010) (Astrup et al., 1981).

## Apoptosis en el proceso isquémico

Al interrumpirse el riego sanguíneo en algún tejido u órgano, por una obstrucción en algún vaso circulatorio, las células de la penumbra empiezan a sufrir varios eventos intracelulares críticos que pueden conducir a la apoptosis.

En primer lugar la falta de oxígeno, que es transportado de los pulmones a los órganos a través de la sangre, produce la reducción de los fosfatos de alta energía (el más importante trifosfato de adenosina (ATP)) dentro de la célula, ya que este se produce, en su mayoría, por un proceso llamado fosforilación oxidativa, dependiente de oxígeno. El consumo de ATP por parte de la célula continúa, así la funcionalidad del órgano se vea comprometido por la hipoxia, este consumo se realiza principalmente por la ATPasa mitocondrial para el mantenimiento del potencial de la membrana mitocondrial. En este período se produce ATP por medio de la glucólisis anaerobia, a expensas de glucosa, pero la oferta de ATP supera la demanda celular. La glucólisis anaerobia produce acumulación de protones ($H^+$), por lo que hay un descenso en el pH; esto inhibe posteriormente la

gliceraldehido fosfato deshidrogenasa, enzima implicada en la producción de energía celular. (Robbins & Contran, 1999).

En segundo lugar, Se produce un aumento en la concentración de sodio ($Na^+$), debido a la falta de síntesis de ATP para que funcione la bomba sodio/potasio ($Na^{+/}K^-$ ATPasa). El sodio se acumula dentro de la célula y junto con el agua, arrastra el calcio ($Ca^{2+}$), produciéndose también la edematización de la célula, mientras que el potasio ($K^+$) sale de la célula al torrente sanguíneo con mayor libertad (Miura & Miki, 2009). El aumento de calcio intracelular también se debe a la acumulación de neurotransmisores, como el glutamato, en el espacio extracelular (fenómeno conocido como excitotoxicidad) que sobre estimulan los receptores NMDA (receptores de N-metil-D-aspartato) desencadenando la entrada del calcio, el sodio y la entrada de agua en la célula (Moskowitz et al., 2010).

El aumento en la concentración intracelular de calcio ha demostrado ser decisivo en el proceso de daño celular pues induce la producción de los siguientes fenómenos: más liberación de neurotransmisores como el glutamato; síntesis y liberación de radicales libres en el tejido cerebral isquémico quienes también son producidos por la sobre estimulación del glutamato sobre los receptores NMDA. Estos estimulan la NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato) oxidasa, produciendo peroxinitritos y aniones superóxidos (estrés oxidativo); y la activación de enzimas que intervienen en la degradación de proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos (Torregrosa et al., 2007) (Moskowitz et al., 2010). Sin embargo, lo más relevante en el proceso de inducción de muerte celular es que el aumento de calcio tanto en la célula, como en el interior del retículo endoplasmático y de la mitocondria, hace que esta última inicie la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP). El mPTP es un megacanal, con un poro no selectivo de difusión de moléculas, este poro en condiciones controladas se abre para modular las concentraciones citosólicas del calcio, pero si este poro se abre descontroladamente da lugar a la despolarización de la mitocondria, pérdida del gradiente de protones entre las membranas de la misma, y liberación de una concentración importante de calcio mitocondrial al citosol. Cuando lo anterior ocurre en una fracción considerable de la mitocondria, se produce la muerte de la célula, ya que la apertura del poro provoca la entrada de agua a la matriz mitocondrial por lo que ésta se edematiza y, por presión, se rompe la membrana externa, en consecuencia se libera el citocromo c que se encuentra en el espacio intermembranoso. “Una vez en el citosol, el citocromo c forma un complejo multiproteico llamado apoptosoma que incluye la procaspasa 9. Se piensa que esta procaspasa con sólo unirse al apoptosoma se activa y se convierte en caspasa 9, que desencadena todos los procesos de muerte celular programada”. (Karp, 2009).

La permeabilidad mitocondrial también se puede aumentar si se unen las proteínas pro-apoptóticas Bax, Bad, Bim, Bid a la membrana externa de la mitocondria, con lo que se puede liberar el citocromo c, o cuando se ven

comprometidos los canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC), la translocasa de nucleótidos de adenina (ANT) y la ciclofilina-D (Cyp-D), que también hacen parte del complejo multiproteico que forma el mPTP. (Miura & Miki, 2009) (Linseman et al., 2004).

Algunas proteínas que intentan contrarrestar el proceso de apoptosis como Bcl -xL, Bcl –w, Bcl -2, inhiben de manera directa o indirecta la liberación del citocromo c, sin embargo la mitocondria también es capaz de liberar por este poro proteínas asociadas a la activación de caspasas (Apaf-1) o con capacidad para translocarse directamente al núcleo sin implicación de las caspasas, como el factor inductor de apoptosis AIF (Igual, 2003).

**La O-GlcNAción**

La O-N-acetilglucosaminación (O-glicosilación también llamada O-GlcNAción) ocurre cuando una β-N- acetilglucosamina es transferida, por la enzima O-GlcNAc – transferasa (OGT), del UDP-N-acetilglucosamina a las cadenas laterales, en el grupo hidroxilo de los aminoácidos de serina o treonina presentes en una proteína (Wang, Pandey, & Har, 2007). Se ha descrito que esta modificación post-traduccional (O-GlcNAc) que es dinámica e inducible, está presente normalmente en la célula pero es una de las que se aumenta cuando la célula está respondiendo a situaciones de estrés. La reducción de este proceso en las células provoca una disminución en la supervivencia de las mismas. (Zachara et al., 2004). Sin embargo la O-GlcNAción también participa en los procesos de transcripción, regulación del ciclo celular, neurodegeneración, entre otros. La O-GlcNAción se ha equiparado con la fosforilación, se cree que ambos actúan como moduladores en las funciones proteicas. Para explicar esto se ha demostrado que en algunas proteínas la fosforilación y la O–GlcNAción son reciprocas, es decir que si ocurre una fosforilación en un residuo de la proteína no ocurre su O–GlcNAción en el mismo residuo y viceversa, de esta manera la fosforilación y la O–GlcNAción, en esos casos, se modulan entre ellas. Algunos ejemplos de proteínas que presentan regulación reciproca por fosforilación y O – GlcNAción son: la ARN polimerasa II en el dominio C-terminal, Thr-58 de c-Myc, Ser-16 del receptor de estrógeno, la sintasa de óxido nítrico endotelial, y el antígeno T del papovirus SV40 (Wang, Pandey, & Har, 2007).

Sin embargo, se ha encontrado que la competencia que se genera cuando la fosforilación y O–GlcNAción ocupan el mismo residuo en una proteína, es sólo una de las formas en las que se puede presentar interacción entre estas modificaciones post-traduccionales pues estas también pueden ser competitivas y ocupar sitios diferentes, o crear sinergia entre ambas en residuos diferentes o presentar ambas, una reciprocidad pero a la vez simultaneidad dependiendo del residuo en que se encuentre (Zeidan & Hart, 2010).

La enzima que se encarga de retirar la β-N- acetilglucosamina de las proteínas se llama O – GlcNAcasa (OGA).

**Proteína GSK-3**

La proteína GSK-3 (glucógeno sintasa quinasa 3) es una enzima con función de serina treonina proteína quinasa que es clave en la fosforilación de la glucógeno sintasa y por ende en el metabolismo del glucógeno. Debe su número a que fue la tercera enzima que se descubrió que participaba en la inhibición por fosforilación de la glucógeno sintasa en el musculo esquelético de conejos, después de la proteína quinasa A dependiente de AMP cíclico y la glucógeno sintasa quinasa 2 que no depende de AMP cíclico y que se activa por iones de calcio. (Embi, Rylatt, & Cohen, 1980). GSK-3 media la acción de la insulina sobre la glucógeno sintasa, el aumento de insulina lleva a la inactivación de la GSK-3 la cual se ve reflejada en un descenso de la inhibición de la glucógeno sintasa. En 1990 GSK-3 fue clonada y en su aislamiento encontraron dos isoenzimas de esta proteína, la GSK-3α (proveniente del cromosoma 19 en humanos, cuyo peso molecular es 51 KDa correspondiente a 483 aminoácidos), y la GSK-3β (proveniente del cromosoma 3 en humanos, cuyo peso molecular es 47 KDa correspondiente a 433 aminoácidos). Estas dos isoformas tienen una homología del 85% en sus secuencias, en sus dominios catalíticos estas proteínas son muy parecidas, la similaridad entre sus aminoácidos en este sitio es del 98%. La diferencia entre ellas se encuentra básicamente en su domino N- terminal y C-terminal en el que su parecido es de tan sólo el 36% (Kaidanovich & Woodgett, 2011).

La distribución de GSK-3α y GSK-3β es ubicua en todo el cuerpo pero sobre todo en cerebro. GSK-3α es abundante en hipocampo, núcleo estriado y cerebelo, por su parte GSK-3β se encuentra en todo el cerebro, incluyendo la corteza y en el cerebro adulto parecen no cambiar sus niveles, como si se nota un pico en el periodo embrionario. Ambas se expresan tanto en neuronas como en astrocitos. (Perez-Costas et al., 2010) Existe una variante o “Splicing form” de la GSK-3β denominada GSK-3β2 o forma larga de la GSK-3β, esta difiere de la primera en que contiene 13 aminoácidos más en su sitio catalítico. Al igual que GSK-3β es más abundante en cerebro que en otros tejidos como corazón, riñón, hígado o testículo, pero su expresión no es más alta en el periodo embrionario. (Mukai et al., 2002).

Estas proteínas además de participar en el metabolismo del glucógeno, participan en las respuestas de señalización celular acopladas a receptores Wnt (receptores de la familia Frizzled), receptores tirosina- quinasa y receptores acopladas a proteínas G (Woodgett, 2003).

## Isoforma GSK-3β

La proteína GSK-3β es un monómero. Dentro de su estructura secundaria se puede observar un domino N- terminal compuesto por hojas plegadas beta formando un barril ortogonal y un dominio carboxi- terminal compuesto por hélices alfa (ver ilustración 1). Los aminoácidos con los que la proteína tiene contacto con los sustratos a fosforilar son la arginina 96, 180 y la lisina 205, en este sitio la proteina tiene una densidad de carga positiva. Se ha descrito que GSK-3β tiene más afinidad con los sustratosque ya han sido fosforilados primero, especialmente en la posicion n+4, siendo n el aminoacido a fosforilar por GSK-3β. Lo anterior se puede explicar porque dentro de su estructura la valina 214 podria estabilizar a los sustratos prefosforilados y fácilitar su segunda fosforilación, además esta pre-fosforilación acomoda al sustrato en la ranura catalitica y orienta mejor los dominios quinasa de la proteina, aumentando su eficiencia de 100 a 1000 veces (Doble & Woodgett, 2003). Sin embargo que sus sustratos estén fosforilados, no es una condición necesaria para que GSK3-β ejerza su función (Dajani et al., 2001). Se ha descrito que la GSK-3β tiene aproximadamente 40 sustratos o más y dentro de estos se encuentran no sólo proteínas del metabolismo celular, sino proteínas relacionadas con la estructura celular, apoptosis y factores de transcripción, entre otras. Esta proteína se encuentra tanto en el citosol, como en el núcleo y en la mitocondria (Jope & Johnson, 2004).

**Ilustración 1: Estructura de la Glucógeno Sintasa Quinasa 3β (Dajani et al., 2001).**

## Inhibición de GSK-3β por fosforilación en serina 9

Una forma de regulación de la proteína GSK-3β, es su inhibición por fosforilación en la serina 9, ubicada en la región N- terminal. Esto se puede explicar porque si se fosforila la serina 9 esta actúa como un pseudo-sustrato que, al hacer contacto con el bolsillo catalítico con carga positiva, se une a él intermolecularmente y lo

ocupa, no permitiendo que ingresen al sitio catalítico los sustratos tanto cebados con pre-fosforilación, como los no cebados. La inhibición por fosforilación en serina 9 es pues una inhibición competitiva. (Doble & Woodgett, 2003).

Existen numerosas cascadas celulares que inhiben a GSK-3β convirtiéndola en p-GSK-3 ser9. La más relevante es la vía PI3K/PKB (fosfatidil inositol 3 quinasa/proteína quinasa B, también llamada Akt) que se activa por varios estímulos como la insulina, la producción de glutamato, el descenso del ATP, factores de crecimiento y factores neurotróficos (Ortega, 2010). Una vez activada esta vía por los receptores tipo tirosina quinasa, corriente abajo se activa la sub unidad p58 de la PI3K por medio de fosforilación, una vez activada PI3K, esta fosforila al fosfatidil inositol 3,4 difosfato (PIP2), convirtiéndolo en fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3), que es un segundo mensajero muy importante en la célula y uno de sus sustratos a activar es la Akt, al activarse Akt por la fosforilación de sus residuos de treonina-308 y la serina-473, es capaz de fosforilar a GSK3-β en su serina-9, inactivándola (Pinzón et al., 2009) (Delcommenne & Tan, 1998) (Cohen and Frame, 2001).

A parte de esta vía, hay muchas otras que inhiben a GSK-3β, algunas de ellas son las vías que implican las MAPKAP-K1 (proteína activadora de mitógenos- proteín quinasa activada 1), la PKA (proteína quinasa A) y la PKC (proteína quinasa C). (Doble & Woodgett, 2003).

**Mejoramiento de la actividad de la proteína GSK-3β por fosforilación en tirosina 216**

Se ha demostrado que GSK3-β puede fosforilarse en su residuo de tirosina 216, lo que es otra forma de regulación de su función que lleva al aumento de su actividad quinasa, pero esta fosforilación no es un requisito necesario para que GSK-3β ejerza su actividad catalítica. Se ha demostrado que las células de mamífero en reposo tienen fosforilado este residuo normalmente, por lo que los factores que estimulen esta desfosforilación tienden a disminuir la eficiencia de GSK-3β y por consiguiente se ve reflejado en una desfosforilación de sus sustratos (Hughes et al., 1993).

Se han planteado diferentes hipótesis sobre la forma en la que se fosforila este residuo de tirosina, algunas de ellas son por parte de una segunda proteína tirosin quinasa como zak 1, Fyn o PYK2 (Kim et al., 1999) (Hartigan et al., 2001) (Lesort et al., 1999). Sin embargo una de las hipótesis más fuertes es la de la autofosforilación de este residuo (Cole & Frame, 2004).

El mecanismo por el cual se cree que la proteína p-GSK-3β tyr216 sea alrededor de 200 veces más eficiente en su actividad, es basado en lo encontrado en otra serin treonin quinasa, la ERK2 (quinasa reguladora de señales extracelulares, también llamada MAPK). Se plantea que la GSK-3β desfosforilada en tirosina 216 posee una conformación *gauche,* es decir una conformación alternada, en la que

la cadena que contiene este aminoácido está orientada hacia abajo creando un impedimento estérico que dificulta el acceso a la hendidura catalítica para los sustratos. Por otro lado si la tirosina 216 es fosforilada, la dirección de la cadena en la que se encuentra se orientará hacia arriba, en donde se encontrara externa al sitio catalítico, facilitando la unión del sustrato, además la tirosina 216 fosforilada posee una interacción con la arginina 220 y aspartato 182 dentro de la GSK-3β que la estabilizan (Dajani et al., 2001).

**GSK-3β en la apoptosis**

Se ha reportado la implicación de la proteína GSK-3β en los procesos apoptóticos y neurodegenerativos, incluyendo los debidos a la isquemia cerebral (Sasaki et al., 2001) (Giese, 2009). En la vía intrínseca de la apoptosis, la GSK-3β está asociada a diferentes daños celulares que, sumándolos, hacen de ella una proteína clave en este proceso.

Para empezar algunos procesos que llevan a apoptosis tienen implicados la activación de GSK-3β. Cuando hay carencia de factores de crecimiento celulares, la vía PI3K/Akt esta inactivada, en consecuencia GSK-3β no se inhibe por esta vía y se puede encontrar más activa (Beurel & Jope, 2006) En modelos de precondicionamiento cardíaco se ha descrito que se activan las vías de supervivencia celular, entre ellas la vía PIK3/Akt (Bhuiyan et al., 2011), y se ha comprobado que la fosforilación de GSK-3β coincide con la fosforilación de Akt (Zhai P, 2011) (Nishihara, 2007). Por otro lado se ha encontrado que GSK-3β está implicada en los procesos de muerte neuronal por hipoxia en modelos de isquemia cerebral, reportándose un aumento de GSK-3β desfosforilada en su serina 9 (Roh et al., 2005). Cuando la célula sufre estrés hipertónico se comprobó la disminución de p-GSK-3β ser 9. En un experimento con cultivo de células intersticiales de la medula renal sometidas a estrés hipertónico y agregando un inhibidor de GSK-3β que no inhibe otras proteín quinasa, cloruro de litio (LiCl) (Stambolic et al., 1996) , se demostró el aumento de p-GSK-3β Ser9 y el aumento en la viabilidad en dichas células (Rao & Hao, 2004). También cuando la célula sufre estrés térmico la sobre expresión de GSK-3β induce a una hiperactividad de la caspasa- 3 comparado con el estado normal, sin embargo, al agregar un inhibidor LiCl esta actividad se ve fuertemente disminuida (Bijur et al, 2000). Otro estudio en el que las células se sometieron a estrés oxidativo con peróxido de hidrogeno, reveló que se aumentaba la liberación de citocromo c mitocondrial y la fragmentación de ADN en la célula, relacionando estos sucesos con la actividad GSK-3β, al agregar LiCl se observó la supresión de estos dos fenómenos (Shin et al., 2004).Por último los efectos de la excitotoxicidad por glutamato fueron atenuados al aumentar la inhibición de GSK-3β por la vía Akt en hipocampo de ratas (Rojo et al., 2008). En cuanto a la implicación de p-GSK-3β tyr216, se demostró que el incremento en el calcio citosólico lleva al aumento de la fosforilación en la tirosina 216 de GSK-3β y esta a su vez a la hiperfosforilación de Tau (Hartigan & Johnson, 1999) y que en células de cerebros de rata inducidos a isquemia, la cantidad de p-GSK-3β tyr216

aumentaba en el nucleó en las células que sufrían procesos apoptóticos (Bhat et al., 2000).

GSK-3β tiene diferentes mecanismos por los cuales participa en la inducción a la apoptosis en diferentes situaciones, uno de ellos es la activación o inducción de expresión de proteínas pro apoptóticas. Se ha demostrado en células neuronales granulares que los inhibidores de GSK-3β merman la translocación de Bax a la membrana mitocondrial, por otro lado GSK-3β fosforila a Bax en su serina 163, lo que hace que esta se active y forma parte del poro mitocondrial promoviendo la apoptosis, esto no lo logran las células en las que se tenía una variante de Bax sin serina 163 (Linseman et al., 2004). También se ha reportado que GSK-3β junto con la proteína JNK (c- jun N- Terminal Quinasa) incrementan la actividad de la proteína c-jun por fosforilación lo que lleva a mayor expresión de la proteína Bim y por ende mayor actividad de la caspasa-3. (Hongisto et al., 2003).

