

**ESTUDIO DEL IMPACTO DE UNA ISQUEMIA CEREBRAL SOBRE EL
METABOLISMO BASAL EN RATAS WISTAR**

Raúl Cerón Mesa

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

BIOLOGÍA CON CONCENTRACIONES EN CONSERVACIÓN, BIOLOGÍA
MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

Santiago de Cali

2018

**ESTUDIO DEL IMPACTO DE UNA ISQUEMIA CEREBRAL SOBRE EL
METABOLISMO BASAL EN RATAS WISTAR**

Raúl Cerón Mesa

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIÓLOGO

Tutores:

Juliana Rengifo Gómez, PhD

Gustavo Adolfo Londoño Gurrero PhD

Santiago de Cali

2018



APROBADO POR:

Paola Andrea Caicedo

Paola Andrea Caicedo, PhD.
Evaluador

Juliana Rengifo

Juliana Rengifo Gómez, PhD.
Tutor del Proyecto

Gustavo Londoño

Gustavo Adolfo Londoño, PhD.
Co-Tutor del Proyecto

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer, en primer lugar, a mi padre por su incansable esfuerzo que hizo que todo fuese posible para mí, su motivación constante hacia mis estudios y decisiones. A mi madre y mi hermano, por el apoyo incondicional; incluso estando tan lejos de donde me encuentro. Al profesor Carlos Cardozo, que ha sido un gran ejemplo como persona e investigador, de trabajo constante, riguroso y bien hecho. Las cosas que aprendidas debido a él son invaluable y de gran ayuda, no solo para mi formación como profesional, sino para mi enriquecimiento personal. A la profesora Juliana Rengifo por su paciencia y constante dirección a través del trabajo. Gracias a ella pude realizar este trabajo, ya que fue por las materias que dictó, que mi gusto por esta área se profundizó y me animó a trabajar en él. Al profesor Gustavo Londoño por su gran paciencia conmigo, porque fue trabajoso aprender a manejar algunos equipos y su gran ayuda a la hora de tratar los datos. Por último, pero ciertamente no menos importante, quiero agradecer a mi amigos por que ha sido gran parte de su apoyo; de primera mano, el que me ha incentivado a seguir en este difícil camino, sin rendirme y trabajando por lo que quiero.

CONTENIDO

Resumen	10
Abstract	12
1 INTRODUCCIÓN	13
2 DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO.....	15
2.1 Planteamiento del problema:.....	15
2.2 Marco Teórico y Estado del Arte:	16
2.2.1 Metabolismo y Tasa Metabólica Basal:	16
2.2.2 Mecanismos Moleculares (O-GlcNAc y HIF-1) de Tolerancia Isquémica durante un ACV:.....	17
2.2.3 Metabolismo de Animales Hibernadores VS No Hibernadores	21
2.3 Objetivos	22
2.3.1 Objetivo General:.....	22
2.3.2 Objetivos específicos:.....	22
2.4 Metodología	22
2.4.1 Inyección intraventricular.....	23
2.4.2 Protocolo de acondicionamiento Isquémico y Oclusión de la Arteria cerebral media (MCAo)	23
2.4.3 Sacrificio, Tinción y Determinación del Volumen de Isquemia Cerebral.....	24
2.4.4 Análisis estadístico	28
2.4.5 Matriz de Marco Lógico	29
2.5 Resultados:	31
2.5.1 Determinación del Volumen de Isquemia Cerebral	31
2.5.2 Medición de Tasa Metabólica Basal (BMR).....	36
2.6 Discusión:.....	40
2.6.1 Determinación del Volumen de Isquemia Cerebral:	40
2.6.2 Medición de la Tasa Metabólica Basal (BMR).....	43
2.6.3 Relación entre una Isquemia Cerebral y el Metabolismo Basal	46
2.7 Conclusiones:.....	49
2.8 Recomendaciones:	50
2.9 Bibliografía:	51

Lista de Tablas

Tabla 1. Grupos Experimentales Isquemia Cerebral.....	26
Tabla 2. Grupos Experimentales BMR.....	28
Tabla 3. Masa Promedio de los Individuos utilizados para medir la BMR.....	40

Lista de Gráficas

Gráfica 1. Comparación del Volumen de Isquemia Cerebral.....	33
Gráfica 2. Comparación del Volumen de Isquemia Cerebral con Controles Positivos	35
Gráfica 3.Comparación de la BMR	36
Gráfica 4.Efecto de la ICV en la BMR.....	37
Gráfica 5.Efecto de una Isquemia Cerebral en la BMR	38
Gráfica 6. Comparación de la BMR entre los Grupos Experimentales	39

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema de síntesis de la O-GlcNAcilación a través de la HBP e inhibición de las enzimas principales en su síntesis.....	20
Figura 2. Mecanismo de acción del TTC.....	25
Figura 3. Fotografía de una lámina cerebral de un individuo sometido a MCAo y posteriormente teñida con TTC	25
Figura 4. Sistema LabAnalyst X RESPIROMETRY de WartHog	28
Figura 5. Resultados de las pruebas histoquímicas con TTC.	32

Lista de Anexos

Anexo 1: Datos del Porcentaje de Isquemia Cerebral en los individuos utilizados	56
Anexo 2. Datos de BMR en los individuos utilizados	58

Resumen

La isquemia cerebral, es la segunda patología que más muertes causa en el mundo. Se debe a la obstrucción de una arteria en el cerebro. Sin irrigación, las neuronas de la zona mueren por el estrés por la escasez de oxígeno y glucosa. El cerebro es el órgano con mayor demanda energética, debido a las funciones procesamiento de señales. Los daños en este órgano tienen repercusiones dramáticas porque se eliminan conexiones regulatorias de procesos como los de movilidad y comportamiento. Los estudios de los diferentes efectos de la isquemia son necesarios para el diseño de un tratamiento efectivo que minimice al máximo los daños causados. Los estudios son prácticamente inexistentes en cuanto al efecto de la isquemia cerebral sobre el metabolismo basal, siendo este último una medida del gasto energético de las funciones vitales de un organismo endotermo. Tampoco existen datos acerca de la relación entre ambas variables, cuando se utilizan tratamientos que inducen la tolerancia isquémica y por ende tienen influencia sobre el volumen de isquemia en el tejido.

Con base a la escasez de información acerca del tema, el presente trabajo estudiar esta relación, se utilizaron ratas de la cepa Wistar sometidas a un protocolo de acondicionamiento isquémico que induce los mecanismos de tolerancia isquémica y a inhibidores de la Glicosilación O-linked- β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc), que se cree es uno de los principales mecanismo de tolerancia, con el fin de entender su influencia sobre el volumen de isquemia cerebral y la influencia del volumen de isquemia sobre la tasa metabólica basal. Se realizaron análisis histoquímicos con TTC y el software ImageJ, para evaluar el volumen de isquemia con los tratamientos y se hicieron mediciones con el LabAnalyst X RESPIROMETRY que permitió medir el metabolismo basal.

Los resultados fueron analizados en Graphpad Prism5 y arrojaron una disminución significativa del volumen de isquemia para un $\alpha = 0,05$, cuando se aplica el acondicionamiento, que pareciera indicar que la tolerancia isquemica se debe a la O-GlcNAc, ya que su inhibición no causó reducción del volumen de isquemia. Las mediciones de la BMR no resultaron significativas para un $\alpha = 0,05$ en ningún grupo, posiblemente por desventaja del método empleado para medición. Sin embargo, según la literatura disponible lo más probable es que ambas variables tengan una relación inversamente proporcional y que el acondicionamiento induzca la tolerancia isquémica. Esta tolerancia parece estar representando un gasto energético importante en el organismo, por lo que aquellos individuos sometidos a un protocolo de acondicionamiento isquémico deberían tener una tasa metabólica mayor. Para tener una mayor certeza se recomienda realizar los

ensayos en cultivos, permitiendo responder la pregunta investigativa con relación directamente a las células cerebrales.

Palabras Clave: Isquemia cerebral, Tasa Metabólica Basal (BMR), Tolerancia Isquemica, O-GlcNAc, OGT.

Abstract

Cerebral ischemia is the second pathology that causes most deaths in the world. It is due to the obstruction of an artery responsible for irrigating an area of the brain. Without irrigation, neurons die due to stress of oxygen and glucose shortage. The brain is the organ with the greatest demand for energy, due to its important functions. The damages to this organ have dramatic repercussions because it eliminates the regulatory connections of many important physiological processes. Studies about the effects of ischemia are necessary for the designing an effective treatment that minimizes the damage caused. Studies are non-existent in terms of the effect of cerebral ischemia on the basal metabolism, the last one being a measure of the energy expenditure of the vital functions of an endotherm organism. There are also no data about the relationship between the variables, when they are used treatments to induce ischemic tolerance and therefore influence the volume of ischemia in the tissue.

Due to the lack of information, this research pretends to study this relationship, between cerebral ischemia volume and basal metabolic rate. There were used Wistar rats, submitted to an ischemic preconditioning protocol that seems to induce endogenous mechanisms of ischemic tolerance, and inhibitors of the O-linked- β -N-acetylglucosamine(O-GlcNAc) which is believed to be one of the main tolerance mechanisms, that has the most influence on the ischemia volume; in the brain, and the influence of this volume on the basal metabolic rate. Analyzes with TTC were made using the ImageJ software, to evaluate of the ischemic volume with the treatments. Subsequent measurements were made with the LabAnalyst X RESPIROMETRÍA that allowed measuring the basal metabolism.