Además de las proteínas proapoptóticas, GSK-3β facilita la actividad factores de transcripción relacionados con muerte celular, uno de ellos es p53 que está implicado en apoptosis y que en un estudio con células de cáncer colorectales se encontró que la modulación de GSK-3β en p53 aumentaba la activación conformacional de Bax traducido en destrucción de la membrana mitocondrial y aumento de caspasa- 9 y la inhibición de GSK-3β con LiCl producían una disminución en la expresión de Bax (Tan et al., 2005).

La fosforilación de GSK-3β en serina 9, por su parte, es una determinante del umbral para la apertura del mPTP en cardiomiocitos. El umbral se eleva por la fosforilación de GSK-3β y se necesitan más concentración de iones para que se desencadene la apertura del poro. También la unión de p-GSK-3β ser9 a ANT suprime su asociación con CypD y con VDCA lo que impide la conformación de este complejo multiproteico que contribuye a la formación del mPTP (Zhai P, 2011).

Por otro lado, GSK-3β también influye en las proteínas anti- apoptóticas para disminuir su actividad. En un estudio se reveló que la proteína anti-apoptótica MCL-1 (proteína inducida por la diferenciación de células de leucemia mieloide), al ser fosforilada por GSK-3β en su serina 159 está más predispuesta a la degradación, en cambio la inhibición de GSK-3β por su fosforilación en serina 9 logra estabilizar a la proteína MCL-1 que es capaz de secuestrar a Bax o Bak para impedir el aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Maurer et al, 2006). Incluso GSK-3β puede inhibir los factores de transcripción que codifican para la producción de proteínas anti- apoptóticas, por ejemplo, la inhibición del factor de transcripción CREB que hace que se inhiba, a su vez, la transcripción de la proteína anti- apoptótica Bcl-2. (Beurel & Jope, 2006), y la fosforilación del factor de choque térmico HSF- 1 que inhibe su función como un factor de transcripción promotor de la supervivencia en cardiomiocitos (Miura & Miki, 2009).

Otros fenómenos como la hiperfosforilación de Tau y la desestabilización de los microtúbulos por parte de GSK-3β inducen a la apoptosis (Hartigan & Johnson, 1999) o la fosforilación de la β – catenina que induce su degradación y detiene los estímulos de crecimiento y supervivencia que presenta la misma (Thirunavukkarasy et al., 2008), son otros ejemplos de la inducción multifactorial de GSK3-β a la apoptosis.

**La proteína GSK-3β y la O-GlcNAción**

Algunos experimentos con glucosamina en cultivos celulares han puesto de manifiesto que hay una relación recíproca entre la O-GlcNAción y la fosforilación producida por GSK3-β, en la que al inhibir GSK3-β con cloruro de litio se observa aumento de la O-GlcNAción en ciertas proteínas como la vimentina, factor 1 de elongación alfa, el factor de transcripción Y-box, beta actina, lactasa deshidrogenasa A, proteína de choque térmico de 27KD y 72 KD, beta tubulina, entre otras (Wang, Pandey, & Har, 2007). Específicamente en los procesos de estrés celular la proteína de choque térmico de 72KD (HSP72) la cual es una chaperona molecular dependiente de ATP, que regula negativamente la apoptosis celular causada ya sea por estrés térmico o radiaciones ionizante e incluso la isquemia (Park, Cho, & Kim, 2002) es modulada por la O-GlcNAción quien compite con la fosforilación ocasionada por GSK3-β de una forma particular. GSK3-β se vincula con esta proteína promoviendo la apoptosis al fosforilar e inactivar el factor de transcripción de choque térmico (HSF1) quien en su forma activa promueve la expresión de HSP72 en situaciones de estrés. Al aumentar la O-GlcNAción (ya sea por promoción de OGT o por inhibición de GSK3-β), la expresión de HSP72 es inducida, puesto que se aumentaba la fosforilación en GSK3-β y por tanto su inactivación por lo que no podría inactivar a HSF1 (Zachara, Kazemi, & Chang, 2010). En otro experimento se encontró que la fosforilación de la proteína tau, que estimula el ensamblaje y que estabiliza la estructura de los microtúbulos, es controlada por GSK3-β y regulada negativamente por la O-GlcNAción, en el experimento se utilizó un inhibidor de la O-GlcNAcasa llamado Thiamet G, esto condujo a la disminución de la fosforilación de tau (Yu, Zhang, & Li, 2012). Se conoce que la hiperfosforilación de tau provoca su disociación de los microtúbulos y la consiguiente acumulación progresiva de agregados de tau relacionada con enfermedades neurodegenerativas (Alonso, 2009).

Respecto a la posibilidad de que GSK-3β en sí misma este modificada por O-GlcNAc, se encontró que en células de riñón donde la OGT fue sobre expresada por los experimentadores produciendo el aumento de O-GlcNAción, la fosforilación de la quinasa Akt disminuyó, con lo que se inferiría que al estar disminuida la forma activa de Akt entonces los niveles de su sustrato fosforilado (GSK3β fosforilada) disminuirían, pero se encontró que no lo hacían con lo que se concluyó que en riñón se descarta la posibilidad de que en la ser-9 de GSK-3β haya una O-GlcNAción (Shi, Wu, & Dai, 2012).

En realidad afirmar con seguridad lo que ocurre con una proteína específica cuando hay tratamientos para aumentar la O-GlcNAción no es fácil ya que la respuesta depende del tipo de célula que se estudie. En células de hígado, por ejemplo, el aumento de la OGT no afectó la fosforilación de Akt ni a GSK-3β y en células neuronales donde se inhibió la OGA incluso se encontró un aumento de Akt fosforilada (Shi, Wu, & Dai, 2012). También depende de la proteína que se estudie ya que algunas proteínas cuya fosforilación estaba relacionada con GSK3-β, al ser inhibida con litio, mostraron paradójicamente disminución en la O-GlcNAción, por ejemplo nucleolina, nucleoporina p54, factor de célula huésped C1 (Wang, Pandey, & Har, 2007).

Ya se ha mencionado que al activarse Akt por la fosforilación de sus residuos de treonina-308 y la serina-473, es capaz de fosforilar a GSK3-β en su serina-9, inactivándola (Delcommenne & Tan, 1998). Al encontrar que Akt puede ser modificada por O-GlcNAción en la serina 473 (Kang & Han, 2008) y así incrementar su forma o- glicosilada sobre la fosforilada, se puede inferir que el aumento de la O-GlcNAción podría provocar una disminución de la forma activa de GSK-3β porque disminuye la Akt en su forma fosforilada, sin embargo, existe evidencia de que Akt puede estar en su forma o-glicosilada como fosforilada simultáneamente (Gandy & Rountree, 2006). Al parecer todo dependería del tipo de célula o la vía que predomine en la célula para modular GSK-3β dado un evento particular, por lo que es importante estudiar cómo cambian las modificaciones post-traduccionales en GSK-3β durante la isquemia cerebral tratada con glucosamina.

## 2.3 Objetivos e indicadores

**Objetivo General:**

Caracterizar los niveles de expresión de la proteína GSK-3β total y fosforilada en un modelo animal de isquemia cerebral focal en tratamiento con glucosamina

**Objetivos Específicos:**

1. Evaluar y comparar a nivel bioquímico, usando la técnica de Western Blot, los niveles de expresión de la proteína GSK-3β total en cerebros de ratas sometidas a isquemia cerebral y a tratamiento con glucosamina, a diferentes tiempos después de haber provocado la isquemia
2. Evaluar y comparar a nivel bioquímico, usando la técnica de Western Blot, los niveles de expresión de la proteína GSK-3β fosforilada en cerebros de ratas sometidas a isquemia cerebral y a tratamiento con glucosamina, a diferentes tiempos después de haber provocado la isquemia

**Indicadores:**

1. Cuantificación por densitometría de la intensidad de las bandas de GSK-3β y GSK-3β fosforilada, de las placas obtenidas por la técnica de Western-Blot y posterior análisis a través de la prueba t-Student y ANOVA, con el fin de determinar si hay diferencias significativas en la expresión de GSK-3β entre los grupos experimentales.

## 2.4 Metodología y Matriz del Marco Lógico

### Metodología

### 2.4.1 Aplicación de la glucosamina

A las ratas usadas en el experimento (*Rattus norvegicus* cepa wistar) se les administró glucosamina en una dosis de 200mg/ kg, por vía intraperitoneal mediante inyección con jeringa de insulina, Esta se administró disuelta en solución salina en una concentración de 40 mg/mL, una hora antes de la isquemia.

### 2.4.2 Acompañamiento en la realización de las microcirugías.

Se acompañó al cirujano en la realización de las microcirugías según el modelo de isquemia cerebral focal MCAO (Middle Cerebral Arterial Occlusion) produciendo infarto cerebral a las ratas. Las ratas utilizadas son especie *Rattus norvegicus* cepa wistar, su peso es alrededor de 300 ± 20 g y su edad oscila entre 12 ± 2 meses de edad.

La isquemia cerebral focal se indujo por la técnica de la oclusión intraluminal de la arteria cerebral media mediante un monofilamento (Belayev, 1996) (Zea-Longa, 1989), en la cual primero se anestesió a la rata con isoflurano que se le entregó a través de una máscara de nariz y se mantuvo así durante toda la operación. La arteria carótida común derecha se expuso a través de una incisión cervical en la línea media bajo un microscopio quirúrgico y se separó suavemente de los nervios. Se colocó clips microvasculares alrededor de la arteria carótida común derecha y la arteria carótida externa para evitar el sangrado durante la inserción del filamento.

La arteria carótida externa se cerró con dos suturas y se cortó con microtijeras y electrocoagulación. Un filamento de nylon de 40 mm de longitud al cual se le redondeó la punta y previamente se recubrió con poli-L-lisina fue insertado en el tronco de la arteria carótida común externa. El filamento avanzó entre 1,9 hasta 2,1cm en la arteria carótida interna derecha, para ocluir el flujo de la sangre hacia el territorio de la arteria cerebral media, hasta que se sintiese resistencia. El filamento se mantuvo en su lugar apretando la sutura alrededor de la arteria carótida externa. La temperatura corporal se controló alrededor de 35°C usando una lámpara de calor y se midio durante todo el procedimeinto quirúrgico con un termómetro rectal. El filamento se mantuvo alojado durante los diferentes tiempos predefinidos a nivel de la arteria cerebral media derecha hasta el momento de sacrificio de cada biomodelo de acuerdo con el grupo experimental.

Las cirugías realizadas fueron las siguientes:

- Procedimiento quirúrgico invasivo sin isquemia y sin tratamiento con glucosamina (grupo control).

- Procedimiento quirúrgico invasivo sin la isquemia, con tratamiento con glucosamina.

- procedimiento quirúrgico invasivo con isquemia y sin tratamiento con glucosamina.

- Procedimiento quirúrgico invasivo con isquemia y con tratamiento con glucosamina.

Estos fueron los diferentes grupos experimentales, que se repetirán en diferentes tiempos de eutanasia de la rata (a los 15, 45 y 90 minutos y a las 6 horas después de transcurrida la isquemia), en los que se tendrán cuatro individuos por cada uno y cuya distribución se resume en la siguiente tabla:

**Tabla 1: Organización grupos experimentales**

| **Glucosamina** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **+** | **+** | **+** | **+** | **+** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Isquemia** | - | + | + | + | + | - | + | + | + | + |
| **Tiempo** | Control | 15min | 45min | 90min | 6h | Control | 15min | 45min | 90min | 6h |
| **Grupos** | F | L | H | J | A | E | K | G | I | C |

### 2.4.3 Extracción y conservación de los cerebros de rata

El cirujano realizó la eutanasia de la rata y la extracción de su cerebro y por medio de microdisección separó su corteza, el tejido que es estudiado es la corteza frontoparietal derecha. Después se procedió a realizar el protocolo para la conservación de los cerebros:

Primero se adicionó el Buffer de Lisis con PUGNAc (inhibidor de O-GlcNAcasa), inhibidor de fosfatasas e inhibidor de proteasas en una proporción 1:1000 respectivamente, se emplearon 500 µL de buffer de lisis por cada tejido a tratar y se añadieron a un tubo Eppendorf de tapa de rosca, luego se adicionaron los tejidos de los cuatro individuos que pertenecen a un mismo grupo experimental a este tubo Eppendorf. Se procedió a homogenizar estos tejidos con un rotor estator a velocidad media por 45 segundos. Una vez homogenizados los tejidos se centrifugaron a 4ºC, por 3 minutos a 13000 rpm, finalmente el sobrenadante se almacenó a -80C ° para la realización posterior de todos los Western Blots

(Laboratorio de fisiología animal, Universidad Icesi, procedimiento operativo estandarizado POE para extracción y conservación de cerebros de rata, versión 1)

### 2.4.4 Realización curva de estandarización

Esta curva se llevó a cabo por el ensayo de proteínas por Bio Rad y se hizo para la determinación de la concentración de proteínas en los homogenizados y la determinación de las proteínas a cargar en cada pozo.

Este ensayo se basa en que a diferente concentración de proteínas el Reactivo de Bradford cambia su color y su intensidad, esta reacción colorimétrica es dependiente del tiempo y si se realiza dentro de los rangos especificados se ha encontrado que la absorbancia es proporcional a la concentración siguiendo la ley de Beer.

Se realizó una curva estándar con diferentes diluciones de un stock de albumina de suero bovino (BSA) de 0,125 µg/µL en buffer fosfato salino (PBS) 1X, la cual es una proteína estándar que representó a las proteínas evaluadas, de este stock se hicieron diferentes diluciones para obtener distintas concentraciones de BSA que encajarán dentro del rango en el que el ensayo de proteínas por Bio Rad es lineal. El proveedor del reactivo de coloración Bradford reportó que esto era entre 1.2 a 10.0 µg/mL. Por lo que se hicieron las siguientes diluciones:

**Tabla 2: Diluciones para construcción de curva estándar con BSA**

| Concentración µg/mL | Volumen de stock BSA tomado (0.125µg/mL) | Volumen de PBS 1X µL | Volumen del reactivo de Bradford µL |
|---|---|---|---|
| 1 | 8 | 792 | 200 |
| 2 | 16 | 784 | 200 |
| 3 | 24 | 776 | 200 |
| 5 | 40 | 760 | 200 |
| 7 | 56 | 744 | 200 |
| 8 | 80 | 720 | 200 |

Después de realizados los diferentes estándares y pasados 25 minutos de agregar el reactivo de coloración, se procedieron a leer por triplicado en el lector de microplacas (Synergy™ H1) cuyo error en exactitud es menor al 2% y precisión menor al 0,5%. Los resultados obtenidos fueron:

**Tabla 3: concentraciones calculadas por el lector de placas.**

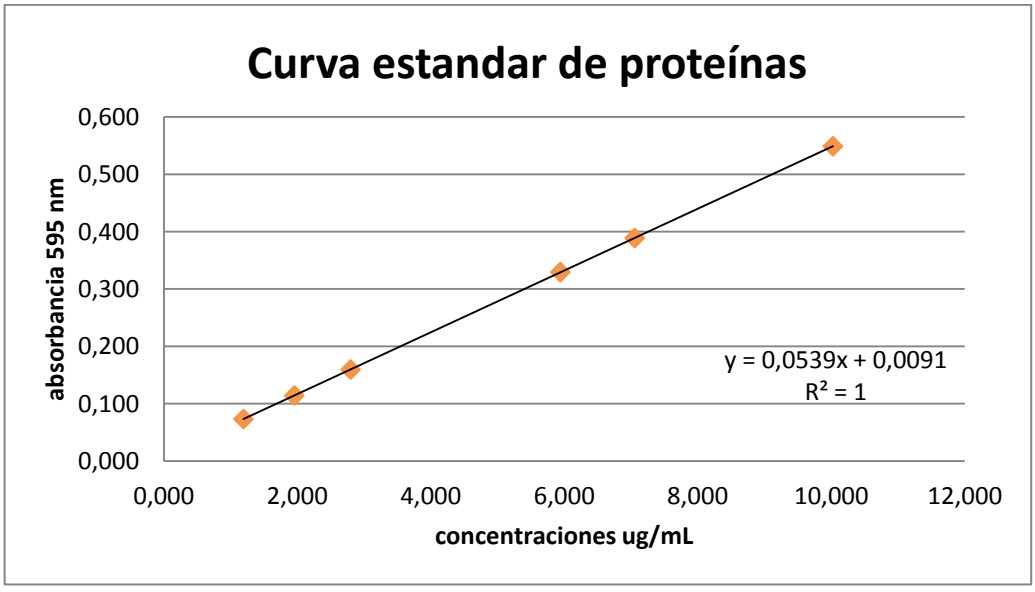
| concentración ug/mL | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **estándares ug/mL** | **repetición 1** | **repetición 2** | **repetición 3** | **promedio** |
| **1** | 0,964 | 1,298 | 1,316 | 1,193 |
| **2** | 1,741 | 2,114 | 2,008 | 1,954 |
| **3** | 2,587 | 2,99 | 2,814 | 2,797 |
| **5** | 3,387* | 5,673 | 6,207 | 5,940 |
| **7** | 7,035 | 6,74 | 7,387 | 7,054 |
| **10** | 9,911 | 9,896 | 10,265 | 10,024 |

**Tabla 4: absorbancias calculadas por el lector de placas.**

| absorbancia a 595 nm | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **estándares ug/mL** | **repetición 1** | **repetición 2** | **repetición 3** | **promedio** |
| **1** | 0,061 | 0,079 | 0,08 | 0,073 |
| **2** | 0,103 | 0,123 | 0,117 | 0,114 |
| **3** | 0,148 | 0,17 | 0,161 | 0,160 |
| **5** | 0,174* | 0,315 | 0,344 | 0,330 |
| **7** | 0,388 | 0,372 | 0,407 | 0,389 |
| **10** | 0,543 | 0,542 | 0,562 | 0,549 |

*Este dato no fue tenido en cuenta para el cálculo del promedio ya que su valor se debe a errores humanos.

La curva estándar obtenida fue la siguiente:




**Gráfica 1: Curva estándar de proteínas realizada por ensayo Bio-Rad con BSA a 595 nm.**

Para la lectura de las muestras de corteza (homogenizado almacenado a -80°C) se realizó el siguiente tratamiento: se tomó 1µL de la muestra y se diluyo en 1000 µL de PBS 1X, de esta dilución se tomaron 500 µL y se diluyeron en 300 µL de PBS 1X y en 200 µL de reactivo de Bradford, para una dilución total de 1 en 2000. Luego se aseguró que el reactivo de Bradford se mezclara homogéneamente con el resto de la muestra y se leyeron en el lector de placas pasados 25 minutos.