The results were analyzed in Graphpad Prism5 and showed a significant decrease in ischemia volume for $\alpha = 0.05$, when preconditioning is applied, which seems to indicate that tolerance is due to O-GlcNAc, since its inhibition caused no decrease of ischemia volume. The measurements of the BMR were not significant for $\alpha = 0.05$ in any group, possibly due to the disadvantage of the method used for measurement. However, the available information showed that it is most likely that both variables have an inversely proportional relationship and that the preconditioning when induces ischemic tolerance, seems to represent important energy expenditure in the body for those individuals who were preconditioned. To have greater certainty, it is recommended to carry out the tests at the culture level, which would allow answering the research question with greater security.

1 INTRODUCCIÓN

Un accidente cerebro-vascular (ACV) o isquemia cerebral es la segunda causa de muerte a nivel mundial (World Health Organization, 2017) y ocurre cuando se obstruye una arteria que se encarga de irrigar zonas importantes del cerebro. Las zonas sin perfusión dejan de recibir oxígeno y glucosa, los cuales son necesarios para que la células neuronales realicen sus funciones fisiológicas (Lakhan et al, 2009). El cerebro es el resultado de cambios evolutivos complejos y ha permitido de manera efectiva, el procesamiento de señales para generar un estímulo o una respuesta. Dichas actividades requieren un alto gasto energético, por lo cual este recibe hasta el 25% de la sangre bombeada por el corazón que equivale al 20% del oxígeno (O₂) transportado (Jain et al, 2010).

Los animales endotermos (aquellos que producen su propio calor metabólico), tienden a reducir el consumo de oxígeno al mínimo cuando se someten a condiciones sin demandas físicas, bajas reservas energéticas y temperaturas ambientales dentro de su zona termoneutral. Experimentalmente (Luna et al, 2017), el mínimo consumo de O₂ en dichas condiciones se describe como tasa metabólica basal (BMR), por sus siglas en inglés, y puede ser una referencia de la medición metabólica de las funciones vitales.

Actualmente hay pocos trabajos que describen la relación entre el tamaño de la lesión de una isquemia cerebral y la influencia que ésta pueda tener sobre el metabolismo, los trabajos publicados hacen mediciones en cuanto a la presencia de metabolitos que indican el aumento del metabolismo anaeróbico, en el cerebro, y cambios netos de consumo de oxígeno (Wood & Malvin, 1991; Aboagye & Allen, 2014). Se ha demostrado que esos cambios metabólicos son el resultado de un estado economizador del cerebro, para que este invierta la energía disponible en los procesos más vitales (Li et al, 2017).

En cuanto al metabolismo aeróbico, los estudios realizados muestran claras disminuciones del metabolismo del oxígeno a causa de las alteraciones hemodinámicas por la isquemia cerebral. Sin embargo, no se sabe que sucede con la BMR y si se utilizan distintos tratamientos que afectan los mecanismos endógenos de neuroprotección (Gu et al, 2017; Li et al, 2017) que se han comprobado que influyen en el volumen del tejido infartado a través de diversos mecanismos, pero que tampoco se sabe de qué forma afectan esos mecanismos al metabolismo basal.

En la naturaleza existen animales con mecanismos intrínsecos que les confieren una alta tolerancia a bajas concentraciones de oxígeno, como en el caso de los hibernadores, existen otros (como las ratas y los humanos) cuya tolerancia a las condiciones hipóxicas es muy baja (Bogren & Drew, 2014). El término de tolerancia isquémica nace por la capacidad de una célula, tejido u órgano de adquirir resistencia a condiciones de baja oxigenación y disponibilidad de glucosa prolongada (Li et al 2017) y aunque se desconocen los mecanismos por los cuales

los animales hibernadores son tan tolerantes de estas condiciones (Nataniel, 2008; Bogren & Drew 2014) se han descubierto metodologías experimentales que confieren un estado de tolerancia isquémica, como el preconditionamiento isquémico (Li et al, 2017). La metodología consiste en la aplicación de estímulos isquémicos o hipóxicos cortos, lo cuales son capaces de inducir mecanismos que protegen, significativamente, al tejido a un mayor tiempo de hipoxia y reducen la cantidad de células que mueren (Gu et al, 2017; Li et al, 2017).

Un mecanismo de neuroprotección endógeno importante por sus diversas implicaciones biológicas es la glicosilación tipo O-GlcNAc. Los efectos de tolerancia que proporciona, durante una isquemia cerebral, es una reducción significativa del volumen de tejido infartado (Gu et al, 2017). No se tiene claro el mecanismo por el cual un protocolo de preconditionamiento isquémico aumenta los niveles de Glicosilación O-linked- β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) que pueden reducir el volumen de infarto (Jensen et al, 2013) pero si se ha visto que el preconditionamiento aumenta los niveles de expresión y actividad enzimática de la enzima O-GlcNAc transferasa u OGT, que es la encargada en la transferencia del monosacárido a la proteína.

Teniendo en cuenta lo anterior, en el siguiente trabajo se estudió la relación que existe entre la isquemia cerebral y la tasa metabólica basal (BMR) utilizando ratas de la cepa Wistar como biomodelo. Para ello los individuos fueron sometidos a distintos tratamientos, que según evidencia la literatura científica, afectan los mecanismos endógenos de protección celular del cerebro (Gu et al, 2017; Li et al, 2017) y se cuantificó el volumen de isquemia cerebral. También se midió la BMR en las diferentes etapas experimentales y se relacionaron los datos de ambas variables.

Para este caso, los tratamientos utilizados fueron: un protocolo de preconditionamiento isquémico y otro donde se emplearon inhibidores de las enzimas más importantes para la síntesis del grupo O-GlcNAc. El metabolismo basal se midió a través del consumo de oxígeno (VO_2). La cuantificación del volumen de isquemia se realizó por tinciones con TTC y con ayuda del software ImageJ. El análisis de respirometría se llevó a cabo en el sistema y el software de Warthog, LabAnalyst X RESPIROMETRY que permitió medir la BMR.

2 DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO

2.1 Planteamiento del problema:

En la literatura científica existe poca información sobre los cambios ocurridos en el metabolismo durante una isquemia cerebral, siendo ésta, una de las patologías de mayor incidencia y que más muertes cobran en el planeta (World Health Organization, 2017). Se sabe aún menos, ya que son prácticamente inexistentes los estudios que relacionan esa patología con el metabolismo basal de los animales, incluyendo al ser humano.

El problema, a la luz de lo anterior, es que poco ha sido descrito y surgen incógnitas sobre ¿Qué cambios metabólicos ocurren a causa del tejido muerto?, ¿Si la magnitud de esos cambios depende del volumen de tejido afectado?, ¿Los cambios son directamente proporcionales o inversos? y ¿si además se aplican unos tratamientos para disminuir el volumen de infarto cerebral, como podría comportarse el metabolismo basal? ¿Dichos tratamientos tendrán efectos sobre el metabolismo basal? Teniendo en cuenta que la tasa metabólica basal puede verse como el gasto energético en el que incurren los procesos vitales del organismo, resulta pertinente preguntarse ¿qué hace el organismo con esa energía cuando el órgano más vital es afectado gravemente y se ve incapacitado para funcionar de manera correcta, debido a los daños producidos por la isquémica? y ¿si hay un efecto sobre el gasto energético por el uso de tratamientos que influyen en el volumen de tejido isquémico?

En el caso de que eso fuese cierto, lo esperado sería una disminución de la tasa metabólica basal, en mayor grado, para los individuos con mayor volumen de infarto ya que debería haber una disminución del metabolismo aeróbico en el tejido. El protocolo de preconditionamiento isquémico, como es mencionado en muchos artículos, actúa bajo diferentes mecanismos y cascadas celulares que muy posiblemente involucran gastos energéticos; por lo tanto, es interesante conocer cómo varía la tasa metabólica basal de estos individuos en comparación con aquellos que están sanos, aquellos que sufrieron de isquemia y aquellos que además han sido sometidos a inhibidores de la O-GlcNAc como mecanismo neuroprotector.

El impacto de los ACV o isquemia cerebral, es enorme a nivel mundial. El desarrollo de tratamientos para evitar y prevenir los efectos de este tipo de patologías es sumamente necesario, pero para ello se requiere de un completo conocimiento acerca de esta enfermedad. Gran parte del desarrollo de estas estrategias se han concentrado en saber qué está sucediendo en distintos niveles y rutas del metabolismo animal, porque los vacíos son grandes y es de vital importancia conocer todas las facetas y repercusiones de la patología. Por ello este proyecto pretende estudiar una parte poco explorada en la temática, que

brindará conocimiento que puede ser en futuras investigaciones y se genere nuevo conocimiento al respecto.

Con base en todas las preguntas, relevancias y problemáticas mencionadas anteriormente, se busca estudiar la relación que existe entre la Isquemia Cerebral y el Metabolismo basal, utilizando Ratas Wistar con tratamientos que afectan los mecanismos endógenos de protección celular, en el cerebro. Para este caso, los tratamientos utilizados fueron: un protocolo de preconditionamiento isquémico y otro con inhibidores de las enzimas más importantes para la síntesis del grupo O-GlcNAc. El metabolismo basal se midió a través del consumo de oxígeno (VO₂).