**Tabla 5: Concentraciones calculadas a partir de la curva estándar de proteínas**

| grupo | absorbancia 595 (nm) | Concentración de proteínas (ug/mL) | concentración de proteínas teniendo en cuenta la dilución (ug/mL) |
|---|---|---|---|
| **A** | 0,194 | 3,430 | 6861 |
| **B** | 0,213 | 3,783 | 7566 |
| **C** | 0,233 | 4,154 | 8308 |
| **D** | 0,226 | 4,024 | 8048 |
| **E** | 0,400 | 7,252 | 14505 |
| **F** | 0,271 | 4,859 | 9718 |
| **G** | 0,216 | 3,839 | 7677 |
| **H** | 0,255 | 4,562 | 9124 |
| **I** | 0,242 | 4,321 | 8642 |
| **J** | 0,275 | 4,933 | 9866 |
| **K** | 0,219 | 3,894 | 7788 |
| **L** | 0,215 | 3,820 | 7640 |
| **M** | 0,369 | 6,677 | 13354 |
| **N** | 0,262 | 4,692 | 9384 |

La muestra del cálculo se puede observar en el Anexo 1.

Una vez obtenidas las concentraciones de la muestra se calculó la cantidad muestra para servir en cada pozo teniendo en cuenta que se estableció servir 30 µg por cada pozo, y la cantidad de agua y buffer en el que esta muestra se disuelve. La muestra de los cálculos se puede observar en el Anexo 1.

**Tabla 6: Cantidad de muestra, buffer y agua para servir 20 µL en el pozo.**

| **Cantidad para servir en los geles** | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Grupos corteza** | **A** | **B** | **C** | **D** | **E** | **F** | **G** | **H** | **I** | **J** | **K** | **L** | **M** | **N** |
| **volumen (µL) de la muestra** | 4,37 | 3,97 | 3,61 | 3,73 | 2,07 | 3,09 | 3,91 | 3,29 | 3,47 | 3,04 | 3,85 | 3,93 | 2,25 | 3,20 |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **volumen buffer Laemmli 2X (µL)** | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| **volumen de agua (µL)** | 5,63 | 6,03 | 6,39 | 6,27 | 7,93 | 6,91 | 6,09 | 6,71 | 6,53 | 6,96 | 6,15 | 6,07 | 7,75 | 6,80 |
| **volumen total (µL)** | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |

### 2.4.5 Realización de los Western Blots

La realización de esta técnica se hizo por cuadruplicado (Laboratorio de fisiología animal, Universidad Icesi, procedimiento operativo estandarizado POE para Realización de Western Blots, versión 1).

#### 2.4.5.1 *Preparación de los geles para electroforesis*

Para la electroforesis, se prepararon geles de poliacrilamida al 6%, con 12 pozos y se almacenaron por un día en nevera a 9°C. Los componentes del gel y sus cantidades fueron las siguientes:

**Tabla 7: composición de un gel al 6% de acrilamida.**

| **Soluciones de componentes** | **Running Gel** | **Stacking Gel** |
|---|---|---|
| **Agua destilada** | 6.6mL | 2.1 mL |
| **Acrilamida 30%** | 2.5mL | 500 µL |
| **Tris 1,5 M pH 8,8 (R)**<br>**Tris 1M pH 6,7 (S)*** | 3.2mL | 375 µL |
| **SDS 10%** | 125µL | 30 µL |
| **Persulfato de amonio 10%** | 125 µL | 30 µL |
| **TEMED** | 10 µL | 3 µL |
| **Volumen** | 12,8 mL | 3mL |

*R para running y S para stacking

#### *2.4.5.2 Electroforesis*

Para la electroforesis, se sembraron las muestras de los diferentes grupos experimentales (10), más dos carriles con el marcador de peso molecular. Con base en él se identificó a qué distancia se separó GSK-3β de las demás proteínas, teniendo en cuenta que el peso molecular de GSK-3β es de 47KDa. La cantidad de homogenizado, determinada anteriormente en la curva de calibración, se diluyó con agua hasta alcanzar 10 µL y se agregaron 10 µL de buffer de carga Laemmli 2x para preparar las muestras dentro de un tubo eppendorf de manera que cada tubo contuvo 20 µl para servir en el gel. Finalmente, estas muestras se calentaron

a 95ºC por tres minutos y se centrifugaron por 30 segundos. Por último estas muestras se sembraron en los geles de poliacrilamida de la siguiente manera:

**Tabla 8: Esquema de la siembra de las muestras en los pozos del gel de electroforesis**

| POZO | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GRUPO | M.P* | F | L | H | J | A | M.P* | E | K | G | I | C |

M.P: Marcador de Peso Molecular

La electroforesis se corrió a 150 Voltios (V) y 0,06 Amperios (A), durante 1 hora y 30 minutos aproximadamente.

### *2.4.5.3 Transferencia*

Se realizó una transferencia, en la cual las proteínas que se encontraban en el gel pasaron a una membrana de PVDF (fluoruro de polivilideno) previamente activada con 20 mL de metanol y equilibrada con buffer de transferencia. El proceso se llevó a cabo mediante la fuerza de migración de tipo eléctrico, aprovechando la carga negativa de las proteínas, para ello se usó un casete en el que se armó una especie de sándwich de transferencia que consistirá en

*Primero*: Esponja blanca
*Segundo*: Papel filtro
*Tercero*: Gel de la electroforesis
*Cuarto*: Membrana de PVDF activada
*Quinto*: Papel filtro
*Sexto*: Esponja blanca

En ese orden se tuvo la precaución de acomodar el sándwich de tal manera que las proteínas migren del gel a la membrana de transferencia. Esta transferencia se realizó a 150V y 0,6A, por 3 horas, bajo refrigeración constante a través de una bomba de agua fría.

### *2.4.5.4 Bloqueo e incubación de la membrana de PVDF*

La membrana de PVDF se expuso a una solución de bloqueo de Tris-Buffer Salino y Tween 20 (TBST 1X) y albumina de suero bovino (BSA) al 3% con agitación en un shaker a temperatura ambiente, por una hora, con una velocidad de agitación de 13 rpm y un ángulo de 15°.

Después se retiró la solución de bloqueo y la membrana se incubó con los siguientes anticuerpos en su orden:

**Tabla 9: Anticuerpos usados en las membranas transferidas.**

| Orden | Anticuerpo contra | Dilución | Hospedador |
|---|---|---|---|
| 1 | RL2 | 1:2000 | Ratón |
| 2 | GSK-3β Total | 1:500 | Ratón |
| 3 | p-GSK-3β serina 9 | 1:500 | Conejo |
| 4 | p-GSK-3β tirosina216 | 1:500 | Conejo |
| 5 | β -Actina | 1:500 | Ratón |

La dilución de cada uno de los anticuerpos se realizó con TBST +BSA 3%. La incubación se llevó a cabo durante la noche, a 4ºC, con agitación constante. Al día siguiente, se retiraron los anticuerpos y se realizaron 5 lavados a la membrana con TBST 1X, cada uno de 5 minutos.

Posteriormente la membrana se incubó con anticuerpo secundario anti-hospedero (sea ratón o conejo) conjugado con peroxidasa de rábano en una dilución 1:3000 realizada con TBST+BSA 3% durante 1 hora y 30 minutos, a temperatura ambiente, después se retiró la solución de anticuerpo secundario y se realizaron 5 lavados a la membrana con TBST 1X, cada uno de 5 minutos.

#### *2.4.5.5 Revelado*

La membrana se incubó con solución de revelado durante 5 minutos, esta solución consta de una mezcla de Luminol y una solución de peroxidasa. Después de cumplido el tiempo la solución de revelado se retiró y se procedió, en el cuarto oscuro, a poner en contacto la película radiográfica con la membrana en un tiempo determinado dependiendo de la fluorescencia. La radiografía se pasó por la máquina de revelado dando como resultado una película donde están plasmadas las bandas luminiscentes de las proteínas que se deseaban conocer.

#### *2.4.5.6 Stripping*

Para poder utilizar de nuevo esta membrana incubándola con otro anticuerpo fue necesario hacer un lavado que constó de los siguientes pasos: un lavado por 5 minutos con TBST 1X, dos lavados por 10 minutos con solución de Stripping (SDS 10%, Tween 20, buffer de glicina pH 2), 2 lavados por 10 minutos con PBS 1X, un lavado por 10 minutos con TBST 1X, Finalmente se retomó desde el paso del bloqueo para continuar con la incubación.

### 2.4.6 Análisis de los datos

Se fotografiaron los revelados obtenidos y por medio del software ImageJ, se pudo cuantificar la intensidad de las bandas correspondientes a GSK-3β y GSK-3β fosforilada (por densitometría), que son proporcionales al número de pixeles que detecta el programa en diferentes escalas de grises. Estos datos se normalizaron con la intensidad obtenida para la proteína control β-actina y por el control shame F, se realizó un promedio de los cuatro datos obtenidos para cada grupo experimental, con su respectivo error estándar de la media y se confirmó el comportamiento normal de los residuos y las varianzas a través de la prueba de kosmogorov y Levene y Bartlett, respectivamente, con una significancia de 0,05 (valor $p<0,05$). Se compararon los datos normalizados entre los grupos experimentales a través de un ANOVA y la prueba t-Student de dos colas, apareada, con una significancia de 0,05 (valor $p<0,05$).

### Matriz del marco lógico

<table>
<tr><td colspan="4">Objetivo general<br><br>Caracterizar los niveles de expresión de la proteína GSK-3β total y su forma fosforilada en un modelo animal de isquemia cerebral focal en tratamiento con glucosamina para junio del 2014.</td></tr>
<tr><th>Objetivo especifico</th><th>Actividad</th><th>Indicador</th><th>Supuesto</th></tr>
<tr><td>Evaluar y comparar a nivel bioquímico, por la técnica de Western Blot, la presencia de la proteína GSK-3β total y GSK-3β fosforilada proveniente de los cerebros de rata, en los diferentes grupos</td><td>Acompañar al cirujano en la realización de la eutanasia de las ratas, la extracción del cerebro, la microdisección de la corteza y su conservación.<br><br>Realizar los respectivos Western Blots.<br><br>Realizar la cuantificación de la</td><td>Identificación de la proteína GSK-3β total y su forma fosforilada con la ayuda del marcador de peso molecular utilizado en la electroforesis y Cuantificación del de la intensidad de las bandas por</td><td>Disponibilidad del cirujano.<br><br>Disponibilidad del cuarto frío y los reactivos para conservación del cerebro y realización del Western Blot.<br><br>Disponibilidad de los equipos del</td></tr>
</table>

| | | | |
|---|---|---|---|
| experimentales. | intensidad de la banda de la proteína GSK-3β y GSK-3β fosforilada, por medio del software ImageJ. | densitometría. | laboratorio de investigación. |
| Comparar los niveles de expresión de la proteína GSK-3β y GSK-3β fosforilada proveniente de los cerebros de los diferentes grupos experimentales. | Utilizar la prueba T-Student y ANOVA para determinar si hay diferencia en la intensidad de la banda de la proteína GSK-3β total y su forma fosforilada entre los grupos experimentales | Rechazar o aceptar la hipótesis de que la expresión de proteína GSK-3β total o su forma fosforilada varía entre los grupos experimentales con isquemia sin tratamiento con glucosamina y de isquemia con tratamiento con glucosamina a través del tiempo | Obtención de resultados en la cuantificación de la intensidad de las bandas de la proteína GSK-3β y GSK-3β fosforilada por densitometría<br><br>Disponibilidad del software ImageJ |

## 2.5 Resultados

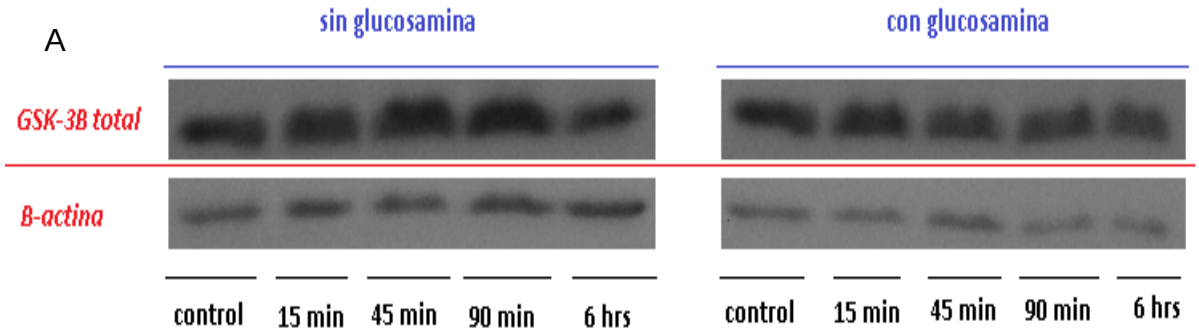
Se midió la expresión y presencia relativa de las proteínas de interés por densitometría normalizando los resultados por su carga con β-actina. La imagen de los inmunoblots se puede observar en las Figuras A y su densitometría en las Figuras B. Estos resultados se hicieron por cuadruplicado. El análisis de los datos se realizó por ANOVA (ver Anexos 2,3 y 4), comprobándose su normalidad y las interacciones entre grupos. Además se realizó una prueba t-student con una confianza del 95% para la comparación por pares entre los diferentes datos (ver Figuras C). Por último se realizó una comparación entre tiempos (el más temprano contra el más tardío) dentro de la misma condición con una prueba t-student (ver Figuras D).

### Caracterización de GSK-3β total

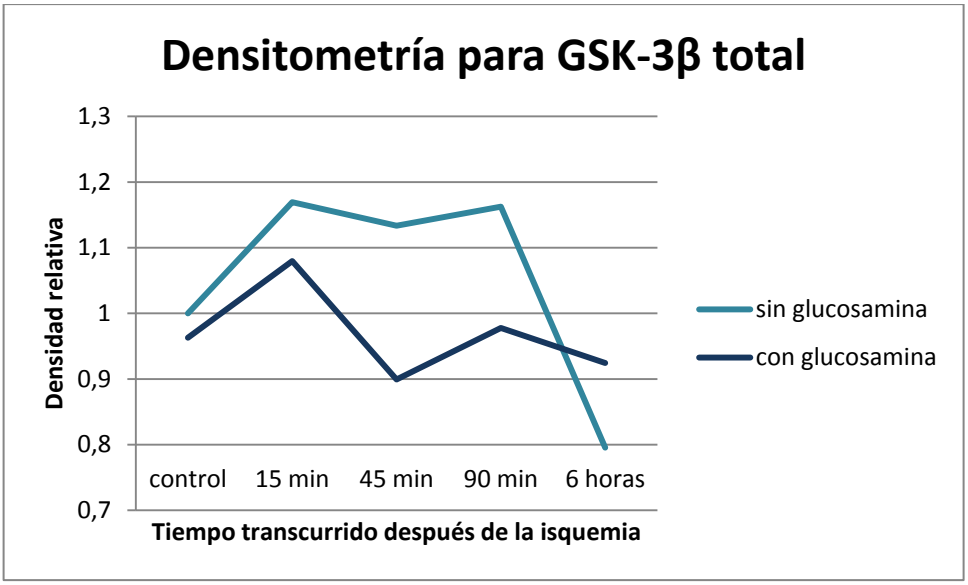
Se encontró principalmente que, a ese nivel de confianza, el ANOVA reporta que no hay diferencias entre los tratamientos, ni tampoco entre los tiempos y que no hay interacción entre tratamiento y tiempo (ver Anexo 1). En general (no por pares) se puede observar que la condición sin glucosamina tiene, sin ser significativa, una mayor expresión de la GSK-3β total, que la condición con

glucosamina, excepto a las 6 horas y que el tiempo que tiene la mayor expresión de la GSK-3β total en general, sin ser significativa, es el de 15 minutos (ver Figura 1B). Al hacer la comparación por pares en cada tiempo se confirmó que no existía diferencia en la expresión de GSK-3β total en los cerebros isquémicos sin y con tratamiento con glucosamina en cada uno de los tiempos (ver Figura 1C) Sin embargo, al comparar la expresión a los 15 minutos y a las 6 horas, hay diferencia en el tratamiento de isquemia sin glucosamina, y esta diferencia se elimina en el tratamiento de isquemia con glucosamina (ver Figura 1D).

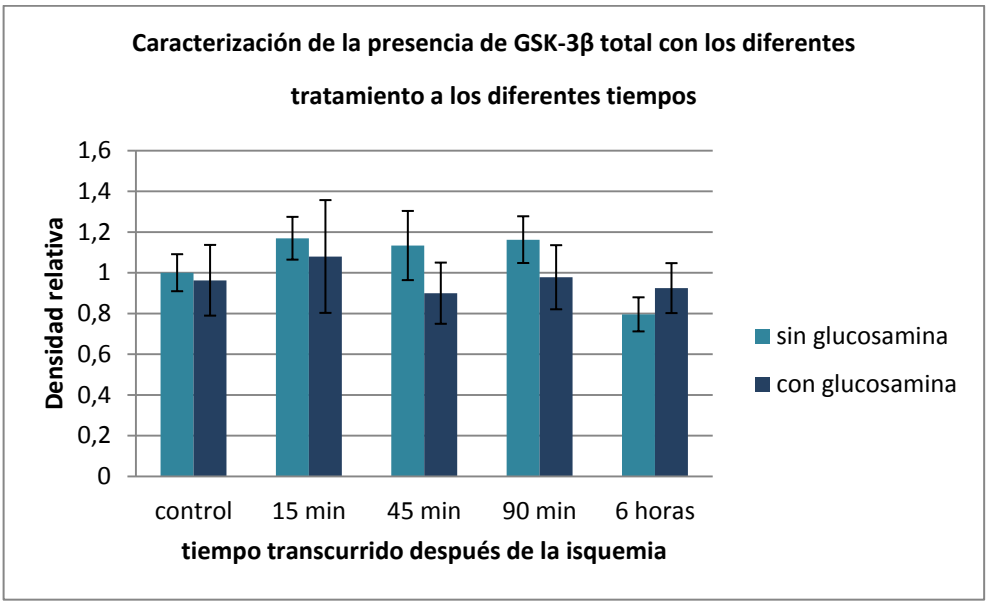
A




B



C




D

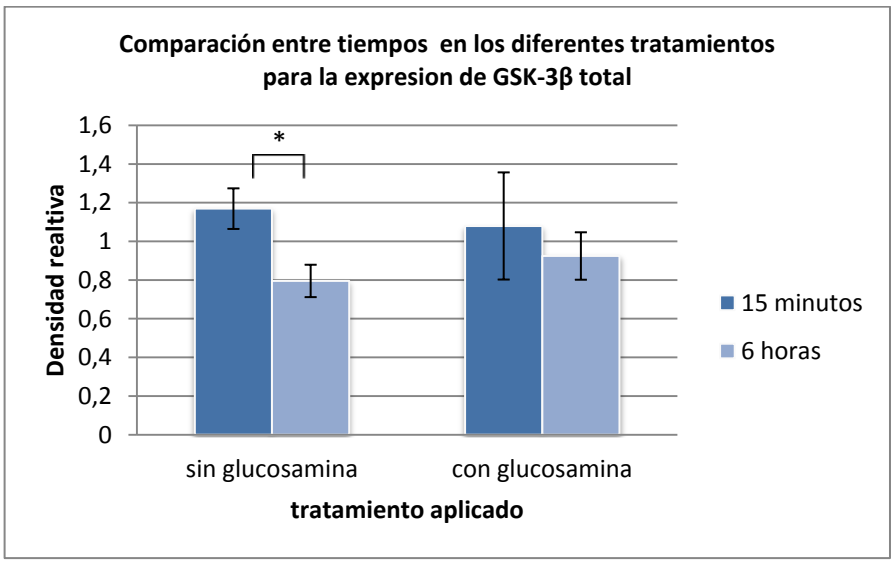
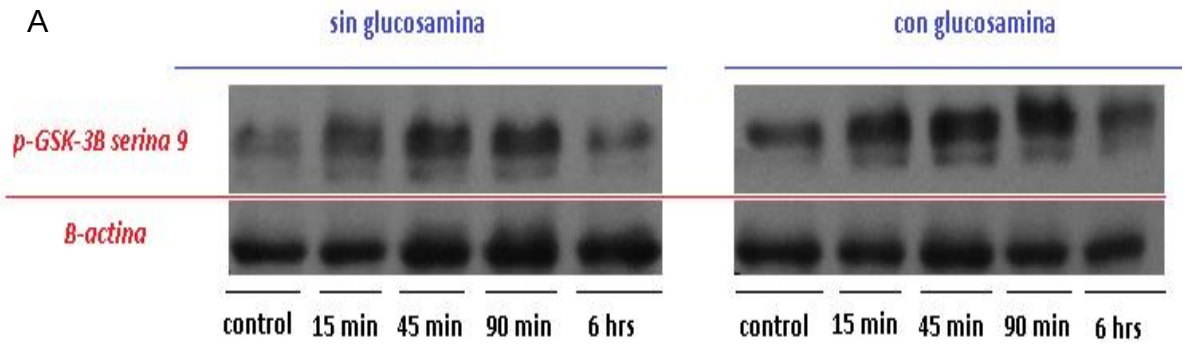