2.2 Marco Teórico y Estado del Arte:

En el mundo, los accidentes cerebro-vasculares (ACV) o isquemia cerebral representan la segunda causa de muerte, según el reporte de las 10 causas de muerte del 2017 de la Organización Mundial de la Salud (WHO) (World Health Organization, 2017) lo cual concuerda con las predicciones que se venían realizando desde el 2004 para el 2015 y en adelante. La causa de esta patología (Lakhan et al, 2009) es la obstrucción de una arteria que irriga una zona del cerebro y que al cesar el flujo de sangre, las células en la zona focalizada dejan de recibir el suministro de oxígeno y nutrientes necesarios para cumplir sus funciones; lo que concluye en la muerte del tejido. La oclusión de una arteria puede deberse a la formación de un trombo u otros mecanismos hemodinámicos (De Leciñana, 2003). Las repercusiones clínicas dependen de la arteria que es obstruida, puesto que puede encargarse de la irrigación de una zona de gran importancia fisiológica.

2.2.1 Metabolismo y Tasa Metabólica Basal:

En mamíferos, el cerebro es un órgano cuyo metabolismo depende únicamente de la ruta glicolítica (Jain et al, 2010). Él representa el 2% del peso corporal y sin embargo recibe del 15-25% de la sangre bombeada por el corazón y el 20% del oxígeno transportado (Jain et al, 2010). Las funciones que realiza el cerebro son vitales para el organismo y el suceso de un ACV puede causar daños que van hasta la muerte del órgano. Los síntomas más comunes de ésta patología incluyen: Parálisis en uno de los lados del cuerpo lo que provoca la disminución del movimiento y cambios comportamentales, esto debido a las interacciones sinápticas implicadas que fueron severamente afectadas generalmente en solo uno de los hemisferios cerebrales (Rodríguez García et al, 2010).

El consumo de oxígeno es una medida calorimétrica indirecta del metabolismo (Kaiyala & Ramsay, 2011) porque parte de la relación estequiométrica entre el oxígeno consumido para oxidar la glucosa, la cantidad de calor y CO₂ producido. A

diferencia de las medidas directas que miden el metabolismo como un todo. La medida indirecta puede calcular un rasgo específico a través de propiedades específicas del rasgo. Teniendo eso en cuenta puede medirse el consumo de oxígeno y reflejar esto como una medida del metabolismo basal (Kaiyala & Ramsay, 2011). La medición de VO₂ se aproxima mucho a la medición del metabolismo porque la cantidad de moles necesarias para oxidar una molécula de glucosa, son directamente proporcionales al calor producido en la reacción y al trabajo. La medición de VO₂ también resulta ventajosa porque excluye el metabolismo de la flora microbiana del animal (Kaiyala & Ramsay, 2011; Animal Physiology, 2012). En los animales homeotermos, la tasa metabólica basal (BMR) es una medida experimental que depende de las relaciones alométricas de cada especie animal y la temperatura ambiental (Luna et al, 2017). Existe un rango de temperatura (zona termoneutral) donde el consumo de oxígeno en el metabolismo es mínimo dado que el gasto energético de la termorregulación es mínimo. Para calcular este tipo de tasa metabólica, el consumo de oxígeno debe ser medido en ayuno u horas después de la última ingesta, dentro de la zona termoneutral y en reposo; para asegurar que no hay actividad física que aumente el consumo energético (Luna et al, 2017). Teniendo en cuenta las tres condiciones para calcular la BMR, ella no solo permite medir la energía necesaria para mantener la homeostasis térmica; sino también el gasto energético de las funciones vitales del animal.

Trabajos con cultivos cerebrales han demostrado que dependiendo de la zona del cerebro, en la que ocurra una lesión, puede darse el caso de que hayan cambios en cuanto al consumo de oxígeno más dramáticos o no (Levasseur et al, 2000). Dado esto, puede haber un periodo de aumento significativamente mayor de volumen de oxígeno consumido (VO₂) en lesiones en las zonas del mismo lado del cerebro que cuando es en lados contrarios. También ocurre que el consumo de oxígeno aumenta cuando se presentan lesiones hipocampales, (Levasseur et al, 2000); esto también ocurre en menor medida con las lesiones corticales, donde el nivel de consumo de oxígeno es menor a comparación de lo ocurrido en las lesiones hipocampales (Levasseur et al, 2000). A pesar de ese estudio realizado por Levasseur en el 2000, no ha habido información que indique si la causa del incremento de VO₂ se debe a un intento del órgano de compensar el tejido muerto o que tal vez se deba a mecanismos de reparación. Debido a que el experimento fue realizado a nivel de cultivo y no hay recreaciones *in-vivo* se desconoce la causa o la respuesta.

2.2.2 Mecanismos Moleculares (O-GlcNAc y HIF-1) de Tolerancia Isquémica durante un ACV:

El término de tolerancia isquémica nace por la capacidad de una célula, tejido u órgano de adquirir resistencia o “ser tolerante” a un estímulo prolongado de isquemia (Li et al 2017). En palabras sencillas, que puede tolerarse la falta de oxígeno y nutrientes en ausencia de perfusión. Hay varios mecanismos

endógenos de tolerancia isquémica (Dirnagl et al, 2003), entre los cuales puede destacarse: la anti-excitotoxicidad, la anti-inflamación, la anti-apoptótica y de nivel energético en el metabolismo. Otro mecanismo de neuroprotección endógeno, de gran importancia por sus importantes implicaciones biológicas es la glicosilación tipo O-GlcNAc. Los efectos de tolerancia que ha demostrado proporcionar, durante una isquemia cerebral, es una reducción significativa del volumen de tejido infartado (Gu et al, 2017). Por otro lado, el preconditionamiento isquémico (IPC), es un método experimental para inducir al estado de tolerancia isquémica, con la aplicación de cortos periodos de isquemia; lo cual genera la activación de los mecanismos endógenos protectores (Li et al, 2017).

La isquemia cerebral focal causa daños neurodegenerativos asociados a estrés celular. Ello no se debe, únicamente, a que se ven afectados los mecanismos de síntesis de ATP, sino también a la incapacidad de regulación de muchas funciones fisiológicas. Lo anterior parte de que al menos el 5% de la glucosa que entra a la célula es invertido para la síntesis de glicosilaciones tipo O-GlcNAc (Butkinaree et al, 2009). La adición de ese monosacárido tiene funciones muy importantes en el sistema nervioso, de las que se pueden destacar: el transporte axonal de moléculas y mitocondrias, además de la estabilidad del citoesqueleto e indicios del estado nutricional de la célula.

A nivel metabólico el descenso del flujo cerebral sanguíneo (Livnat et al, 2010), durante la oclusión, genera varias repercusiones, con diferentes dinámicas mientras transcurre el tiempo. La producción de especies reactivas de oxígeno incrementa, lo cual ocasiona daños a nivel mitocondrial. Los niveles de NADH se elevan por la irrupción de la cadena de electrones y es ello lo que rompe la producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa (Livnat et al, 2010). Los astrocitos, como responsables de la alimentación neuronal, responden a los bajos niveles de glucosa y recurren a vías anaeróbicas para la producción de ATP, por lo que se han detectado altos niveles extracelulares de lactato y glutamato, en el cerebro (Sarrafzadeh et al, 2003).

Ante la incapacidad para captar y catabolizar la energía necesaria para su sustento, el cerebro inicia procesos que permiten economizar y reinvertir los recursos dentro del organismo para poder sobrevivir (Li et al, 2017). En mamíferos se evidenciaron fenómenos *in-vivo* como: decrecimiento de la termorregulación, decrecimiento de los costos de ventilación, aumento de la afinidad al oxígeno por parte del tejido y decrecimiento de las demandas aeróbicas (Wood & Malvin, 1991; Aboagye & Allen, 2014) lo que muy probablemente podría relacionarse con un decrecimiento de la BMR. El corto periodo de hipoxia, durante el IPC, demostró promover el uso eficiente de la energía producida mediante glicolisis anaeróbica reduciendo los procesos que consumen mayor energía; como la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, así como también el transporte activo de iones (Li et al, 2017). Es la demanda energética de la célula la que parece relacionarse con la baja resistencia a los estados prolongados de hipoxia.

La glicolisis, como el principal proceso anaeróbico para la producción de energía, se ve beneficiada por el IPC ya que se induce la producción del Factor de

transcripción de hipoxia inducible 1 (HIF-1) el cual promueve la síntesis de enzimas glicolíticas y transportadores de glucosa, como proceso prioritario para la supervivencia de la célula (Semenza, 2010). Todavía no es muy claro el o los mecanismos por los cuales un protocolo de preconditionamiento isquémico aumenta los niveles de O-GlcNAc que pueden reducir el volumen de infarto en el cerebro (Jensen et al, 2013) pero si se ha visto que el preconditionamiento aumenta los niveles de expresión y actividad enzimática de la enzima O-GlcNAc transferasa u OGT, que es la encargada en la transferencia del monosacárido a las proteína. Otros métodos invasivos han demostrado aumentar este tipo de modificaciones postraduccionales para disminuir el tamaño del infarto cerebral. Se ha demostrado que la Glucosamina (GLcN) produce cambios moleculares que protegen al tejido cerebral del daño a causa del infarto y que además genera respuesta antiinflamatorias que se relaciona también con el aumento de la síntesis de O-GlcNAc (Hwang et al, 2010).