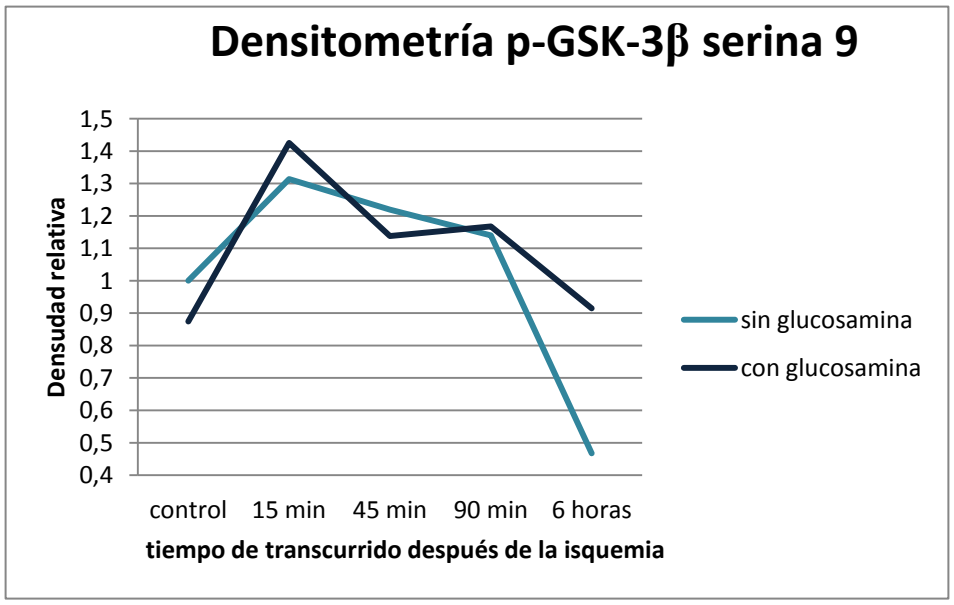

**Figura 1**. **Comportamiento de la expresión de GSK-3β total en corteza de cerebros de ratas sometidas a isquemia, tratadas y no tratadas con glucosamina, evaluadas a diferentes tiempos**. (A) Representativo inmunoblot de GSK-3β total y su control de carga. (B) Gráfica de la cuantificación por densitometría de los promedios de los inmunoblot que muestra la tendencia de la expresión de GSK-3β total en los diferentes tratamientos a través de los tiempos de interés con n=4 (C) Comparación por pares (con y sin tratamiento con glucosamina) de los resultados de la densitometría a los diferentes tiempos mostrados como promedio +/- error estándar de la media (SEM) a través de la prueba t-student ($p<0,05$). (D) Comparación de la expresión de GSK-3β total por la prueba t- student ($p<0,05$) entre el tiempo más temprano (15min) y el más tardío (6 hrs) del experimento en los cerebros tratados sin y con glucosamina respectivamente.

**Caracterización de p-GSK-3β serina9**

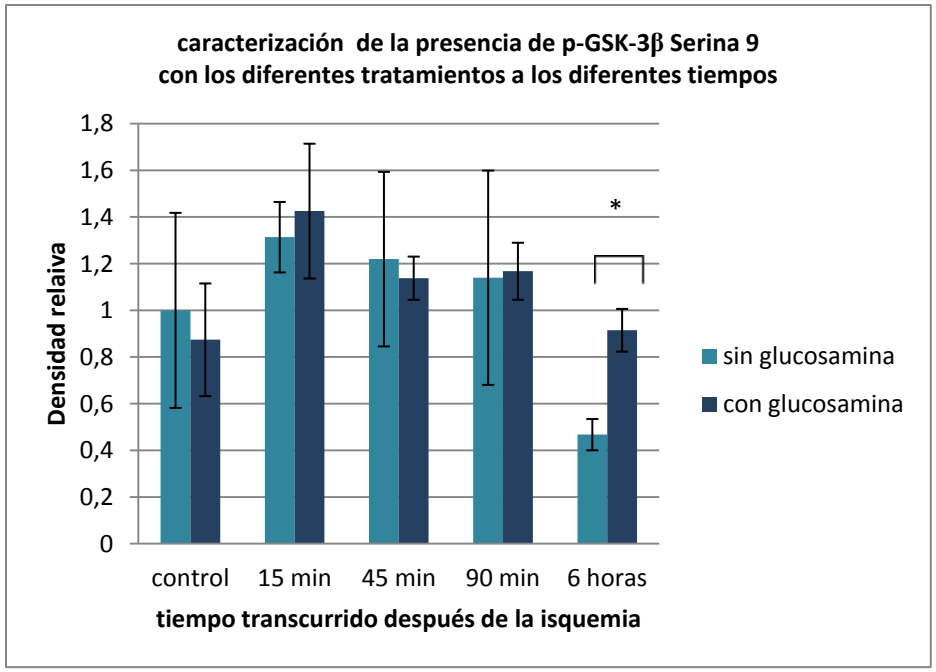
Se encontró principalmente que, a ese nivel de confianza, el ANOVA arrojó que no existía, en general, ninguna diferencia entre tratamiento con y sin glucosamina sin tener en cuenta los tiempos, pero que si existen diferencias significativas, en general, de la presencia de p-GSK-3β serina 9 entre los tiempos de transcurrida la isquemia evaluados sin tener en cuenta la variable tratamiento, se determinó específicamente que hay mayor presencia de esta modificación post traduccional a los 15 minutos que a las 6 horas sin discriminar entre tratamientos (ver Anexo 3). Al hacer la gráfica de tendencia se encontró que, aunque no es marcada la superioridad en la manifestación de p-GSK-3β serina 9 en el tratamiento con glucosamina, en la mayoría de los tiempos evaluado (15 y 90 minutos y las 6 horas) se puede observar una mayor cantidad relativa, no significativa, de la proteína p-GSK-3β serina 9 y una menor cantidad relativa de la misma proteína a las 6 horas en las dos condiciones, con y sin tratamiento (ver Figura 2B). Al realizar la comparación por pares se encontró que, a pesar de lo arrojado por el ANOVA en general, existe una diferencia significativa entre los tratamientos sin y con glucosamina a las 6 horas, la mayor cantidad relativa de la proteína p-GSK-3β serina 9 se encuentra en el tratamiento con glucosamina sobre la condición sin glucosamina en este tiempo (ver Figura 2C). Al hacer una ampliación para los resultados del ANOVA, en la que existe diferencia en el tiempo sin discriminar tratamiento comparándo el tiempo más temprano (15 minutos) con el más tardío (6 horas), se encontró que existen diferencias significativas de la presencia de p-GSK-3β serina 9 en los cerebros isquémicos que no fueron tratados con glucosamina, diferencia que no se encuentra al realizar la misma comparación en los cerebros con tratamiento con glucosamina (ver Figura 2D).



B


Densitometría p-GSK-3β serina 9
Densudad relativa
1,5
1,4
1,3
1,2
1,1
1
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
control
15 min
45 min
90 min
6 horas
tiempo de transcurrido después de la isquemia
sin glucosamina
con glucosamina

C


caracterización de la presencia de p-GSK-3β Serina 9
con los diferentes tratamientos a los diferentes tiempos
Densidad relaiva
1,8
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
*
control
15 min
45 min
90 min
6 horas
tiempo transcurrido después de la isquemia
sin glucosamina
con glucosamina

D

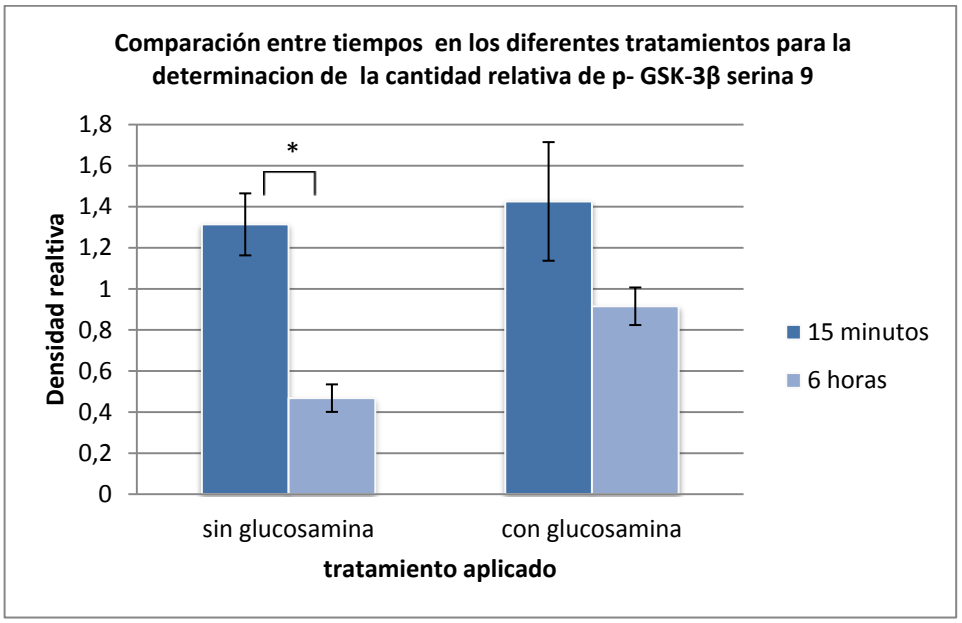
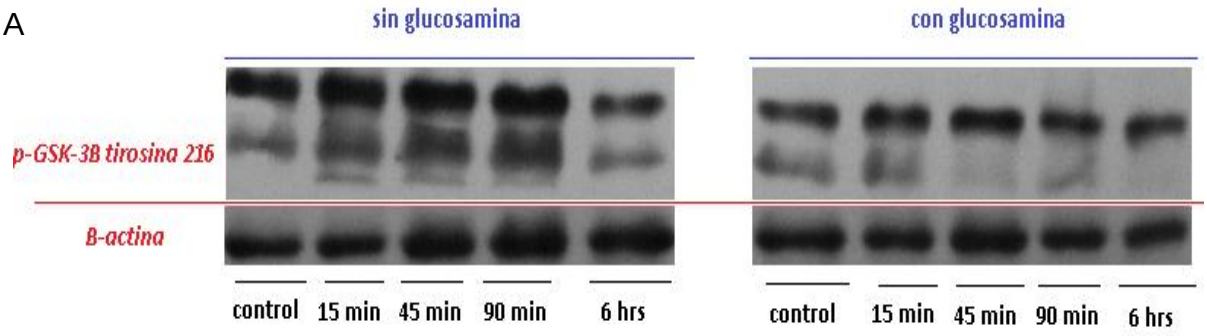



**Figura 2**. **Caracterización de p-GSK-3β serina 9 en corteza de cerebros de ratas sometidas a isquemia, tratadas y no tratadas con glucosamina, evaluadas a diferentes tiempos**. (A) Imagen del inmunoblot de p-GSK-3β serina 9 y su control de carga β-actina. (B) Gráfica de tendencia los resultados obtenidos en la densitometría de los promedios de los inmunoblot de p-GSK-3β serina 9, en los diferentes tratamientos a través de los diferentes tiempos evaluados con n=4. (C) Comparación entre pares de los resultados de la densitometría entre los tratamientos a los diferentes tiempos mostrados como promedio +/- error estándar de la media (SEM) a través de la prueba t-student ($p<0,05$). (D) Comparación de la cantidad relativa de p-GSK-3β serina 9 entre el primer tiempo evaluado (15min) y el ultimo (6 hrs) por la prueba t- student ($p<0,05$) del experimento en los cerebros tratados sin y con glucosamina respectivamente.

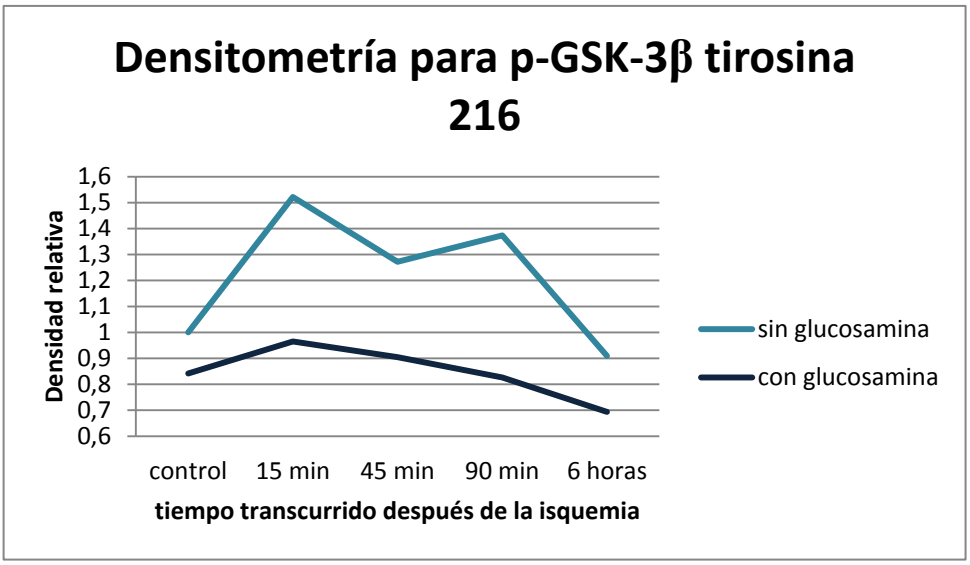
## Caracterización de p-GSK-3β tirosina 216

Se encontró principalmente que, a ese nivel de confianza, el análisis ANOVA arrojó que no hay diferencias significativas de la presencia de p-GSK-3β tirosina 216 entre los tiempos sin discriminar tratamiento (ver Figura 3D) pero que en general sí existe diferencia significativa en la presencia de la proteína p-GSK-3β tirosina 216 entre los diferentes tratamientos sin discriminar en los tiempos, la mayor expresión de la proteína con esta modificación post-traduccional se observa en la condición sin tratamiento con glucosamina (ver Anexo 4). Este resultado se puede observar en la cuantificación de la densitometría donde la línea de tendencia en todos los tiempos apunta a que esta modificación es más alta en la condición que no fue tratada con glucosamina (ver Figura 3B). Al hacer la comparación por pares en cada tiempo, se observó que a los 15 minutos hay una diferencia significativa en la cantidad relativa de p-GSK-3β tirosina 216 entre la condición sin glucosamina y con glucosamina, teniendo la mayor presencia en la condición sin glucosamina (ver Figura 3C).