Otro aspecto importante en cuanto a la O-GlcNAc, es que es una modificación postraducciona que puede llevarse a cabo en distintos lugares como: el núcleo, el citoplasma y la mitocondria, y que a diferencia de otras glicosilaciones que tienen cabida en el retículo endoplasmático; el monosacárido agregado a las proteínas (en el caso de la O-GlcNAc) es bastante pequeño a comparación de los oligosacáridos transferidos a las proteínas de membrana (Butkinaree et al, 2009). Ello resulta interesante teniéndose en cuenta las implicaciones tan importantes en las que está involucrada esta modificación postraducciona. Ella se obtiene por medio de la ruta biosintética de las Hexosaminas (HBP) en la cual entra en forma de fructosa-6-fosfato desde la glicolisis y es regulada gracias a dos enzimas: la O-GlcNAc transferasa (OGT) y la β -N-acetylglucosaminidasa (OGA) (Lazarus et al, 2009). La primera cumple la función de transferir el grupo O-GlcNAc y posee tres isoformas en la célula. La OGA, al contrario, cumple la función de retirar el azúcar y posee dos isoformas, una pequeña y una grande. Ambas enzimas permiten que haya reversibilidad en el proceso y que por ende, se regulen muchas funciones fisiológicas (Lazarus et al, 2009). Muchas de las enzimas que participan en la HBP pueden ser inhibidas. Entre las moléculas que actúan como inhibidores competitivos se encuentran: el DON que es un inhibidor de la GFAT, la cual isomeriza la glucosa-6-fosfato a glucosamina-6-fosfato y el ALLOXAN que inhibe a la OGT (Konrad et al, 2002; Gu et al, 2017). La figura 1 muestra el esquema general de la síntesis del grupo O-GlcNAc a través de la HBP y como la OGT la transfiere hacia la proteína a modificar.

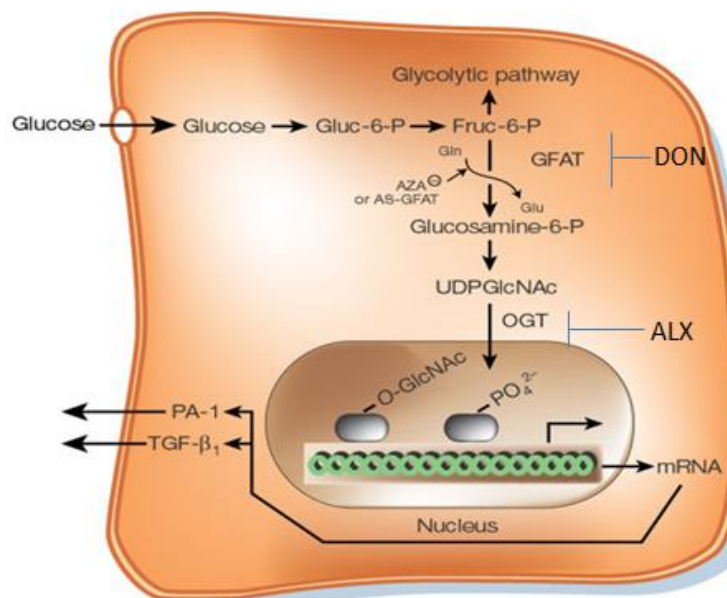


Figura 1. Esquema de síntesis de la O-GlcNAcilación a través de la HBP e inhibición de las enzimas principales en su síntesis. (Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. [Figura]. Recuperado de <https://www.nature.com/articles/414813a>. Esquemas de inhibidores fueron añadidos.

Se ha documentado que muchas de las enfermedades neurodegenerativas o tautopatías son debidas fallos en cuanto el funcionamiento correcto de la proteína Tau (Lazarus et al, 2009), que se encarga de mantener a los microtúbulos del citoesqueleto en su estado polimerizado. La unión entre Tau y el citoesqueleto, depende en que la primera esté en un estado particular de glicosilación y fosforilación. Cuando se da la obstrucción de una arteria (en el caso de una isquemia) y hay escasez de recursos, los niveles de glicosilación O-GlcNAc y la enzima OGT varían con el paso del tiempo. En las primeras dos horas se da un aumento de este tipo de modificación en algunas zonas del cerebro y luego disminuyen significativamente a con respecto a otras zonas, cuyo periodo de reducción no es tan significativo hasta después de 12 horas, pasada la oclusión (Gu et al, 2017). Con la disminución de la O-GlcNAc, la actividad de algunas cinasas y fosfatasas aumenta y se acumulan fosforilaciones en distintos sitios de Tau impidiendo su unión al microtúbulo y generando una inestabilidad en el citoesqueleto. Dichos daños en la maquinaria celular, activan vías pro-apoptóticas que terminan en la muerte programada de la célula (Butkinaree et al, 2009). La apoptosis está regulada por la familia de proteínas Bcl-2 que a su vez están reguladas por HIF-1 a través de vías que retardan la muerte celular (Li et al, 2017) y reduciendo la cantidad de tejido muerto.

2.2.3 Metabolismo de Animales Hibernadores VS No Hibernadores

Algunos estudios con animales que hibernan han demostrado que estos animales tienen una tolerancia ante los ACV mucho mayor que aquellos animales que no hibernan (Bogren & Drew, 2014). Las adaptaciones fisiológicas de los hibernadores parecen actuar de varias formas que no parecen ser totalmente dependientes de la temperatura (Nathaniel, 2008) y promueven una depresión metabólica capaz de trabajar a presiones parciales de oxígeno muy bajas por tiempos prolongados. Los animales no hibernadores, como en el caso de las ratas (Nathaniel, 2008; Bogren & Drew 2014) muestran una tolerancia significativamente menor a las bajas presiones parciales de oxígeno y respuestas de daño y de inflamación, más dramáticas antes de un ACV. Estudios comparativos en la universidad de Alaska (Bogren & Drew, 2014) concuerdan en que aún hay vacíos en cuanto al conocimiento de los mecanismos naturales que confieren tolerancia a la hipoxia por parte de los animales, pero se cree que es debida a la capacidad de estos animales para mantener un equilibrio ácido/base y el aumento del uso de ácidos grasos libres como fuentes de energía.

Estudios realizados (Andrews et al, 2008) demuestran que los cambios estacionales pueden estar relacionados con rutas específicas que aumentan, durante los meses de hibernación, como es la expresión del transportador de ácido monocarboxílico 1 (MCT1) y la reducción de la expresión de los transportadores de glucosa (GLUT1). El estudio de (Andrews et al, 2008) también realizó pruebas inmunohistoquímicas donde muestran que en roedores hibernadores la expresión de este tipo de transportadores MCT1 es mucho más alta que en ratas. Las razones de esta diferencia pueden atribuirse a que la oxidación de compuestos cetónicos provee una mayor cantidad de ATP a comparación de la glucosa, en las extremas condiciones del invierno. La liberación de grupos cetónicos, derivados de ácidos grasos, en ratas y otros mamíferos no hibernadores puede generarse también en estados de ayuno o dietas especiales (Puchowicz et al, 2008) altas en grasas, que generen la señal al cuerpo de los bajos niveles de glucosa y este tenga que recurrir a fuentes alternas de energía para seguir con su funcionamiento normal.

Grupos cetónicos como el R- β -hidroxibutirato (BHB) parecen involucrarse en procesos que contribuyen a evitar el daño al tejido cerebral en caso de un ACV (Zhang et al, 2014). Los grupos representan una fuente alternativa y eficiente para la producción de ATP durante la escasez de glucosa, y también parece que participan promoviendo los efectos generados por el preconditionamiento isquémico al regular positivamente los niveles de HIF-1 (Puchowicz et al, 2008). Los grupos cetónicos parecen inhibir la prolyl hidroxilasa que es la enzima encargada de degradar al factor y aumentando la expresión de proteínas anti-apoptóticas como las Bcl-2 (Puchowicz et al, 2008). Otro ácido graso como el ácido docosahexaenoico (DHA) no solo promueve el funcionamiento correcto del tejido cerebral, sino que ayuda a evitar respuestas inflamatorias y apoptóticas en caso de daños en el tejido cerebral (Tang et al 2018; Guo et al, 2017).

La dificultad de la investigación recae enormemente en la falta de información al respecto acerca de la relación RMB e isquemia cerebral, pero los artículos utilizados ayudan a explicar los resultados obtenidos y permitir que se abra una oportunidad de estudio a un aspecto que no se haya tenido en cuenta antes. Con ello pueden realizarse más estudios para develar un nuevo aspecto de la patología y desarrollar un tratamiento en el futuro.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo General:

Estudiar la relación que existe entre la Isquemia Cerebral y el Metabolismo basal de Ratas Wistar.

2.3.2 Objetivos específicos:

1. Cuantificar el volumen de isquemia cerebral en ratas Wistar con distintos tratamientos que afectan los mecanismos endógenos de protección celular en el cerebro.
2. Medir el metabolismo basal en las ratas Wistar, con isquemia cerebral, con distintos tratamientos que afectan los mecanismos endógenos de protección celular en el cerebro.
3. Determinar la relación entre el volumen de tejido cerebral infartado y el metabolismo basal en ratas Wistar.

2.4 Metodología

Con la aprobación del comité de ética, se utilizaron ratas de la cepa Wistar que fueron proporcionadas por el bioterio de la Universidad Icesi. El proyecto se dividió en dos partes, la primera fue la determinación del volumen de isquemia cerebral y la segunda fue la medición del consumo de oxígeno para calcular la BMR. Se destinó una muestra de 38 individuos para la primera parte y 58 para la segunda, que fuesen machos de tres meses de edad y con un peso superior o igual a los 300g. Los individuos fueron divididos en grupos experimentales que corresponden a la presencia o ausencia de DON y ALLOXAN como inhibidores de la O-GlcNAc, la presencia o ausencia de un protocolo de acondicionamiento isquémico, la presencia o ausencia de una isquemia y la interacción entre los mismos. Se realizaron las pruebas de García y Stanford, que evalúan distintos aspectos de la

motricidad y del comportamiento del animal. Lo anterior con el propósito de evaluar defectos neurológicos, previa y posteriormente a los procedimientos quirúrgicos y poder diferir entre el individuo en estado normal y el individuo en estado isquémico. Como anestésico general, se utilizó Isoflurano en cada uno de los procedimientos quirúrgicos y en el sacrificio para la extracción cerebral. Los procedimientos quirúrgicos fueron realizados por el profesor Carlos Cardozo y asistidos por mí. Los individuos Sham, fueron los controles negativos a los que solo se les aplicó anestesia y que se les realizaron las incisiones de las cirugías, con el fin de mostrar que no tienen ninguna influencia sobre el volumen de isquemia cerebral. Los controles positivos fueron los individuos a los que se les realizó isquemia, mediante la oclusión de la arteria cerebral media, para mostrar que el procedimiento si causa un ACV.

2.4.1 Inyección intraventricular de las ratas Wistar

Como indica en (Vera, 2016), el procedimiento inició con la aplicación Isoflurano, como anestésico, a través de la vía respiratoria y luego se procedió a hacer una incisión pequeña detrás de la zona ocular de la rata. Se removió la aponeurosis y el periostio dejando el cráneo desnudo en el lugar de unión de las suturas craneales. Posteriormente se utilizó un aparato estereotáxico para inyectar 10µL de los inhibidores de la glicosilación tipo O-GlcNAc en el hemisferio derecho. Para los grupos experimentales con ausencia de estos, se inyectó únicamente el vehículo del fármaco; así, de esta manera se hace un control para indicar que el procedimiento no genera efecto sobre la condición normal del individuo. El punto de inyección se obtiene a partir de las coordenadas antero-posterior (AP), dorso-ventral (DV) y lateral (LAT) de la zona de unión de las suturas craneales. Las coordenadas obtenidas a través del aparato estereotáxico fueron ingresadas a una hoja de cálculo que arrojó las nuevas coordenada de referencia al punto de inyección. Una vez la aguja penetra en el tejido, el suministro debe de tardar 1 minuto hasta completarse el volumen previsto para la inyección. Por último se realizaron las suturas y se dejó al individuo en reposo por 24h.

2.4.2 Protocolo de acondicionamiento Isquémico y Oclusión de la Arteria cerebral media (MCAo)

Como es mencionado en el trabajo (Vera, 2016) el protocolo consistió en una incisión en la zona de la región cervical del individuo. Utilizando pinzas de punta fina, se rompieron las fascias para poder separar los grupos musculares y poder llegar a la arteria carótida de cada lado; una vez identificada la arteria, ésta se separa de los grupos musculares para poder realizar el clampaje de ambas arterias. Para ello se utilizaron dos pinzas pequeñas con una superficie plástica para evitar el desgarro del tejido. Las arterias permanecen clampedas por un

tiempo de 3 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se removieron las pinzas y se realizaron las suturas. 30 minutos después de realizado el preconditionamiento isquémico, se procedió a ocluirse la arteria cerebral media derecha.

Como se explica en (Longa et al, 1998) la oclusión de la arteria cerebral media derecha (MCAo) se realizó a través de la inserción de un microfilamento de nylon dentro de la arteria carótida interna cervical (ICA) que viaja vía polígono de Willis hacia el lugar de destino y bloquea el flujo de sangre en la arteria cerebral media (MCA). Para evitar el flujo colateral de sangre se bloquearon las ramificaciones de la arteria carótida externa (ECA) y las demás ramificaciones de la ICA. El tiempo de oclusión fue de 75 minutos, transcurrido el tiempo se removió el microfilamento y se suturó al individuo. El individuo se dejó en reposo por 24h antes de sacrificarse.

2.4.3 Sacrificio, Tinción y Determinación del Volumen de Isquemia Cerebral

El Sacrificio de los individuos, como indica Vera 2016, se llevó a cabo de condiciones de anestesia profunda. Se realizó un corte grande en la región abdominal, luego se rompió el diafragma para el colapso de los pulmones. Por último se realiza un corte en la región torácica para realizar una perfusión general, desde el corazón con solución salina (PBS). Terminada la perfusión, se decapitó a los individuos y se les extrajo el encéfalo sin el bulbo olfativo ni el cerebelo. El encéfalo fue cortado con una cuchilla en siete láminas de 2mm de grosor, cada una.

A cada lámina se le retiraron las meninges y se adicionó a un recipiente con Cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolio (TTC). El recipiente fue puesto en un Shaker a 37°C y con ciclos de 5 minutos, sin presencia de luz. En promedio se realizaron 3 ciclos para la tinción total de las láminas cerebrales. Una vez teñidas las láminas, fueron fotografiadas con un estereoscopio con cámara.

Para el análisis de las fotografías, se utilizó el software Image J con el cual se determinaron las áreas de isquemia en los diferentes grupos experimentales. Los datos de las áreas de tejido sano de ambos hemisferios, en la cara anterior y posterior de cada lámina, fueron puestos en una matriz de Excel donde se calculó el volumen total de isquemia y el porcentaje de isquemia cerebral.

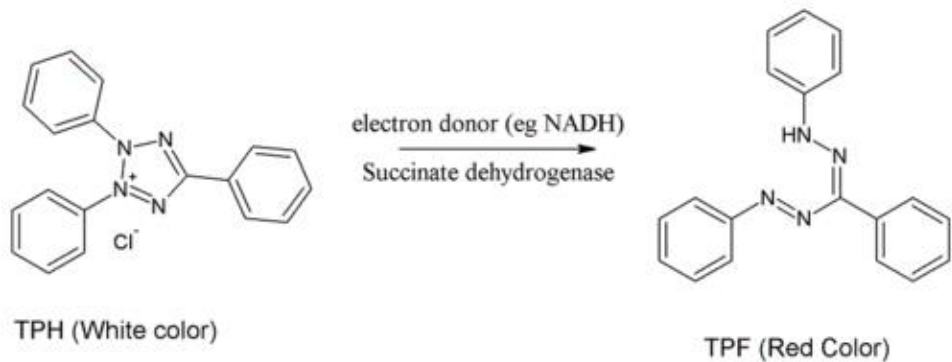


Figura 2. Mecanismo de acción del TTC como indicador del área sana en el tejido cerebral (Opwis et al, 2012).

El TTC utiliza el NADH producido en el metabolismo, durante el ciclo de Krebs, como un donador de electrones. Cuando la sal de amonio se reduce la molécula refleja la luz adquiriendo una tonalidad roja. Cuando la célula muere, el metabolismo se detiene, por lo que no será teñida por la sal por lo que esa porción de tejido se observará decolorada o con coloración blancuzca.



Figura 3. Fotografía de una lámina cerebral de un individuo sometido a MCAo y posteriormente teñida con TTC.

El contraste que genera la tinción por TTC es evidente y permite contrastar la porción de área de tejido que está viva (roja) de la que ha sufrido infarto (blanca). Después de realizar las tinciones se deben tomar las fotografías de las láminas cerebrales para poder hacer las mediciones correspondientes del volumen de isquemia, ya que con el tiempo las láminas se destiñen y resulta más problemático delimitar el área sana del área isquémica

Grupo Experimental	Precondicionamiento (P)	Isquemia (ISQ)	Inhibidores (DON + ALX)	n
Psham (control -)	Sí	No	No	5
ISQ (control +)	No	Sí	No	7
PISQ	Sí	Sí	No	8
DONSS (control -)	No	No	Sí	5
DONISQ (control +)	No	Sí	Sí	6
DONPISQ	Sí	Sí	Sí	7
			Total	38

Tabla 1 Grupos experimentales de los individuos destinados a la determinación del Volumen de Isquemia Cerebral, por medio de la tinción de láminas cerebrales con TTC. Cada grupo corresponde al conjunto de individuos que presentaban o carecían de la presencia de alguno de los tres tratamientos experimentales evaluados. N es el número de individuos del número de réplicas necesarias para garantizar que los datos tengan una robustez en cuanto a su significancia estadística. Sham hace referencia a los individuos anestesiados que solamente tienen las incisiones de los procedimientos quirúrgicos. P hace referencia a precondicionamiento e ISQ a la isquemia cerebral.

Medición del Consumo de Oxígeno

Se hizo un montaje que consistía en una bomba de aire conectada a un FLOW MEASURE SYSTEM el cual regulaba la cantidad el flujo de aire que llega a las cámaras de medición, donde se disponen a los individuos. En total son dos cámaras acrílicas para la medición. Ellas a su vez están conectadas a un FLOW MULTIPLEX, el cual trasmite la señal general del flujo de aire de ambas cámaras y lo alterna hacia el FOXBOX, el cual mide el flujo saliente de aire, la presión barométrica y regula el contenido de O₂ en el sistema. Por último el FOXBOX y los termómetros dispuestos en las dos cámaras, se conectan a un UI2 que traduce las señales y las registra el ordenador con el Software WarHog. Dentro del sistema se utilizó gel de Sílica y Soda lime para eliminar el vapor de H₂O y el CO₂, del registro, producidos durante respiración. Las mediciones se realizaron en condiciones como: temperatura de 23°C, con el animal dormido y sin que el animal

no haya ingerido alimento en al menos 1 hora. El estado de ayuno para una rata es de 12 horas sin alimentos, pero en este caso se desconocía la hora del último alimento de los individuos antes de salir del bioterio.