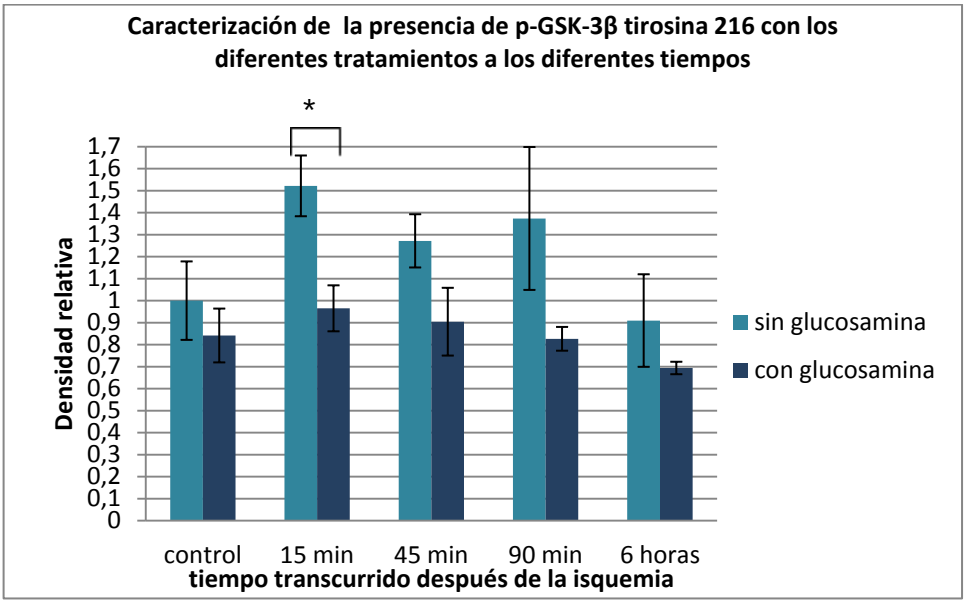
A


sin glucosamina
con glucosamina
p-GSK-3B tirosina 216
B-actina
control
15 min
45 min
90 min
6 hrs
control
15 min
45 min
90 min
6 hrs

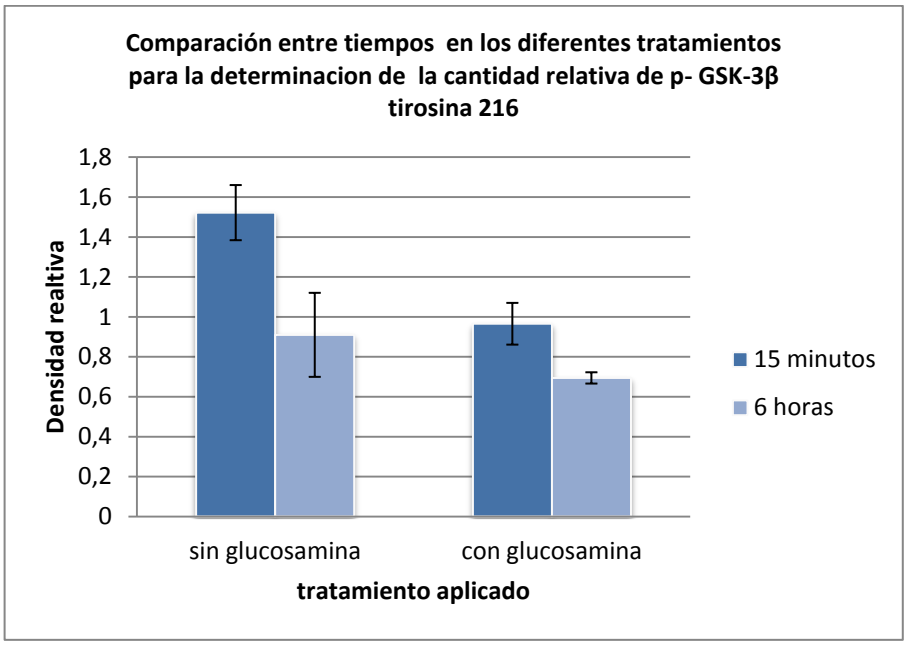
B


Densitometría para p-GSK-3β tirosina 216
Densidad relativa
1,6
1,5
1,4
1,3
1,2
1,1
1
0,9
0,8
0,7
0,6
control
15 min
45 min
90 min
6 horas
tiempo transcurrido después de la isquemia
sin glucosamina
con glucosamina

C


Caracterización de la presencia de p-GSK-3β tirosina 216 con los diferentes tratamientos a los diferentes tiempos
*
Densidad relativa
1,7
1,6
1,5
1,4
1,3
1,2
1,1
1
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
control
15 min
45 min
90 min
6 horas
tiempo transcurrido después de la isquemia
sin glucosamina
con glucosamina

D




E

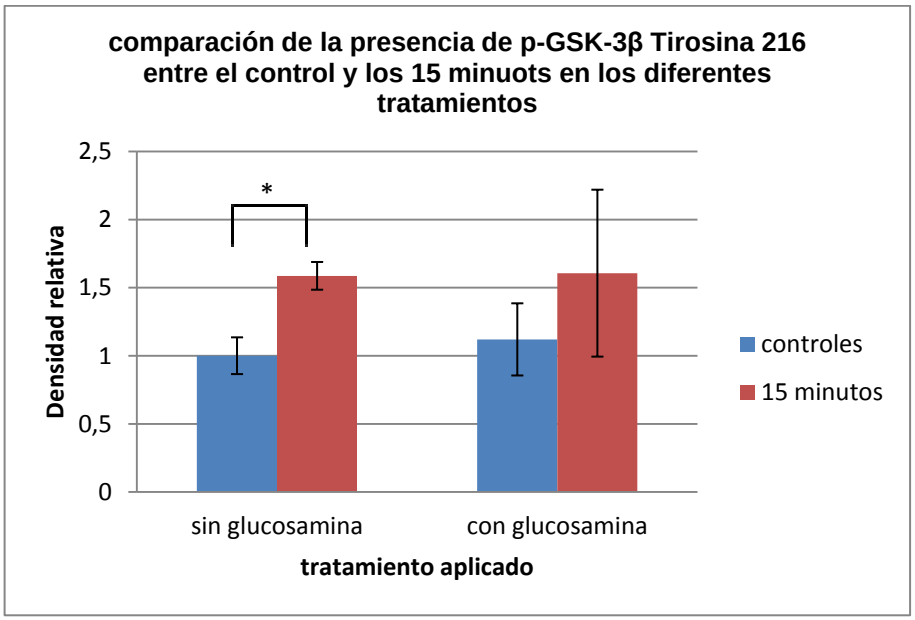



**Figura 3 Caracterización de p-GSK-3β tirosina 216 en la corteza cerebral de ratas sometidas a isquemia, tratadas y no tratadas con glucosamina, evaluadas a diferentes tiempos.** (A) imágenes del inmunoblot de p-GSK-3β tirosina 216 y su control de carga. (B) cuantificación de los resultados obtenidos por densitometría mostrados como promedios de n=4 y gráfica de tendencia a los diferentes tiempos de los diferentes tratamientos. (C) comparación por pares de la presencia de p-GSK-3β tirosina 216 en los diferentes tratamientos a través de los tiempos de interés por la prueba t- student ($p<0,05$) de los promedios +/- error estándar de la media (SEM)), (D) comparación la presencia de p-GSK-3β tirosina 216 entre el tiempo más temprano (15min) y el más tardío (6 hrs) del experimento en los cerebros tratados sin y con glucosamina

respectivamente. (E) comparación por pares de la presencia de p-GSK-3β tirosina 216 entre el control y los 15 minutos después de haber ocurrido la isquemia en los diferentes tratamientos a través por la prueba t- student ($p<0,05$) en los promedios y se reporta +/- error estándar de la media (SEM)).

## 2.6 Discusión

En el área de penumbra en los tejidos cerebrales que han sufrido isquemia, se observa falla energética, desequilibrio iónico, hipoxia, entre otros factores que llevan a que se desencadenen procesos apoptóticos. Las células que pertenecen a esta área se mantienen estables por algunas horas y corresponden al tejido en el que se enfocan los esfuerzos terapéuticos, por ser este el tejido con posibilidad de salvar una vez ocurre la supresión de la irrigación sanguínea al cerebro (Astrup et al., 1981) (Moskowitz et al., 2010). Disminuir la cantidad de tejido muerto o el volumen del infarto cerebral no se correlaciona estrictamente con la mejora de los déficit cognitivos y físicos que quedan después del infarto (Wahl et al., 1992), pero en algunos casos sí lleva a la disminución de las incapacidades ocasionadas, confirmado esto con pruebas comportamentales (Eckmann & Armstead, 2013) (Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke, 1995). Las estrategias para disminuir el infarto cerebral pueden constar, por una parte, de los efectos sobre la vasculatura (restituir el flujo sanguíneo) (Moskowitz et al., 2010) o crear efectos protectores contra las vías de señalización apoptóticas. De esta última estrategia, se ha encontrado que la aplicación de glucosamina fue capaz de disminuir el tamaño del infarto en cerebros de ratas (Hwang et al., 2010). Este resultado de disminución del tamaño del infarto con la aplicación de glucosamina ha sido previamente corroborado en nuestro laboratorio y también la mejora de los resultados en las pruebas comportamentales con glucosamina después de la isquemia las cuales tienden a subir el puntaje en las ratas evaluadas (ver Anexo 6). Algunos de estos efectos se han explicado por la disminución de factores inflamatorios o por el aumento en las modificaciones post-traduccionales tipo (O-GlcNAc) que ayuda a la supervivencia celular cuando la célula se enfrenta a estrés (Zachara et al., 2004) (ver Anexo 5). En este estudio se evalúa si la GSK-3β está implicada en el efecto que tiene la glucosamina sobre las vías de señalización celular durante la isquemia.

GSK-3β es una proteína que se encuentra constitutivamente en las diferentes células del cuerpo, pero de manera importante en el cerebro (Perez-Costas et al., 2010) (Mukai et al., 2002) y está implicada en los procesos de muerte celular (Ortega, 2010), favoreciendo la vía intrínseca de la apoptosis cuando esta activada (Bhat et al., 2000) (Hartigan et al., 2001) y atenuándola cuando está inactiva (Beurel & Jope, 2006) (Maurer et al, 2006) (Zhai P, 2011).

En el presente trabajo se sugiere la implicación de la proteína GSK-3β, y sus modificaciones post-traduccionales conocidas, en el mecanismo por el cual la

glucosamina disminuye el tamaño del infarto cerebral en corteza en un proceso isquémico. Esta sugerencia se realiza gracias a dos evidencias encontradas: 1) la forma inactiva de GSK-3β (p- GSK-3β serina 9) tiende a aumentar en el tratamiento de la isquemia con glucosamina (Figura 2B) y 2) una de las formas en la que GSK-3β mejora su actividad (p- GSK-3β tirosina 216) disminuye en el tratamiento de la isquemia con glucosamina (Figura 3B).

**Caracterización de GSK-3β**

En primera instancia, en este estudio se encontró que la expresión de GSK-3β total es igual en cerebros isquémicos tratados o no con glucosamina, es decir que la transcripción y traducción del gen que codifica para esta proteína probablemente se hace en igual cantidad en las células de la corteza de los cerebros de rata inducidos a isquemia sin discriminar los tratamientos o, visto de otra forma, el tratamiento con glucosamina no influye en la expresión de GSK- 3β (ver Anexo 2 y Figura 1C).

Con el ANOVA se determinó que no hay diferencias de la expresión de GSK-3β a los diferentes tiempos de transcurrida la isquemia al tomarlo sin discriminar tratamiento, pero cuando se analizaron por pares dentro de cada tratamiento se pudo observar que hay diferencias significativas entre los tiempos 15 minutos y 6 horas en los cerebros con isquemia y sin tratamiento y no en los cerebros con isquemia y con tratamiento (ver Figura 1D). Esto podría encontrarse porque a medida que más avanza el tiempo después de una isquemia sin reperfusión hay más muerte del tejido cerebral y por ende muerte celular (Moskowitz et al., 2010). Esto puede explicar porque hay siempre menos densidad relativa en la expresión de la proteína GSK-3β y en sus modificaciones post-traduccionales a las 6 horas.

Se puede decir, entonces, que aunque no hay diferencia entre los tratamientos en la expresión de GSK-3β, pueden ser sus modificaciones post-traduccionales, una vez expresada la proteína, las que son importantes para entender los procesos isquémicos y el efecto protector de la glucosamina.

**Caracterización de p-GSK-3β serina 9.**

Al mirar una de las modificaciones post-traduccionales, la fosforilación en la serina 9, que inhibe la función quinasa de la proteína, se encontró que en el ANOVA no hay diferencias significativas en la presencia de la modificación p-GSK-3β serina 9 entre los diferentes tratamiento sin tener en cuenta los tiempos evaluados (ver Anexo 3), pero si estos se analizan por pares a través de los diferentes tiempos se encontró que hay efecto del tratamiento a las seis horas (ver Figura 2C).

En este último tiempo se pudo evidenciar que con el tratamiento con glucosamina la presencia de la forma inhibida de GSK-3β es significativamente mayor que cuando no se ha aplicado glucosamina, y en general existe una tendencia a que

así sea en los demás tiempos (exceptuando 45 minutos) aunque no sea significativa (ver Figura 2B).

Este resultado puede explicar uno de los mecanismos por los cuales la glucosamina disminuye el volumen del infarto cerebral implicando a GSK-3β, pues al aumentar su inhibición impide que GSK-3β pueda activar a Bax por fosforilación y propiciar su translocación a la membrana mitocondria para formar el poro en la membrana mitocondrial (Linseman et al., 2004), promover la expresión de la proteína Bim, la actividad de las caspasa-3 y 9 (Hongisto et al., 2003), el factor de transcripción p53 (Tan et al., 2005) disminuir el umbral de apertura del mPTP y favorecer la unión de a ANT con CypD y con VDCA (Zhai P, 2011), fosforilar a MCL-1 y a HSF- 1 (Maurer et al, 2006) (Miura & Miki, 2009), e inhibir al factor de transcripción CREB. En resumen, inhibir a GSK-3β significa aumentar la protección contra la apoptosis desarrollada por la vía intrínseca.

Para dilucidar cómo sucede esta inhibición por la glucosamina se podría plantear que esta activa las vías por las cuales GSK-3β es inhibida, o desactiva las vías por las cuales GSK-3β es desfosforilada en serina 9, o ambas, o también plantear que la fosforilación en esa serina es promovida por una sinergia con la O-GlcNación en otros residuos de esta proteína.

Para empezar se ha encontrado que el aumento de la O-GlcNación aumenta la modificación post-traduccional p- GSK-3β serina 9 en situaciones de estrés lo que lleva a supervivencia celular (Kazemi et al., 2010) Esta O-GlcNación que se presume aumentada en este caso, además del estrés celular de los fenómenos isquémicos, también por la glucosamina (ver Anexo 5) puede llevar a que aumente la fosforilación de Akt o de otras quinasas de GSK-3β, por una sinergia en algún residuo haciéndolas más activas para fosforilar e inhibir a GSK-3β. Para este caso se propone una sinergia en otro residuo debido a que se ha comprobado que la O-GlcNación en el mismo residuo en el que Akt se fosforila lleva a una disminución de su actividad quinasa (Kang & Han, 2008). Esta posibilidad puede ser una de las menos opcionadas para plantear el mecanismo ya que se ha encontrado previamente en nuestro laboratorio que la glucosamina disminuye la expresión de la proteína Akt fosforilada (Mosquera, 2013).

En el caso de la desfosforliación de GSK-3β en serina 9, se podría plantear una competencia entre fosforilación y O-GlcNación. La quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk 5) cuando se fosforila en su serina 159 se activa (Zhang et al., 2014) y activa la proteín fosfatasa 1 (PP1) por fosforilación y esta a su vez desfosforila a p- GSK-3β serina 9 activándola. Se ha comprobado que la O-GlcNación no permite que se fosforile las Cdks entre esas la 5 (Zeidan & Hart, 2010) por lo que no contribuye con su activación ni con la de GSK-3β al no promover que se desfosforile.

Por último, para el caso de la sinergia de la fosforilación en serina 9 y la O-GlcNación, a pesar de no tener evidencia de la O-GlcNación en GSK-3 β, es una posibilidad que no se descarta.

Respecto a la caracterización por tiempos, se encontró con el ANOVA que existen diferencias en la presencia de esta modificación post- traduccional entre los diferentes tiempos de ocurrida la isquemia sin discriminar tratamiento (ver Anexo 4). El tiempo que presenta la mayor cantidad relativa de p-GSK-3β serina 9 es a los 15 minutos de ocurrida la isquemia, donde se presume que existe un aumento en la glicosilación en los cerebros tratados con glucosamina (ver Anexo 5), y esta cantidad es significativamente diferente de la expresada a las 6 horas de ocurrida la isquemia (ver Figura 2D), por lo que se puede pensar que esta modificación post-traduccional específicamente, se lleva a cabo a los primeros minutos de ocurrida la isquemia y continua así hasta los 90 minutos, bajando dramáticamente a las 6 horas (ver Figura 2B). Haciendo una ampliación más específica de este resultado en cada uno de los tratamientos comparándo lo ocurrido a los 15 minutos contra las 6 horas (ver Figura 2D) la diferencia significativa de la presencia en el tiempo se encuentra en el tratamiento sin glucosamina, pero no sucede lo mismo cuando se aplica la glucosamina.

En resumen, después de la isquemia, la presencia de p-GSK-3β serina 9 se incrementa hasta los 15 minutos y se intenta mantener en el tiempo pero a las seis horas disminuye significativamente. Lo que logra el tratamiento con glucosamina es que la disminución de esta modificación post-traduccional a las seis horas no sea significativa. Se puede decir entonces que la presencia de p-GSK-3β serina 9 tiende a ser mayor en el tratamiento con glucosamina, resaltándose significativamente a las seis horas, explicando una de las formas por las cuales la glucosamina tiene un efecto neuroprotector que se mantiene después de algunas horas.

**Caracterización de p-GSK-3β tirosina 216.**

Por otra parte se intentó caracterizar otra modificación post-traduccional de GSK-3β que ayuda a mejorar la actividad quinasa, esta consiste en la fosforilación en su tirosina 216. En cuanto a los tiempos en los que se estudió esta modificación post-traduccional, el ANOVA reporta que no hay diferencias entre ellos sin discriminar tratamiento (ver Anexo 4) y es también lo que se observa al hacer la comparación por pares entre el tiempo más tardío y más temprano dentro de cada uno de los tratamientos. Es decir que el aumento de esta modificación post-traduccional, aunque se observa a los 15 minutos (ver figura 3E), se mantiene en el tiempo hasta las seis horas, aunque tienda a mermar de manera no significativa.

Pero en cuanto al tratamiento, lo que se halló en el ANOVA para esta modificación es que sí existen diferencias en la presencia de esta modificación post-

traduccional entre los tratamientos sin glucosamina y con glucosamina. Las muestras que no fueron tratadas con glucosamina presentaban mayor cantidad relativa de p-GSK-3β tirosina 216 frente a las que fueron tratadas con glucosamina, sin discriminar entre tiempos. Analizando los tratamientos por pares a los diferentes tiempos se encontró que existe una diferencia significativa a los 15 minutos con el patrón descrito anteriormente (ver Figura 3C), tiempo en el que se observa un aumento no significativo de la glicosilación en las proteínas (Ver Anexo 5). Esta tendencia se mantiene en los demás tiempos.

Con este resultado también se puede explicar la implicación de GSK-3β en uno de los mecanismos por los cuales la glucosamina disminuye el tamaño del infarto cerebral, actuando como una molécula neuroprotectora. La explicación de esta afirmación se basa en que si la fosforilación en 216 mejora la actividad de la quinasa GSK-3β, esta podría realizar todas las acciones que se suponen impedidas cuando se encuentra en su forma inactiva (p- GSK-3β serina 9) que se mencionaron anteriormente y además otras como la hiperfosforilación de Tau (Hartigan & Johnson, 1999) y la fosforilación de la β–catenina (Thirunavukkarasy et al., 2008).

El mecanismo por el cual se podría plantear la forma en que sucede esta disminución en la expresión de p- GSK-3β tirosina 216 en isquemia con tratamiento con glucosamina, suponiendo que la proteína es capaz de autofosforilarse en este residuo es que cuando las células son tratadas con glucosamina, la O-GlcNación compite con la fosforilación en este residuo o inhibe esta fosforilación en otro residuo, residuo en el cual podría hacerse la sinergia para que se promueva la fosforilación en serina 9.

También para la p- GSK-3β tirosina 216 se ha demostrado desfosforliación en este residuo (Hughes et al., 1993) y se ha planteado que una de las proteínas implicadas puede ser la PKC que al activarse reduce los niveles de fosforilación en la tirosina 216 de GSK-3β (Murai et al., 1996). Al ser una de estas proteínas también una de las que inactiva a GSK-3β por fosforilación en serina 9, se plantearía lo mismo que para este tipo de quinasas como la PKA o Akt, que consiste en que la O-GlcNación active por sinergia a estas quinasas, causantes de una manera u otra de la disminución en la actividad quinasa de Akt.

Se puede resumir que la presencia de p-GSK-3β tirosina 216 tiende a ser menor en el tratamiento con glucosamina frente al tratamiento sin glucosamina, resaltándose significativamente a los 15 minutos (ver Figuras 3CY 3E), explicando de esta manera uno de los factores por las cuales la glucosamina tiene un efecto neuroprotector en el que está implicada GSK-3β. Esta modificación post-traduccional que se alza a los 15 minutos, aunque tienda a disminuir a medida que pasa el tiempo, se mantiene en el tiempo hasta las seis horas.

## 2.7 Conclusiones

- La proteína GSK-3β puede estar implicada en los procesos de neuroprotección que la glucosamina ejerce en condiciones de isquemia cerebral.

- La modificación post-traduccional que inhibe a GSK-3β, p-GSK-3β serina 9, se encuentra aumentada a los 15 minutos de causada la isquemia cerebral y es superior en el tratamiento con glucosamina a las 6 horas

- La presencia de la modificación post-traduccional que mejora la actividad de GSK-3β, p-GSK-3β tirosina 216, es menor en el tratamiento con glucosamina de forma significativa a los 15 minutos pero esto es una tendencia que se mantiene en el tiempo hasta las seis horas.

## 2.8 Recomendaciones

- Se sugiere que para aclarar mejor los mecanismos por los cuales la glucosamina incluye en sus procesos de neuroprotección a GSK-3β, se realice esta misma caracterización con estos tiempos y estas condiciones a la proteína Akt.

- Se aconseja realizar inmunoprecipitaciones a la proteína GSK-3β para poder afirmar con seguridad que el tratamiento con glucosamina causó glicosilación en esta proteína particularmente

- Se recomienda realizar alguna práctica de inmuno-histoquímica para lograr caracterizar mejor la expresión y distribución de GSK-3β en el cerebro isquémico y ver las células implicadas ( Células gliales y neuronas)

# 3 REFERENCIAS


Astrup, J., et al. (1981). Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *American Stroke Association* , 723-725.

Alonso, A. (2009). Mecanismo de la degeneración inducida por la proteína tau en la enfermedad de Alzheimer y taupatías relacionadas. *revistaalzheimer*, 42-31.

Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD (1996). Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke, 27,* 1616 - 1623.

Beurel, E., & Jope, R. S. (2006). The Paradoxical Pro- and Anti-apoptotic Actions of GSK3 in the Intrinsic and Extrinsic Apoptosis Signaling Pathways. National Institute of Health , 173–189.

Bhat,R.V., et al. (2000).Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3b in cellular and animal models of neuronal degeneration. PNAS , 11074–11079.

Bhuiyan, M. I., Jung, S. Y., Kim, H. J., Lee, Y. S., & Jin, C. (2011). Major Role of the PI3K/Akt Pathway in Ischemic Tolerance Induced by Sublethal Oxygen-Glucose Deprivation in Cortical Neurons In Vitro. *Arch Pharm Vol 34* , 1023-1034.

Bijur,G.N., et al. (2000). Glycogen Synthase Kinase-3b Facilitates Staurosporine- and Heat Shock-induced Apoptosis: PROTECTION BY LITHIUM. Journal Biological Chemistry , 7583-7590.

Bouet, V., & Boulouard, M. (2009). The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice. *NATURE PROTOCOLS Vol.4 N°10* , 1560-1564.

Cohen, P., & Frame, S. (2001). The renaissance of GSK3. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, *2*, 769–776.

Cole, A., & Frame, S. (2004). Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. Biochem , 249–255.

Chuang, D. -M., & Wang, Z. (2011). GSK-3 as a target for lithium-induced neuroprotection against excitotoxicity in neuronal cultures and animal models of ischemic stroke. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 1-12.

Dajani, R., et al. (2001). Crystal Structure of Glycogen Synthase Kinase 3: Structural Basis for Phosphate-Primed Substrate Specificity and Autoinhibition. Cell , 721–732.

Delcommenne, M., & Tan, C. (1998). Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase ByAKT by the integrin-linked kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 11211–11216.

Doble, B. W., & Woodgett, J. R. (2003). GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. Cell Science , 1175-1186.

Eckmann, D. M., & Armstead, S. C. (2013). Surfactant reduction of cerebral infarct size and behavioral deficit in a rat model of cerebrovascular arterial gas embolism. *Journal of Applied Physiology* , 868-876.

Embi, N., Rylatt, D. B., & Cohen, P. (1980). Glycogen Synthase Kinase-3 from Rabbit Skeletal Muscle. Eur J Biochein , 519-527.

Gandy, J., & Rountree, A. (2006). Akt1 is dynamically modified with O-GlcNAc following treatments with PUGNAc and insulin-like growth factor-1. *FEBS Lett.*, 3051–3058.

Gidday, J. M., et al (2006). Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nat Rev Neurosci*, *7*, 437–448.

Giese, K. P. (2009). GSK-3: A Key Player in Neurodegeneration and Memory. *IUBMB Life, 61(5): Centre for the Cellular Basis of Behaviour* , 516-521.

Giménez, A., Lim, F., & Díaz, J. (2012). Chronic inhibition of glycogen synthase kinase-3 protects against rotenone-induced cell death in human neuron-like cells by increasing BDNF secretion. *Neuroscience Letters* , 182–187.

Ginsberg, M. D. (2009). Neuroprotection for ischemis stroke: past, present and future. *Neuropharmacology*, *55*(3), 363–389.

Hartigan, J. A., & Johnson, G. V. (1999). Transient Increases in Intracellular Calcium Result in Prolonged Site-selective Increases in Tau Phosphorylation through a Glycogen Synthase Kinase 3β-dependent Pathway. Journal of Biological Chemistry , 21395-21401.

Hartigan, J., et al. (2001). Glycogen synthase kinase 3beta is tyrosine phosphorylated by PYK2. Biochemical and Biophysical Research Communications , 485–489.

Hongisto, V., et al. (2003). Lithium Blocks the c-Jun Stress Response and Protects Neurons via Its Action on Glycogen Synthase Kinase 3. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY , 6027–6036.

Hughes, K., et al. (1993). Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. The EMBO Journal , 803-808.

Hwang, S.-Y., & Shin, J.-H. (2010). Glucosamine exerts a neuroprotective effect via suppression of inflammation in rat brain ischemia/reperfusion injury. *Glia*, 1-7.

Igual, J. I. (2003). *Muerte celular mediante la reperfusión miocárdica. Mecanismos y nuevas dianas terapeúticas.* Barcelona: Universitat Autónoma de Barcelona.

Jope, R. S., & Johnson, G. V. (2004). The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. ELSEVIER , 95-102.

Kaidanovich, O., & Woodgett, J. (2011). GSK-3: functional insights from cell biology and animal models. Frontiers in Molecular Neuroscience , 2-25.

Kang, E., & Han, D. (2008). O-GlcNAc modulation at Akt1 Ser473 correlates with apoptosis of murine pancreatic beta cells. *Exp Cell Res.*, 2238-2248.

Karp, G. (2009). *Biología celular y molecular, Conceptos y Experimentos, Quinta edición .* México : McGrRAW-HILL

Kim, L., et al. (1999). The Novel Tyrosine Kinase ZAK1 Activates GSK3 to Direct Cell Fate Specification. Cell , 399–408.

Lesort, M., et al. (1999). Insulin Transiently Increases Tau Phosphorylation: Involvement of Glycogen Synthase Kinase-3b and Fyn Tyrosine Kinase. Journal of Neurochemistry , 576-584.

Linseman, D. A., et al. (2004). Glycogen Synthase Kinase-3 Phosphorylates Bax and Promotes Its Mitochondrial Localization during neuronal apoptosis. The Journal of Neuroscience , 9993–10002.

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

Mahesh Thirunaukkarasu., et al. (2008). ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING , 1475-1484.

Maurer, U., et al. (2006). Glycogen Synthase Kinase-3 Regulates Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization and Apoptosis by Destabilization of MCL-1. Molecular Cell , 749–760

Morfini, G., et al. (2004). A novel CDK5-dependent pathway for regulating GSK3 activity and kinesin-driven motility in neurons. *The EMBO* , 2235–2245.

Mosquera, L.*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.* Trabajo de grado para optar al titulo de pregrado de Química Farmacéutica.Cali:Universidad Icesi. Departamento de ciencias naturales. (2013).

Mukai, F., et al. (2002). Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3b. Journal of Neurochemistry , 1073–1083.

Murai, H., et al. (1996). Tyrosine dephosphorylation of glycogen synthase kinase-3 is involved in its extracellular signal-dependent inactivation. *Federation of European Biochemical Societies* , 153-160.

Nishihara, M., Miura, T., Miki, T., Tanno, M., Yano, T., Naitoh, K., Shimamoto, K. (2007). Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3βeta-mediated myocardial protection. *Journal of molecular and cellular cardiology*, *43*(5), 564–70. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.08.010

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

Omar, M. A., Wang, L., & Clanachan, A. S. (2010). Cardioprotection by GSK-3 inhibition: role of enhanced glycogen synthesis and attenuation of calcium overload. *Cardiovascular Research, European Society of Cardiology* , 478–486.

Ortega, F. (2010). *GSK3 y MAP quinasas como diana de los receptores de nucleótidos en neuronasgranulares de cerebelo: papel en la supervivencia neuronal.* Madrid: Universidad Complutense de Madrid.

Park, H. S., Cho, S. o., & Kim, C. K. (2002). Heat Shock Protein Hsp72 Is a Negative Regulator of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 7721–7730.

Perez-Costas, E., et al. (2010). Light and Electron Microscopy Study of Glycogen Synthase Kinase-3b in the Mouse Brain. PLoS ONE vol 5 , 1-10.

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

Rao, R., & Hao, C.-M. (2004). Hypertonic Stress Activates Glycogen Synthase Kinase 3 b-mediated Apoptosis of Renal Medullary Interstitial Cells Suppressing an

NFkB-driven Cyclooxygenase-2-dependent Survival Pathway. Journal of Biological Chemistry , 3949-3955.

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

Roh, M.-S., et al. (2005). Hypoxia Activates Glycogen Synthase Kinase-3 in Mouse Brain In Vivo: Protection by Mood Stabilizers and Imipramine. BIOL PSYCHIATRY , 278–286.

Rojo, A., et al. (2008). Functional interference between glycogen synthase kinase-3 beta and the transcription factor Nrf2 in protection against kainate-induced hippocampal cell death. Molecular and cellular neurosciences , 125-132.

Sasaki, C., Hayashi, T., Zhang, W. R., Warita, H., Manabe, Y., Sakai, K., & Abe, K. (2001). Different expression of glycogen synthase kinase-3b between young and old rat brains after transient middle cerebral artery occlusion. *Neurol. Res.*, *23*, 588–592.

Schallert, T., Fleming, S., Leasure, J., Tillerson, J., & Bland, S. (2000). CNS plasticity and assessment of forelimb sensimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism, and spinal cord injury. *Neuropharmacology* , 777-787.

Shi, J., Wu, S., & Dai, C.-l. (2012). Diverse Regulation of AKT and GSK-3β by O-GlcNAcylation in Various Types of Cells. *FEBS Lett.*, 2443–2450.

Shin, S., et al. (2004). Hydrogen peroxide negatively modulates Wnt signaling through downregulation of beta-catenin. Cancer Letters , 225-231.

Smith, W. S., Johnston, S. C., & Easton, J. D. (2005). Cerebrovascular Diseases. In D. L. Kasper, E. Braunwald, A. S. Fauci, S. L. Hauser, D. L. Longo, & J. L. Jameson (Eds.), *HARRISON´S PRINCIPLES of Internal Medicine* (16th ed., pp. 2372–2392). New York: McGraw Hill.

Stambolic, V., et al. (1996). Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics Wingless signalling in intact cells. *Current Biology* , 1664–1668.

Tan, J., et al. (2005). Pharmacologic Modulation of Glycogen Synthase Kinase-3b Promotes p53-Dependent Apoptosis through a Direct Bax-Mediated Mitochondrial Pathway in Colorectal Cancer Cells. Cancer Research , 9012-9020.

Tong, H., Imahashi, K., Steenbergen, C., & Murphy, E. (2002). Phosphorylation of Glycogen Synthase Kinase-3β During Preconditioning Through a Phosphatidylinositol-3-Kinase -Dependent Pathway Is Cardioprotective. *Circulation Research* , 377-379.

Torregrosa, G., Salom, J., Jover-Mengual, T., & Alborch, E. (2007). *Fisiopatología básica: De la oclusión arterial a la muerte neuronal 1ª Edición. .* Barcelona: Marge Medica Books; 13-31.

Wang, Z., Pandey, A., & Har, G. W. (2007). N-Acetylglucosaminylation and glycogen synthase kinase-3-dependent. *Molecular & Cellular Proteomics 6.8*, 1365-1377.

Wahl, F., et al. (1992). Neurological and Behavioral Outcomes of Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Stroke* , 267-272.

Whishaw, I. Q., & Kolb, B. (2005). *The behavior of the laboratory rat: a Handbook with test.* New York: Oxford University Press.

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

World Health Organization,WHO (2014). The 10 leading causes of death in the world, 2000 and 2012. Media Center.

Yu, Y., Zhang, L., & Li, X. (2012). Differential Effects of an O-GlcNAcase Inhibitor on Tau Phosphorylation. *PLoS ONE*, e35277.

Zachara, N. E. (2004). Dynamic O-GlcNAc Modification of Nucleocytoplasmic Proteins in. *The Journal Of Biological Chemistry*, 30133–30142

Zachara, N. E., Kazemi, Z., & Chang, H. (2010). O-Linked β-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) Regulates Stress-induced Heat Shock Protein Expression in a GSK-3β-dependent Manner. *The Journal of Biological Chemistry* , 39096–39107.

Zeidan, Q., & Hart, G. W. (2010). The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. *Cell Science* , 13-22.

Zhai, P., Sciarretta, S., Galeotti, J., Volpe, M., & Sadoshima, J. (2011). Differential roles of GSK-3βeta during myocardial ischemia and ischemia/reperfusion. *Circ Res*, *109*, 502–511.

Zhang, X., et al., (2014). ERK MAP Kinase Activation in Spinal Cord Regulates Phosphorylation of Cdk5 at Serine 159 and Contributes to Peripheral Inflammation Induced Pain/ Hypersensitivity. *PLOS ONE* , 1-11

# 4 ANEXOS

## 4.1 Anexo 1. Cálculos efectuados

**Cálculo para hallar las concentraciones de proteína a partir de la curva de calibración.**

Muestra del cálculo con grupo A de corteza:

$$y = Ax + B$$

$y$ = 0,0539$x$ + 0,0091

Donde

y: absorbancia

x: concentración

A: pendiente

B: intercepto

$x = \frac{y-B}{A}$ $x = \frac{\text{y}-0{,}0091\text{nm}}{\frac{0{,}0539\text{nm}}{\text{ug/mL}}}$

Para el grupo A, la concentración se halla así:

$x = \frac{\text{y}-0{,}0091\text{nm}}{\frac{0{,}0539\text{nm}}{\text{ug/mL}}}$ $x = \frac{0{,}194\text{nm}-0{,}0091\text{nm}}{\frac{0{,}0539\text{nm}}{\text{ug/mL}}} =$

$3{,}430\ \text{ug/mL}$

Para hallar la concentración teniendo en cuenta la dilución se realiza:

$$\frac{3{,}430\frac{\text{ug}}{\text{mL}}}{\frac{1}{2000}} = 6860\frac{\text{ug}}{\text{mL}}$$

---

**Muestra del cálculo con grupo A de corteza para hallar la cantidad a servir:**

$$\frac{30\mu\text{g de proteína a servir}}{6860\frac{\text{ug}}{\text{mL}}\ \text{muestra}} = 0.00437\text{mL muestra x}\frac{1000\mu L}{1mL} = 4{,}37\mu L\ de\ muestra$$

$$10\mu L\ de\ buffer + 4{,}37\mu L\ de\ muestra = 14{,}37\mu L$$

$$20\mu L\ de\ solucion\ a\ servir - 14{,}37\mu L = 5.63\ \mu L\ de\ agua$$

**Tabla 10: cálculos para hallar el volumen de muestra a servir en cada pozo con 30ug de proteína**

| Volumen de muestra µL | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **CORTEZA** | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N |
| **concentración ug/ml** | 6861 | 7566 | 8308 | 8048 | 14505 | 9718 | 7677 | 9124 | 8642 | 9866 | 7788 | 7640 | 13354 | 9384 |
| **cantidad ug** | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |
| **volumen ml (cantidad/concentración)** | 0,00437 | 0,00397 | 0,00361 | 0,00373 | 0,00207 | 0,00309 | 0,00391 | 0,00329 | 0,00347 | 0,00304 | 0,00385 | 0,00393 | 0,00225 | 0,00320 |
| **volumen ul muestra** | 4,37 | 3,97 | 3,61 | 3,73 | 2,07 | 3,09 | 3,91 | 3,29 | 3,47 | 3,04 | 3,85 | 3,93 | 2,25 | 3,20 |

**Muestra del cálculo para la realización de la prueba t de dos colas:**

Hipótesis:

$$H_0 : (\mu_1 - \mu_2) = 0$$
$$H_1 : (\mu_1 - \mu_2) > 0$$
$$H_1 : (\mu_1 - \mu_2) < 0$$

$$t = \frac{(x_1 - x_2) - 0}{\sqrt{s_p^2\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} \quad \text{donde} \quad s_p^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

Región de rechazo: $| t | > t_{\alpha/2}$

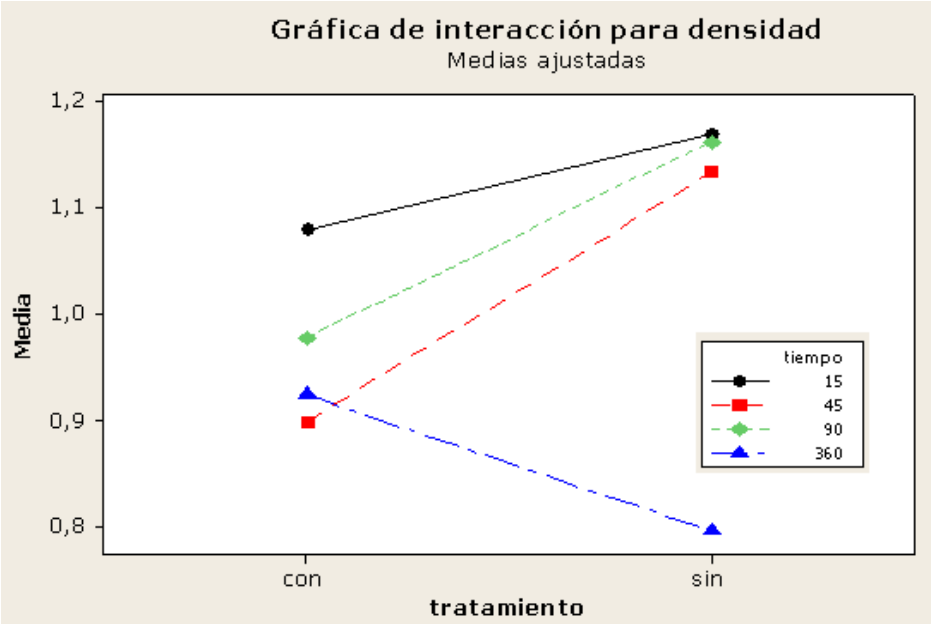
Error estandar de la media: $S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$