Las mediciones del consumo de oxígeno se realizaron para todos los individuos, en los grupos experimentales, durante tres etapas. En la primera, a manera de control, se utilizó individuos recién salidos del bioterio y sin ningún procedimiento realizado. En ésta etapa solo se utilizaron 14 individuos (Naïve) y los demás registros fueron realizados después de los procedimientos de inyección intraventricular en presencia de los inhibidores (ICDON) o su ausencia (ICVeh), de preconditionamiento (P) y de la isquemia o su ausencia. Previa y posteriormente a la medición se anotaron los valores que corresponde a las variables de Peso del individuo, Temperatura, Presión barométrica y flujo de aire. Una vez obtenido el registro de consumo de oxígeno, los registros se analizarán a través del software de LabAnalyst X RESPIROMETRY de Warthog. Este software ´calcula el VO₂ a partir de los registros de flujo de aire entrante y saliente de la cámara, y con el peso de cada individuo evaluado.

Para este objetivo, se utilizó un número de 58 individuos, lo cual no concuerda con el número total de mediciones realizadas en todos los grupos experimentales; esto es debido a que muchos de los individuos fueron utilizados para realizar las mediciones de consumo de oxígeno en más de una etapa procedimental, como se mencionó antes..



Figura 4. Sistema LabAnalyst X RESPIROMETRY de Warthog utilizado para la medición de BMR. El equipo fue utilizado para la medición del consumo de oxígeno del animal entero.

Grupo Experimental	IC Vehículo	IC Inhibidores (DON + ALX)	Sham Precondicionamiento	Precondicionamiento (IPC)	Sham Isquemia	Isquemia
Naive	No	No	No	No	No	No
ICVeh	Sí	No	No	No	No	No
ICDON	No	Sí	No	No	No	No
ShamS	Sí	No	Sí	No	Sí	No
Psham	Sí	No	No	Sí	Sí	No
ISQ	Sí	No	Sí	No	No	Sí
PISQ	Sí	No	No	Sí	No	Sí
DONSS	No	Sí	Sí	No	Sí	No
DONPSham	No	Sí	No	Sí	Sí	No
DONISQ	No	Sí	Sí	No	No	Sí
DONPISQ	No	Sí	No	Sí	No	Sí

Tabla 2. Grupos experimentales para los individuos destinados a la medición del consumo de oxígeno y cálculo de BMR. Los grupos experimentales fueron los mismos para la determinación del volumen de isquemia con TTC. Sham hace referencia a los individuos anestesiados que solamente tienen las incisiones de los procedimientos quirúrgicos, IC a inyección intra-ventricular, IPC a protocolo de preconditionamiento isquémico.

2.4.4 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos y creación de gráficas, se utilizó el software Graphpad Prism 5. Los datos paramétricos fueron tratados con pruebas de análisis de varianza (ANOVA) de una vía y posteriormente con pruebas POST HOC. En caso dado de que los datos fueran no paramétricos, se analizaron por una prueba de Kruskal-Wallis.

Para los datos de volumen de isquemia cerebral, teniendo en cuenta los supuestos estadísticos y que las muestras tenían un tamaño pequeño, se procedió con pruebas no paramétricas como Kruskal-Wallis para detectar diferencias entre

los grupos y posteriormente un test de Dunn para hacer múltiples comparaciones entre todos los grupos.

Los datos del consumo de oxígeno, que representan la tasa metabólica basal, fueron evaluados mediante los supuestos de homocedasticidad y normalidad, con las pruebas de Levene y Kolmogorov-Smirnov. Al incumplirse el supuesto de normalidad, los datos fueron analizados mediante pruebas no paramétricas, como Kruskal-Wallis, el test de comparación múltiples de Dunn para todos los grupos. Los análisis que requerían comparaciones individuales fueron realizados mediante Wilcoxon para los datos dependientes y Mann-Whitney para los independientes.

2.4.5 Matriz de Marco Lógico

Objetivo General: Estudiar la relación que existe entre la Isquemia Cerebral y el Metabolismo basal en Ratas Wistar.

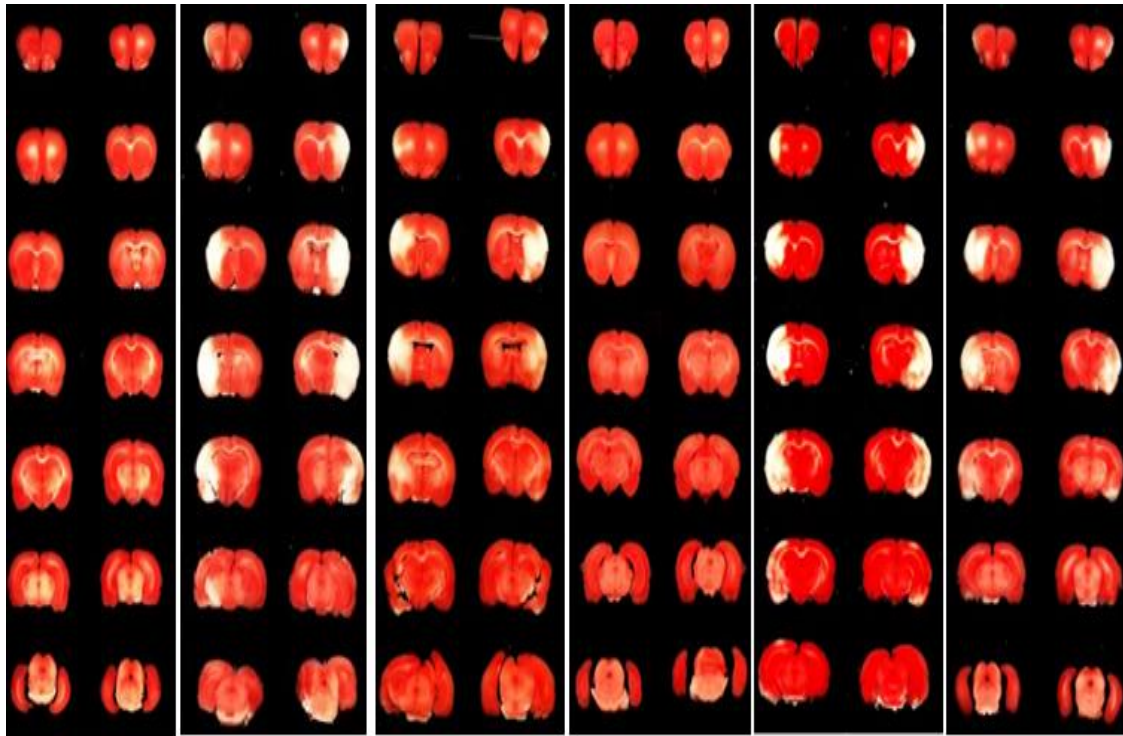
Objetivos	Actividades	Supuestos	Indicadores
1. Determinar el volumen de isquemia cerebral a partir de los efectos de tratamientos, sobre los mecanismos endógenos de protección celular en el cerebro.	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Inyección interventricular con o sin inhibidores de la O-GlcNAc ❖ Realización de protocolo de acondicionamiento ❖ Oclusión de la arteria cerebral (MCAo) ❖ Sacrificio de individuos y extracción cerebral ❖ Preparación del Cloruro de 2,3,5- 	<ul style="list-style-type: none"> • Aprobación por el comité de ética de la Universidad Icesi • Disponibilidad de Individuos machos de preferiblemente 3 meses de edad y con peso superior a 300g • Isoflurano 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Infarto cerebral Realizado ✓ Pruebas neurológicas Evaluadas ✓ Tinción del cerebro, en láminas, con Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) Realizado ✓ Determinar el área de infarto obtenidas

	<p>trifeniltetrazolol (TTC)</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Cultivo de láminas cerebrales ❖ Fotografía de laminas ❖ Mediciones de área de infarto en ImageJ ❖ Calculo de volumen de isquemia cerebral 	<p>como anestésico</p> <ul style="list-style-type: none"> • Disponibilidad del Equipo de inyección estereotáxico, equipo quirúrgico, de sacrificio y extracción cerebral. • Insumo y equipo para la tinción de láminas cerebrales • Estereoscopio con cámara • Software ImageJ 	<p>en las láminas cerebrales</p> <p>Determinado</p>
<p>1. Cuantificar el metabolismo basal en las ratas Wistar con isquemia cerebral, a partir de los efectos de tratamientos sobre los mecanismos endógenos de protección celular en el cerebro.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Estandarización del sistema para la medición del consumo de oxígeno ❖ Peso de alimentación igual para todos los individuos ❖ Cámaras de medición dispuestas con 12g de aserrín ❖ Medición simultaneo de dos individuos por registro de 	<ul style="list-style-type: none"> • Disponibilidad del equipo para ensamblar el sistema para medición de consumo de oxígeno • Gel de sílice y Soda lime • Cámara 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Consumo de oxígeno Cuantificado ✓ Temperatura inicial y final Registrada ✓ Flujo de Aire inicial y final del procedimiento Registrado ✓ Presión barométrica inicial y final del procedimiento Registrado

	<ul style="list-style-type: none"> ❖ tres horas ❖ Monitoreo de las condiciones del sistema y del animal antes, durante y después del procedimiento ❖ Medición previa y posterior a los procedimientos quirúrgicos ❖ Análisis de los datos 		<ul style="list-style-type: none"> ✓ Peso inicial y final del individuo Cuantificado
<p>2. Determinar la relación entre el volumen de tejido cerebral infartado y el metabolismo basal en ratas Wistar.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Análisis estadístico y discusión de los datos obtenidos para ambas variables 	<ul style="list-style-type: none"> • Disponibilidad del software para el análisis estadístico • Disponibilidad de bibliografía pertinente 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Volumen de tejido infartado Cuantificado ✓ Porcentaje de oxígeno consumido Cuantificado ✓ Correlación entre ambas variables Analizado