**Ilustración 2: Prueba t - student de dos colas**

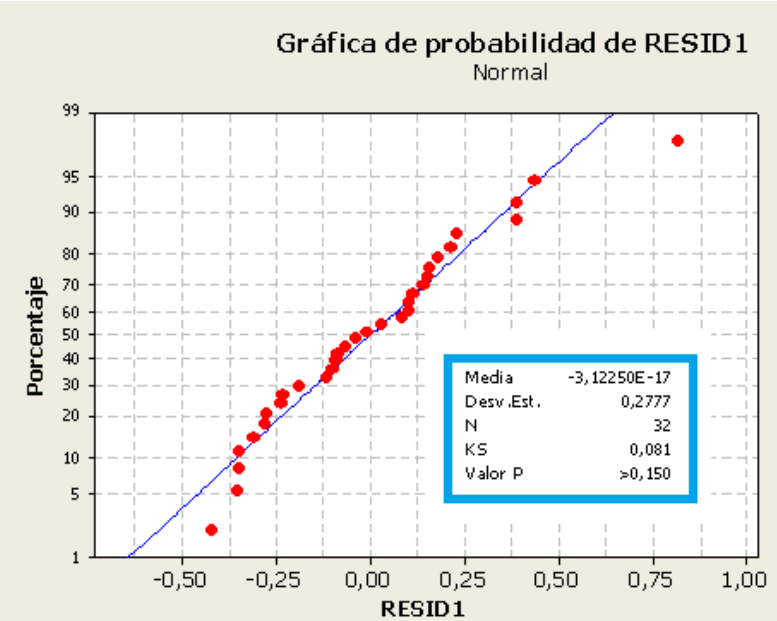
μ: Media de los grupos evaluados (ya sea 1 o 2)
*S:* Desviación estándar
$S_p^2$: Varianza
*n:* Es la muestra, en este caso 4
α/2: Significancia sobre 2 que en este caso es igual al valor p de 0,05
$S_{\bar{x}}$: Error estándar de la media

## 4.2 Anexo 2. ANOVA para expresión de GSK-3β total

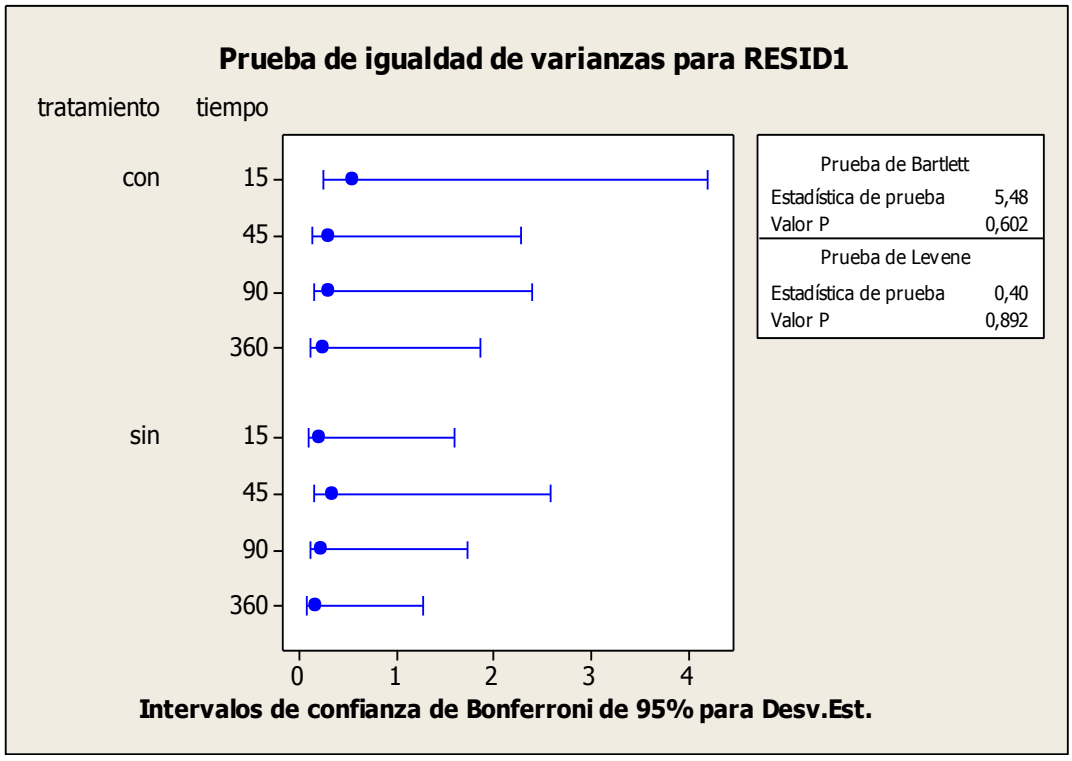
**Gráfica 2: Interacciones entre tratamientos y tiempos en GSK-3β total**



**Gráfica 3: Comprobación del comportamiento normal de los residuos en GSK-3β total**




**Gráfica 4: Comprobación del comportamiento normal de las varianzas en GSK-3β total**



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

```
Factor       Tipo  Niveles  Valores
tratamiento  fijo        2  con. sin
tiempo       fijo        4  15. 45. 90. 360

Análisis de varianza para densidad, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente              GL  SC Sec.  SC Ajust.  MC Ajust.     F      P
tratamiento          1  0,07199    0,07199    0,07199  0,72  0,404
tiempo               3  0,31234    0,31234    0,10411  1,05  0,391
tratamiento*tiempo   3  0,15507    0,15507    0,05169  0,52  0,673
Error               24  2,39060    2,39060    0,09961
Total               31  2,93000

S = 0,315608   R-cuad. = 18,41%   R-cuad.(ajustado) = 0,00%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95,0%

tratamiento   N   Media  Agrupación
sin          16  1,0652  A
con          16  0,9703  A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95,0%

tiempo  N   Media  Agrupación
 15     8  1,1245  A
 90     8  1,0701  A
 45     8  1,0164  A
360     8  0,8599  A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95,0%

tratamiento  tiempo  N   Media  Agrupación
sin           15     4  1,1692  A
sin           90     4  1,1624  A
sin           45     4  1,1335  A
con           15     4  1,0797  A
con           90     4  0,9778  A
con          360     4  0,9244  A
con           45     4  0,8994  A
sin          360     4  0,7955  A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.
```

**Tabla 11: Pruebas t- student (p<0,05) para gráfica 1C.**

| Pares comparados | Resultado prueba t |
|---|---|
| **F (sin*) vs E (con) controles** | 0,856 |
| **L (sin) vs K (con) 15 minutos** | 0,773 |

| | |
|---|---|
| **H (sin) vs G (con) 45 minutos** | 0,321 |
| **J (sin) vs I (con) 45 minutos** | 0,380 |
| **A (sin) vs C (con) 45 minutos** | 0,419 |

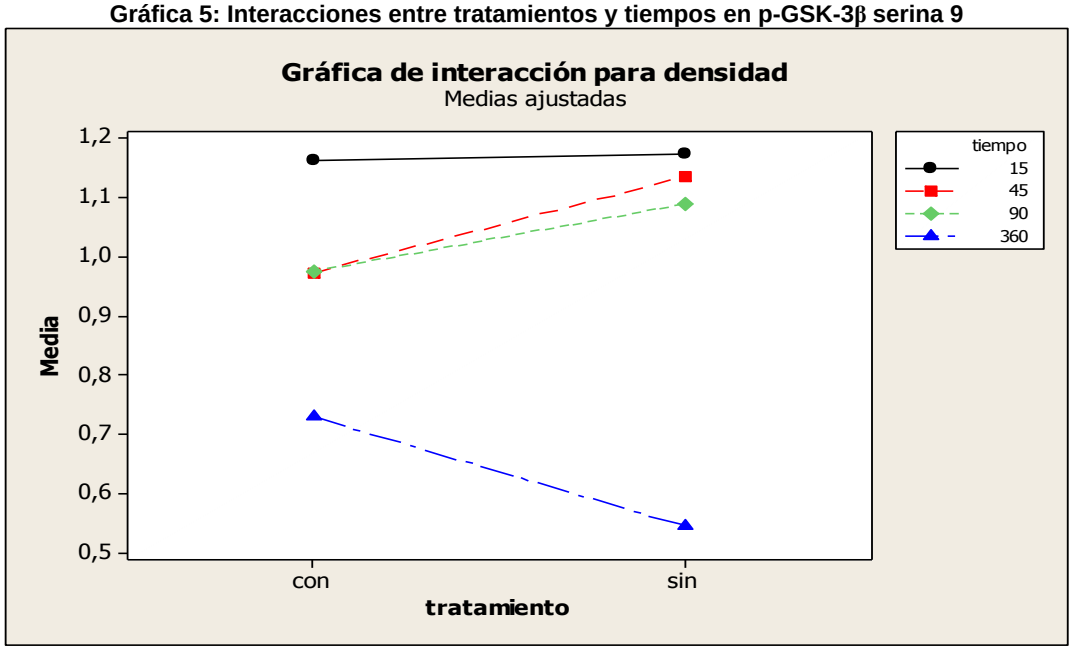
***** Sin: sin tratamiento con glucosamina; Con: con tratamiento con glucosamina

**Tabla 12: Pruebas t- student (p<0,05) para gráfica 1D**

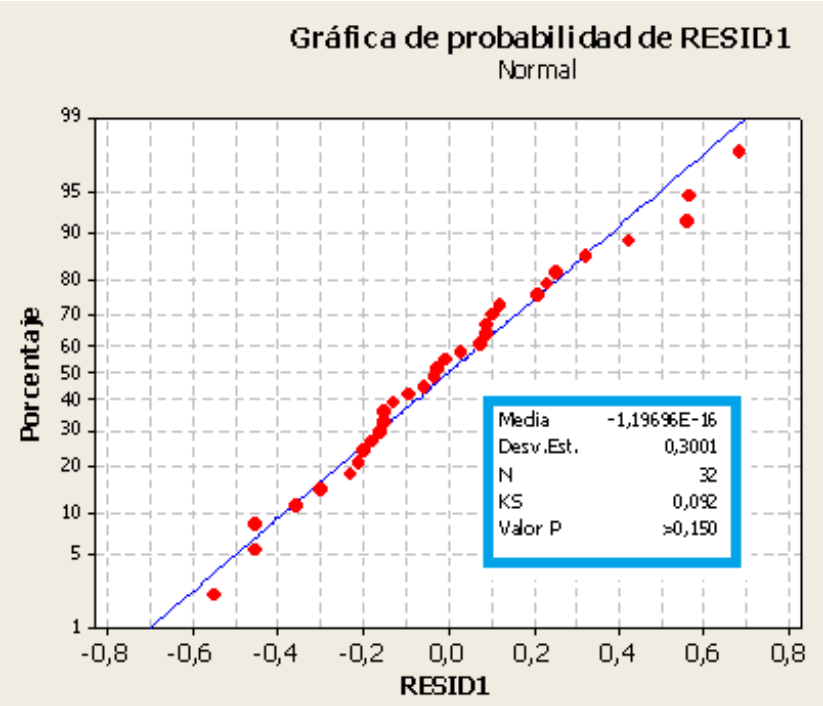
| Condiciones | Pares comparados | Resultado prueba t |
|---|---|---|
| **Sin tratamiento con glucosamina** | **L (15 min) vs A (6 horas)** | 0,032 |
| **Con tratamiento con glucosamina** | **K(15 min) vs C (6 horas)** | 0,626 |

## 4.3 Anexo 3. ANOVA para expresión de p-GSK-3β serina 9

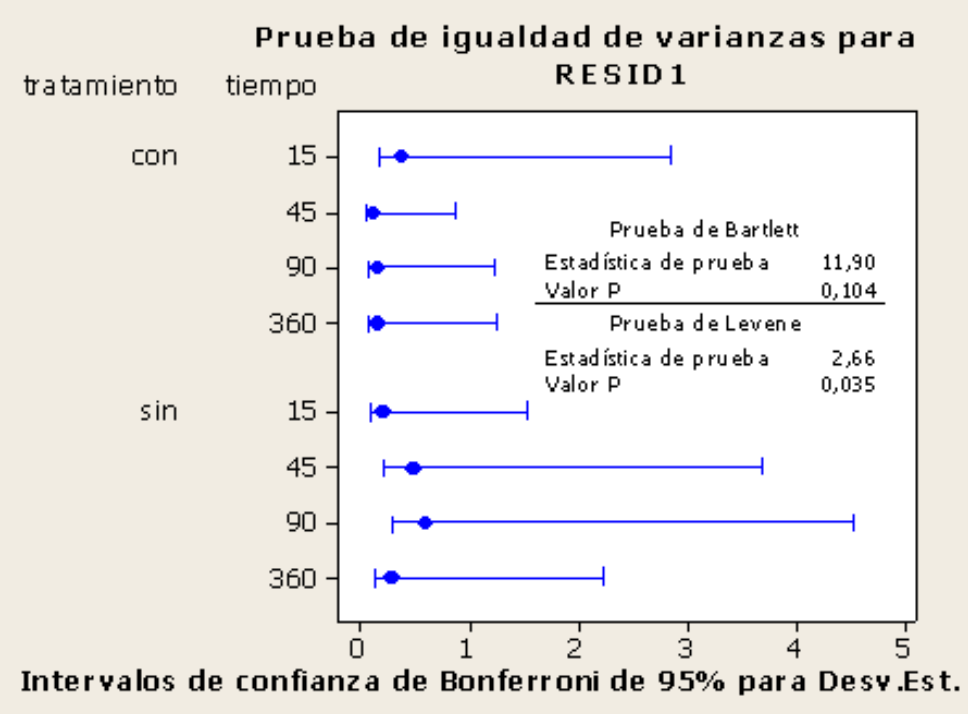
**Gráfica 5: Interacciones entre tratamientos y tiempos en p-GSK-3β serina 9**



**Gráfica 6: Comprobación del comportamiento normal de los residuos en p-GSK-3β serina 9**




**Gráfica 7: Comprobación del comportamiento normal de las varianzas en p-GSK-3β serina 9**



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

```
Factor       Tipo  Niveles  Valores
tratamiento  fijo        2  con. sin
tiempo       fijo        4  15. 45. 90. 360

Análisis de varianza para densidad, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente              GL  SC Sec.  SC Ajust.  MC Ajust.     F      P
tratamiento          1   0,0054     0,0054     0,0054  0,05  0,831
tiempo               3   1,2907     1,2907     0,4302  3,70  0,026
tratamiento*tiempo   3   0,1417     0,1417     0,0472  0,41  0,750
Error               24   2,7926     2,7926     0,1164
Total               31   4,2305


S = 0,341116   R-cuad. = 33,99%   R-cuad.(ajustado) = 14,73%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95,0%

tratamiento   N   Media  Agrupación
sin          16  0,9859  A
con          16  0,9599  A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95,0%

tiempo  N   Media  Agrupación
 15     8  1,1680  A
 45     8  1,0544  A B
 90     8  1,0327  A B
360     8  0,6366    B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.


Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95,0%

tratamiento  tiempo  N   Media  Agrupación
sin           15     4  1,1736  A
con           15     4  1,1623  A
sin           45     4  1,1355  A
sin           90     4  1,0899  A
con           90     4  0,9754  A
con           45     4  0,9732  A
con          360     4  0,7288  A
sin          360     4  0,5445  A
```

**Tabla 13: Pruebas t- student (p<0,05) para gráfica 2C.**

| Pares comparados | Resultado prueba t |
|---|---|
| **F (sin*) vs E (con) controles** | 0,807 |
| **L (sin) vs K (con)** | 0,749 |

| | |
|---|---|
| **15 minutos** | |
| **H (sin) vs G (con) 45 minutos** | 0,842 |
| **J (sin) vs I (con) 45 minutos** | 0,956 |
| **A (sin) vs C (con) 45 minutos** | 0,017 |

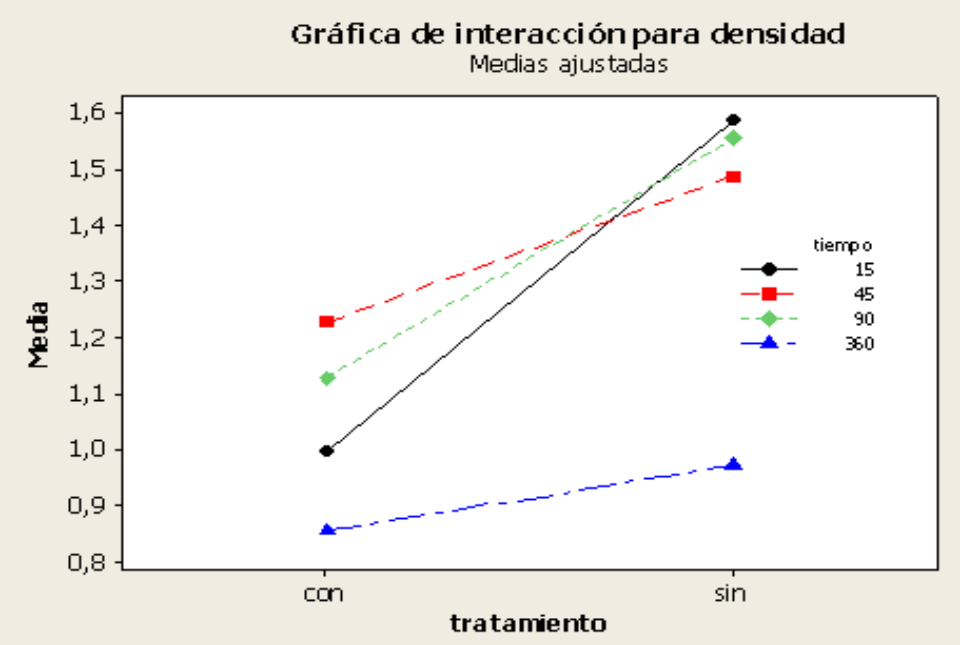
***** Sin: sin tratamiento con glucosamina; Con: con tratamiento con **glucosamina**