2.5 Resultados:

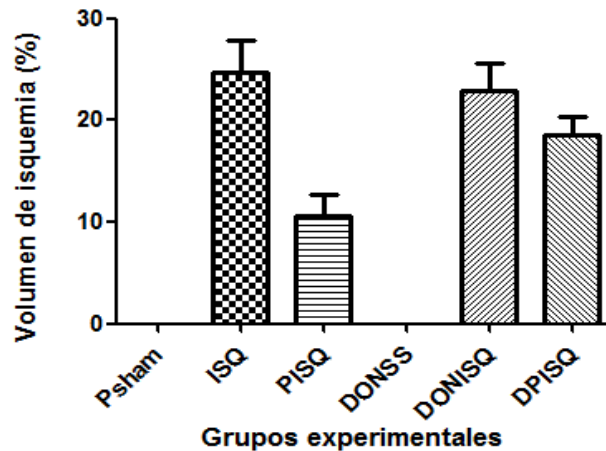
2.5.1 Determinación del Volumen de Isquemia Cerebral



Psham 0440	ISQ 0334	PISQ 0433	DONSS 0642	DONISQ 0659	DPISQ 0630
• Vol. Sano = 693,567 mm ²	• Vol. Sano = 698,578 mm ²	• Vol. Sano = 784,718 mm ²	• Vol. Sano = 698,738 mm ²	• Vol. Sano = 746,744 mm ²	• Vol. Sano = 626,628 mm ²
• Vol. ISQ = 0 mm ²	• Vol. ISQ = 264,886 mm ²	• Vol. ISQ = 143,935 mm ²	• Vol. ISQ = 0 mm ²	• Vol. ISQ = 249,674 mm ²	• Vol. ISQ = 144,308 mm ²
• Isquemia = 0%	• Isquemia = 37,915%	• Isquemia = 18,342%	• Isquemia = 0%	• Isquemia = 33,435%	• Isquemia = 23,029%

Figura 5. Resultados de las pruebas histoquímicas con TTC.

Estos resultados permiten contrastar las diferencias entre los grupos experimentales. Los controles negativos Psham y DONSS exhiben una coloración completa debido a la ausencia de tejido infartado, a diferencia de los controles positivos de ISQ y DONISQ. Las descripciones bajo las fotografías, de los cerebros expuestos, muestran diferencias significativas del porcentaje de isquemia como resultado de todos los tratamientos empleados.



Gráfica 1. Volumen de tejido isquémico promedio en los grupos experimentales. Se evaluó el efecto del IPC y del bloque de la HBP con Don y ALX (5mM, cada uno, en 10µL de inyección) para estudiar sus efectos en la isquemia cerebral, en 75min de oclusión de la arteria cerebral media. Los efectos de la isquemia a nivel motor se corroboraron a través de pruebas neurológicas como el Test de García y el Test de Stanford. Se realizó test de Kruskal- Wallis, siendo significativo para $P < 0,05$.

Para analizar los 6 grupos, se realizaron las pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y de homogeneidad de Leven. Para un $\alpha = 0,05$ los resultados no fueron significativos para el test de Leven. Por ello y debido a un n igual a 5 en la mayoría de los grupos experimentales, se utilizaron análisis no paramétricos como la prueba de Kruskal-Wallis con $\alpha = 0,05$. Los resultados fueron significativos para un valor $P < 0,001$.

Posteriormente se hizo una comparación de todos los grupos experimentales para saber entre cuáles de los grupos habían diferencias significativas y en cuáles no. Se procedió con el test de múltiple comparación de Dunn con $\alpha = 0,05$. No se encuentran diferencias significativas en más de la mitad de los grupos experimentales.

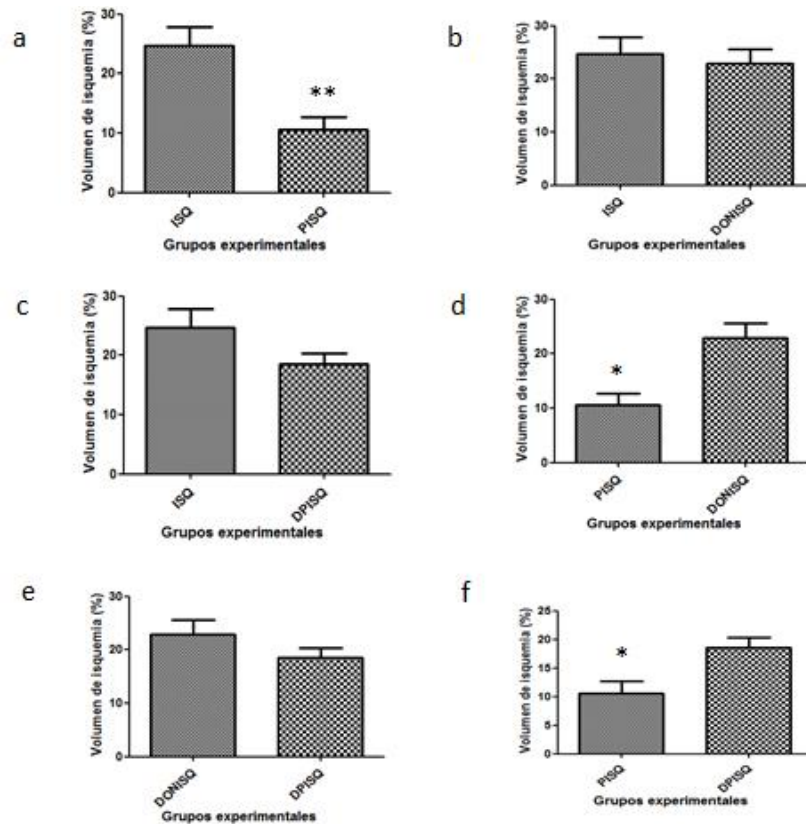
Posiblemente los resultados estaban siendo afectados por los resultados de los contrales negativos, donde el volumen de tejido isquémico es cero, así que se realizaron los mismos análisis realizados en la gráfica 1 pero únicamente utilizando los controles positivos.

La gráfica 1 contrasta los volúmenes de isquemia en las láminas de cerebros teñidas con TTC. Para los individuos del grupo Psham, a los que se les hizo únicamente el protocolo de preconditionamiento isquémico (IPC) y la cirugía

para realizar la MCAo, sin que se llevase a cabo la oclusión de la arteria, se obtuvo un promedio de 0,0% de tejido muerto, es decir que el IPC no genera muerte del tejido. Esto demuestra que los procedimientos quirúrgicos no tienen ningún efecto sobre el desarrollo de una isquemia o que ejerzan algún tipo de influencia en el volumen de ésta. El resultado se repite para el promedio entre los individuos del grupo DONSS, en el cual se han practicado las mismas incisiones de los procedimientos quirúrgicos (Exceptuando el protocolo de preconditionamiento isquémico) y que además se le aplicó el conjunto de inhibidores de la O-GlcNAc. Este resultado refuta cualquier idea sobre la posible influencia de DON y ALLOXAN como factores que generen muerte del tejido, en el cerebro. De esta manera se obtuvieron los controles negativos del experimento.

De la otra mano con los controles positivos, los individuos del grupo ISQ a los que se les realizó el procedimiento de la MCAo tuvieron un porcentaje promedio de isquemia del $24,720\% \pm 8,272$; lo que demostró que al ocluirse una arteria cerebral media, se puede generar muerte en una gran porción del tejido. Para los individuos del grupo DONISQ a los que también se les practicó la MCAo y que se les inyectaron los inhibidores de la O-GlcNAc, el porcentaje promedio del tejido que sufrió isquemia fue del $22,920\% \pm 6,598$. Con lo anterior se concluye que la metodología de MCAo permite inducir una isquemia cerebral.

Los grupos experimentales como PISQ y DPISQ arrojaron un porcentaje promedio de tejido isquémico del $10,620\% \pm 5,905$ y $18,610\% \pm 4,504$; respectivamente. Cabe aclarar la presencia del inhibidor de la O-GlcNAc en el segundo grupo experimental. A primera vista, lo que se observa con los datos obtenidos, es que la aplicación del protocolo de preconditionamiento isquémico reduce la cantidad de tejido muerto a comparación del grupo ISQ donde el infarto tomaba una parte importante del hemisferio derecho. Un caso contrario parece darse cuando el preconditionamiento se realiza en individuos que previamente han sido inyectados con los inhibidores de la vía que adiciona la O-GlcNAc, a las proteínas. En este caso los resultados muestran que la proporción de tejido isquémico no presenta una reducción tan significativa, como en el caso anterior.



Gráfica 2. Comparación del volumen de isquemia entre los diferentes grupos experimentales, utilizando controles positivos ISQ y DONISQ, sin controles negativos. Se evaluó el efecto del IPC y del bloque de la HBP con Don y ALX (5mM, cada uno, en 10µL de inyección) para estudiar sus efectos en la isquemia cerebral, en 75min de oclusión de la arteria cerebral media. Se realizaron las pruebas neurológicas de García y de Stanford. Se realizó Test de Kruskal-Wallis, **, $P < 0,005$ para todos los grupos y Test de Dunn para las parejas. A (ISQ vs PISQ) con ($n=7$ para ISQ y $n=8$ para PISQ), **, $P < 0,05$. D (PISQ vs DONISQ) con ($n=8$ para PISQ y $n=6$ para DONISQ), *, $P < 0,05$. Test T de Student para F (PSQ vs DPISQ) con ($n=8$ para PISQ y $n=7$ para DPISQ), *, $P < 0,05$.