**Tabla 14: Pruebas t- student (p<0,05) para gráfica 2D**

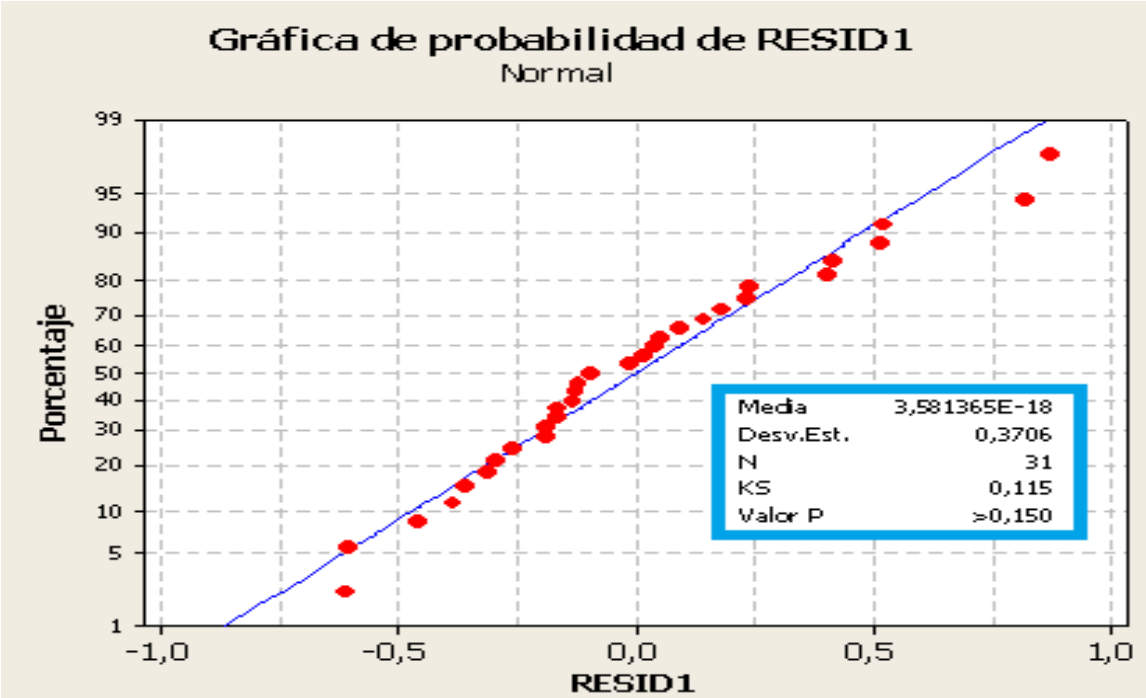
| Condiciones | Pares comparados | Resultado prueba t |
|---|---|---|
| **Sin tratamiento con glucosamina** | **L (15 min) vs A (6 horas)** | 0,007 |
| **Con tratamiento con glucosamina** | **K(15 min) vs C (6 horas)** | 0,167 |

## 4.4 Anexo 4. ANOVA para expresión de p-GSK-3β tirosina 216

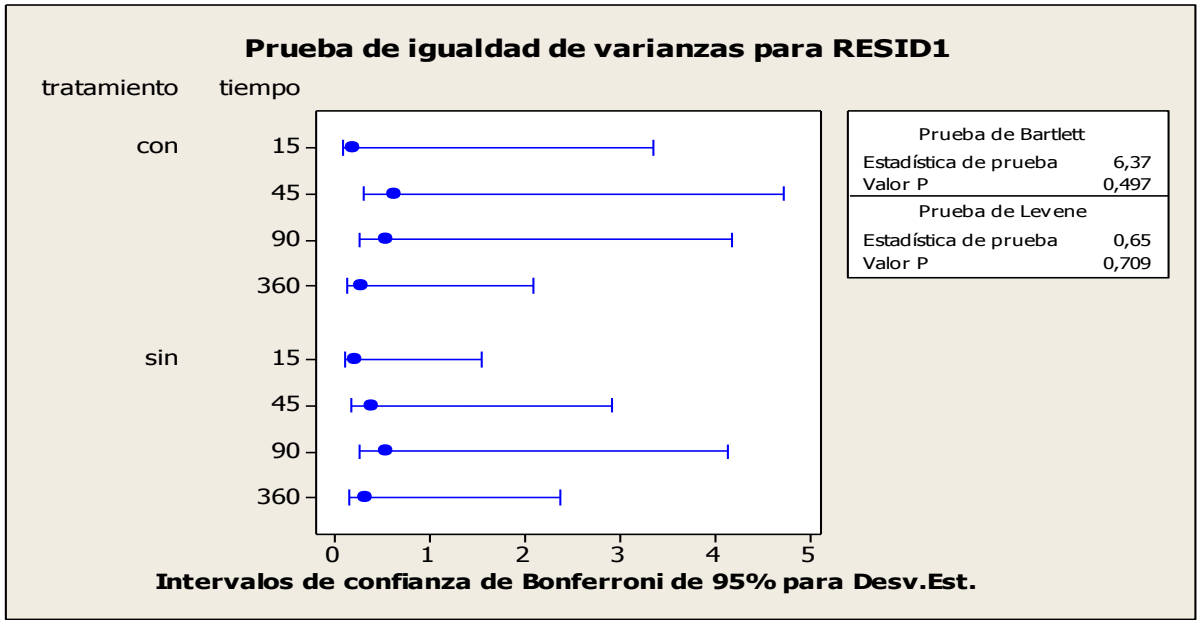
**Gráfica 8: Interacciones entre tratamientos y tiempos en p-GSK-3β tirosina 216**




**Gráfica 9: Comprobación del comportamiento normal de los residuos en p-GSK-3β en tirosina 216**




**Gráfica 10: Comprobación del comportamiento normal de las varianzas en p-GSK-3β en tirosina 216**




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

```
Factor       Tipo  Niveles  Valores
tratamiento  fijo        2  con. sin
```

```
tiempo       fijo        4  15. 45. 90. 360

Análisis de varianza para densidad, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente              GL  SC Sec.  SC Ajust.  MC Ajust.     F      P
tratamiento          1   0,9183     0,9298     0,9298  5,19  0,032
tiempo               3   1,0749     1,0555     0,3518  1,96  0,148
tratamiento*tiempo   3   0,2324     0,2324     0,0775  0,43  0,732
Error               23   4,1208     4,1208     0,1792
Total               30   6,3465

S = 0,423278   R-cuad. = 35,07%   R-cuad.(ajustado) = 15,31%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95,0%

tratamiento   N   Media  Agrupación
sin          16  1,3991  A
con          15  1,0512    B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95,0%

tiempo  N   Media  Agrupación
 45     8  1,3556  A
 90     8  1,3404  A
 15     7  1,2923  A
360     8  0,9124  A
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95,0%

tratamiento  tiempo  N   Media  Agrupación
sin           15     4  1,5864  A
sin           90     4  1,5534  A
sin           45     4  1,4858  A
con           45     4  1,2254  A
con           90     4  1,1274  A
con           15     3  0,9981  A
sin          360     4  0,9710  A
con          360     4  0,8538  A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.
```

**Tabla 15: Pruebas t- student (p<0,05) para gráfica 3C.**

| Pares comparados | Resultado prueba t |
|---|---|
| **F (sin*) vs E (con) controles** | 0,505 |
| **L (sin) vs K (con) 15 minutos** | 0,032 |
| **H (sin) vs G (con) 45 minutos** | 0,138 |

| | |
|---|---|
| **J (sin) vs I (con) 45 minutos** | 0,172 |
| **A (sin) vs C (con) 45 minutos** | 0,367 |

***** Sin: sin tratamiento con glucosamina; Con: con tratamiento con glucosamina

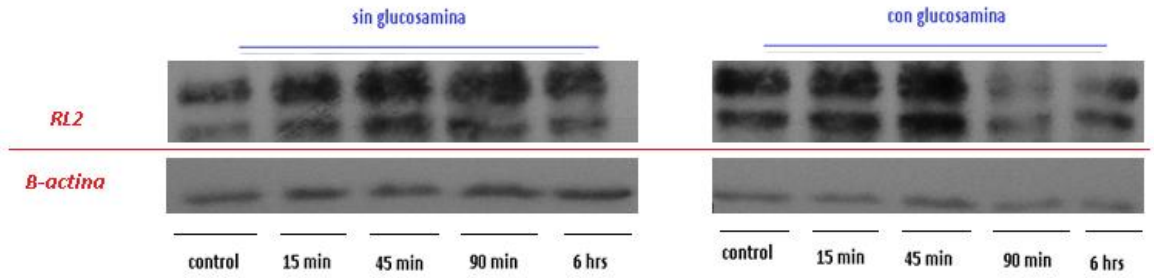
**Tabla 16: Pruebas t- student (p<0,05) para gráficas 3D y 3E**

| Condiciones | Pares comparados | Resultado prueba t |
|---|---|---|
| **Sin tratamiento con glucosamina** | **L (15 min) vs A (6 horas)** | 0,0718 |
| | **F(control) vs L (15 min)** | 0,0132 |
| **Con tratamiento con glucosamina** | **K(15 min) vs C (6 horas)** | 0,0664 |
| | **E (control) vs K (15 min)** | 0,4937 |

## 4.5 Anexo 5. Presencia de O-glicosilación en proteínas totales

Las membranas se incubaron con anticuerpo contra RL2 que identifica la glicosilación en general de todas las proteínas, los resultados fueron:

A




B

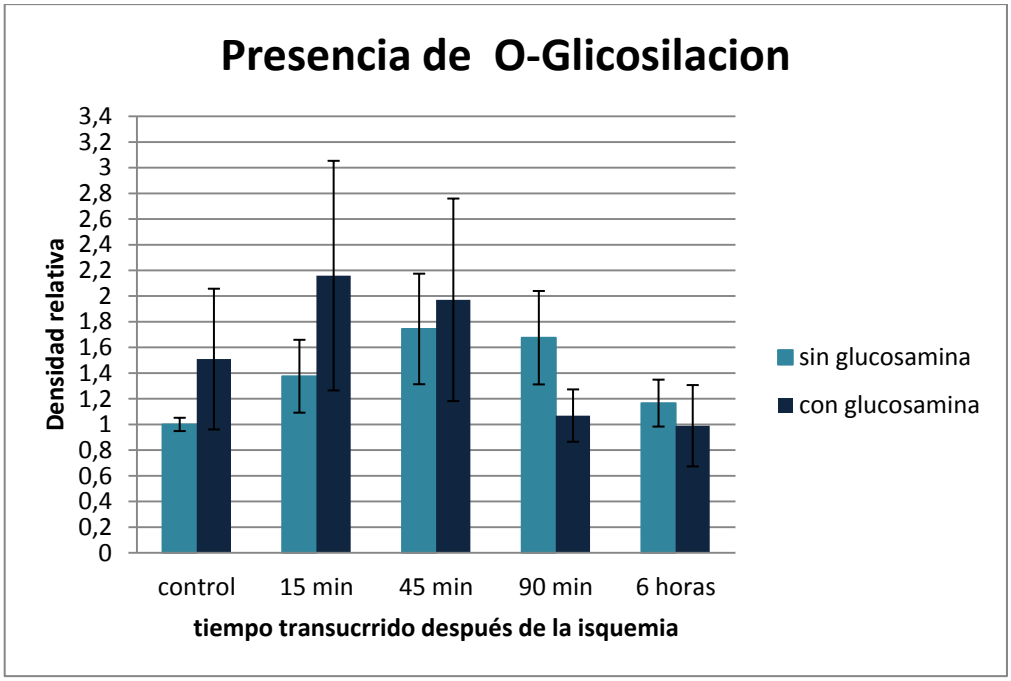



**Figura 4**: **Caracterización de la O- glicosilación en las proteínas totales en condición isquémicas tratada o no con glucosamina a diferentes tiempos**. (A) Inmunoblot para el anticuerpo RL2 y su control de carga. (B) densitometría y comparación por pares de la presencia de glicosilación en los diferentes tratamientos a los 4 tiempos evaluados, obtenida de los promedios de n=4 con +/- error estándar de la media (SEM)

## 4.6 Anexo 6. Evaluaciones comportamentales a las ratas en el Laboratorio de Fisiología Celular Animal.

### Realización de test comportamentales

Cuando se han identificado las ratas (Ratas albinas blancas *Rattus norvegicus)* que se utilizan para el experimento, se realizan los test comportamentales antes de llevar a cabo la intervención quirúrgica y después de la misma (test del cilindro y test del sticker). El comportamiento de las ratas durante el test es filmado y evaluado posteriormente en un computador a través del programa para videos Movie Maker.

***Test del cilindro***

En el test del cilindro, la rata se introduce en un cilindro transparente que mide 35 cm de altura y 30 cm de diámetro y que se encuentra encima de una mesa transparente, debajo de la mesa se pone un espejo para que el comportamiento de la rata pueda ser claramente grabado por la cámara de video y se enfoque desde la parte de abajo, el video se pone a rodar por cinco minutos y la rata no sufre ningún factor de estrés más que el de estar encerrada en el cilindro. Antes de ubicar la rata dentro del cilindro, se le pinta la extremidad inferior derecha de azul con un marcador para que el evaluador tenga un punto de ya que lo que se filma es el reflejo en un espejo.

La actividad exploratoria se analiza de manera ciega a los grupos experimentales, el evaluador no conoce a qué grupo experimental pertenece la rata que evalúa, ya que a cada rata se le asigna un código numérico que aparece en el video junto con la fecha y la condición pre o pos operatoria de la misma, en un papel puesto sobre la mesa transparente en la que se encuentra el cilindro.

El video grabado es reproducido posteriormente en Movie Maker, en función de reproducción lenta que permite visualizar lo que pasó en el video cada decima de segundo. Se anota en un registro cuando la rata usa sus miembros anteriores para explorar el cilindro (cada vez que con sus patas delanteras toque las paredes del cilindro), balanceando su peso en las extremidades posteriores. Si usa los dos miembros anteriores para sostenerse o explorar al mismo tiempo se anotan un registro para cada pata, si usa por separado un miembro anterior para explorar, se anota bien sea izquierdo o derecho. Se hace la sumatoria de cuantas veces la rata utiliza sus patas delanteras para explorar el cilindro y se discrimina por pata izquierda y derecha. Este experimento se lleva a cabo una vez por individuo en cada condición, antes y después de la operación. Los resultados se plasman en un formato en Excel, como el que sigue:

| FECHA CIRUGIA | | EJEMPLAR | TEST CILINDRO | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | PREQUIRURGICO | | POSQUIRURGICO | |
| | | | VECES DER | VECES IZQ | VECES DER | VECES IZQ |
| | | | | | | |

**Ilustración 3: Formato en Excel para registro de resultados del test del cilindro.**

### *Test del sticker*

En el test del sticker, la rata se introduce en una caja de prueba que mide 45 cm de largo, 35 cm de ancho y 25 cm de alto, antes de ello se le marca su extremidad inferior derecha con marcador azul, y en la parte posterior de sus patas delanteras se adhiere un sticker en cada una, específicamente en las almohadillas que ahí se encuentran, con la misma presión en ambas. La caja de prueba se encuentra encima de una mesa transparente, al igual que en la prueba del cilindro, se pone un espejo debajo de la mesa y la cámara de video enfoca a este espejo.

Se enciende la cámara de video y el experimentador está atento a detener el video cuando la rata se haya quitado los dos sticker en cada una de las patas, en caso de que no lo lograse, el video se suspende a los cinco minutos, tiempo tope que se le da a la rata para liberarse de los sticker. Encima de la mesa donde se encuentra la caja de prueba se pone, en un papel, el código numérico asignado para la rata, que aparece en el video junto con la fecha y la condición pre o pos operatorio de la misma, de esta manera el evaluador es ciego respecto a los grupos experimentales que analiza. El experimentador ayuda al evaluador anunciando en el video la pata en la que se observó que la rata se quitó primero el sticker.

El video grabado será reproducido posteriormente en Movie Maker, en función de reproducción lenta que permite visualizar lo que pasó en el video cada decima de segundo. Para retirarse el adhesivo, la rata puede empezar por cualquiera, se lo trata de quitar sacudiendo sus patas y/o trayendo sus patas directamente hasta su boca, lo que se registra es el tiempo le tomó a la rata quitarse los sticker y la pata a la que se lo logró quitar primero. Se contará como sticker fuera cuando la rata ya lo haya separado de su pata, no importa si se le ha pegado en otra parte del cuerpo o si lo sujeta en su boca. Este experimento se lleva a cabo por cada individuo cuatro veces seguidas, es decir se harán cuatro repeticiones consecutivas de la prueba del sticker por cada rata antes y después de las operaciones. Los resultados se plasmarán en un formato en Excel como sigue:

| FECHA CIRUGIA | | EJEMPLAR | TEST DEL STICKER | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | PREQUIRURGICO | | | | | | | | | | | | | | POSQUIRURGICO | | | | | | | | | | | |
| | | | ENSAYO 1 | | | | ENSAYO 2 | | | | ENSAYO 3 | | | | ENSAYO 4 | | | | ENSAYO 1 | | | | ENSAYO 2 | | | | ENSAYO 3 | | | | ENSAYO 4 | | | |
| | | | 1ER LADO | T (Seg) | 2DO LADO | T (Seg) | 1ER LADO | T (Seg) | 2DO LADO | T (Seg) | 1ER LADO | T (Seg) | 2DO LADO | T (Seg) | 1ER LADO | T (Seg) | 2DO LA | T (Seg) | 1ER LADO | T (Seg) | 2DO LA | T (Seg) | 1ER LADO | T (Seg) | 2DO LA | T (Seg) | 1ER LADO | T (Seg) | 2DO LA | T (Seg) | 1ER LADO | T (Seg) | 2DO LA | T (Seg) |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

**Ilustración 4: Formato en Excel para registro de resultados del test del cilindro.**

## Pruebas comportamentales para las ratas usadas en el experimento

Las consecuencias funcionales de isquemia focal inducida en ratas se pueden evaluar usando un examen neuroconductual. Los déficits funcionales inducidos por la oclusión de La arteria cerebral media se relacionan con el daño histológico causado por el modelo experimental. Si no se observa déficit en el comportamiento, los investigadores pueden concluir o bien que el animal se ha recuperado totalmente, o que los procedimientos que utilizaron no eran los apropiadas o suficientemente sensibles para inducir el modelo en el animal (Wahl et al., 1992) (Bouet & Boulouard, 2009).

Las ratas son naturalmente exploradoras, a menudo exploran las superficies verticales apoyándose sobre sus patas traseras y sondeando la superficie con sus patas delanteras y sus vibrisas. La prueba del cilindro o prueba de asimetría del uso de los miembros, aprovecha esta tendencia en el comportamiento de la rata y el deterioro común en la iniciación de movimiento y el control de equilibrio que sufre la rata al reproducir en ella un modelo de lesión. Lo que se busca es evaluar el uso de las extremidades anteriores de la rata poniéndola dentro de en un cilindro transparente. Este test se ha utilizado en una amplia variedad de modelos de lesión del sistema motor, incluyendo la oclusión de la arteria cerebral media, lesión de la médula espinal, lesión cerebral traumática, modelos parkinsonianos, la ablación cortical y la isquemia cortical focal. Una característica notable de este test es su alto grado de sensibilidad a los déficits crónicos post lesión que a menudo son enmascarados por conductas compensatorias, así como déficits sensoriomotores crónicos que muchas pruebas no pueden detectar. La prueba también es fácil de usar y la puntuación tiene alta fiabilidad y está bien correlacionada con el grado de la lesión (Schallert et al., 2000) (Whishaw & Kolb, 2005).

La prueba del Sticker o prueba de remoción del adhesivo, da una evaluación objetiva de los sentidos y los déficits motores relacionados con las patas y la boca de las ratas, esta prueba es relevante para los estudios experimentales sobre la isquemia cerebral, puesto que detecta problemas en los movimientos asimétricos y sensoriomotores, comunes en los pacientes con accidente cerebrovascular (Bouet & Boulouard, 2009).