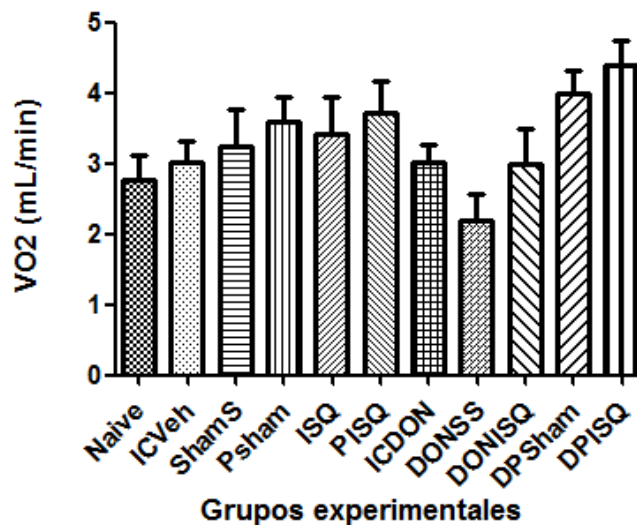
Se usó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un $\alpha = 0,05$. Para este análisis se compararon los grupos con los controles positivos ya que al no tener un volumen de isquemia de 0% no habría problemas con las desviaciones. Los resultados arrojaron diferencias significativas para un valor P de 0,0066.

Las comparaciones entre parejas se realizaron con el test de múltiple comparación de Dunn y se graficó cada comparación. Los resultados que se muestran en la Gráfica 2 fueron significativos para las comparaciones **a** y **d**, y no significativos para **b**, **c** y **e**. Esto concuerda, claramente, con lo expresado en la gráfica.

La gráfica 2 contrasta los grupos experimentales para mostrar que el protocolo de preconditionamiento isquémico activa mecanismos protectores en el cerebro, que como puede evidenciarse, disminuyen el tamaño del infarto cerebral. También tratan de abordar el hecho de que uno de los mecanismos de protección implicado es la O-GlcNAc, debido a que si inhibición de su síntesis no permite que haya una disminución del tamaño de la isquemia.

Teniendo que los grupos de la comparación f que fueron PISQ y DPISQ tenían un n mayor o igual a 7 se decidió hacer un test paramétrico T de Student para comparar las medias, siguiendo los supuestos. Con un $\alpha = 0,05$ los resultados fueron estadísticamente significativos para el test T para un valor P de 0,0122. Esto puede explicar el comportamiento de la comparación F y los resultados previos con las pruebas de comparaciones múltiples.

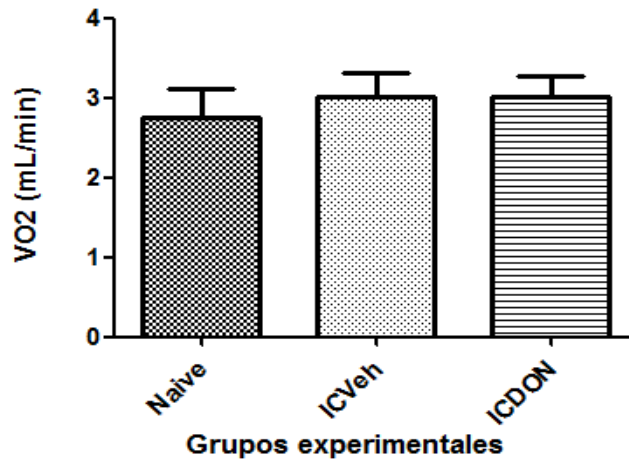
2.5.2 Medición de la Tasa Metabólica Basal (BMR)



Gráfica 3. Tasa metabólica basal promedio en los diferentes grupos experimentales. A los individuos se les realizaron mediciones en cada una de las fases quirúrgicas del experimento. Sin cirugía, con inyección y con los distintos tipos de tratamientos a evaluar. Test de Kruskal-Wallis, ns, $P > 0,05$ y Test de Dunn, no significativo, $P > 0,05$ para todos los grupos comparados.

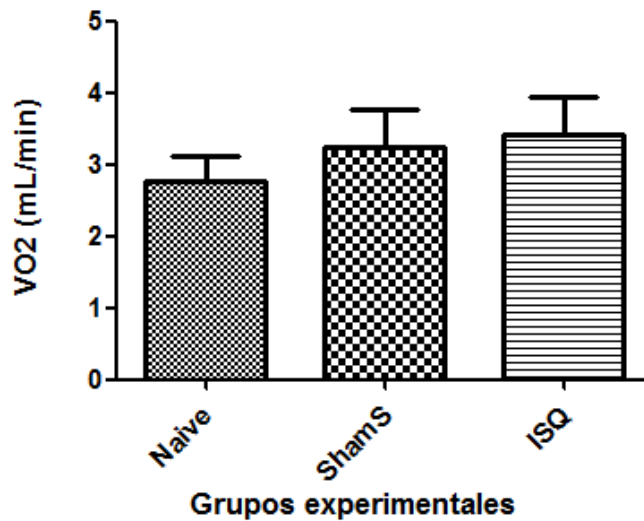
Para evaluar los supuestos se realizaron las pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y de homogeneidad de Levene para un $\alpha = 0,05$. Para la prueba de homogeneidad los resultados no fueron significativos por lo que se procedió a un análisis no paramétrico.

Los grupos se compararon por una prueba de Kruskal-Wallis con $\alpha = 0,05$ y posteriormente una prueba de comparación múltiple de Dunn. En ambos casos la prueba estadística no encontró diferencias significativas entre los grupos con un valor P de 0,0820. Por lo tanto se concluye que no hay cambios en el consumo de oxígeno neto del animal.



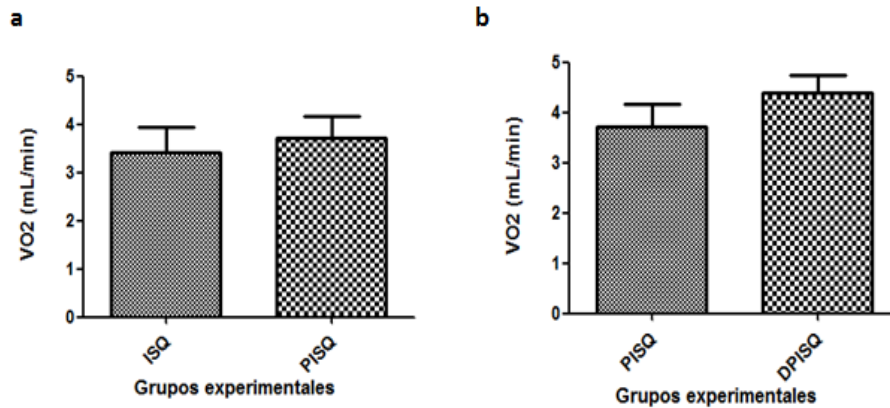
Gráfica 4. Efecto de la Inyección intra-cerebral (ICV) sobre la Tasa Metabólica Basal. Siendo el primer procedimiento invasivo que experimentarían los individuos, se quiso evaluar si el daño al tejido durante el procedimiento podía causar cambios significativos en el consumo de oxígeno del animal. Test de Kruskal-Wallis, ns, $P > 0,05$ y Test de Dunn, ns, $P > 0,05$ para los grupos evaluados.

La comparación se realizó a través de una prueba de Kruskal-Wallis con $\alpha = 0,05$ y posteriormente una comparación múltiple de Dunn. Los resultados no detectaron significancia estadística, para un valor P de 0,6076. Por lo que la ICV con inhibidores o con vehículo no altera el consumo de oxígeno neto del animal.



Gráfica 5. Efecto de una isquemia cerebral sobre la Tasa Metabólica Basal. Siendo las incisiones de las cirugías de IPC y de MCAo más invasivas que la de ICV, se evaluó el consumo de oxígeno de los individuos con el fin de saber si hay cambios significativos debido al daño en los tejidos del animal. Posteriormente se evalúa el consumo de oxígeno realizada la isquemia en el tejido. Test de Kruskal-Wallis, ns, $P > 0,05$ y Test de Dunn, ns, $P > 0,05$ para los grupos evaluados.

La comparación se realizó a través de una prueba de Kruskal-Wallis con $\alpha = 0,05$ y posteriormente una comparación múltiple de Dunn. Las pruebas no detectaron significancia estadística, por lo que las incisiones y la isquemia cerebral no alteran el consumo de oxígeno neto del animal.



Gráfica 6. Comparación de la Tasa Metabólica Basal entre los grupos experimentales. A muestra la comparación entre el grupo ISQ y el grupo PISQ para evaluar el efecto neuroprotector del IPC sobre el metabolismo basal de un cerebro con isquemia. B muestra la comparación entre el grupo PISQ y DPISQ para evaluar el efecto, sobre el metabolismo basal, de la inhibición de uno de los mecanismo neuroprotectores, más importantes, que son inducidos por el IPC. Para **A** (ISQ vs PISQ) con (n= 5 para ISQ y n=7 para PISQ) Se realizó comparación por U de Mann-Whitney, ns, $P > 0,05$. Para **B** (PISQ vs DPISQ) con (n=7 para PISQ y n= 6 para DPISQ) se realizó comparación por U de Mann-Whitney, ns, $P > 0,05$.

La comparación se realizó a través de una prueba de Kruskal-Wallis con $\alpha = 0,05$ y posteriormente una comparación múltiple de Dunn. Las pruebas no detectaron significancia estadística con un valor P de 0,7308 para **A** y de 0,3173 para **B**. Por lo tanto las incisiones y la isquemia cerebral no alteran el consumo de oxígeno neto del animal.

Grupo	Masa Corporal Promedio (g)	S.D
DONISQ	312,64	1,57
DONSS	300,24	0,83
DPISQ	310,69	0,96
DPSham	302,13	0,84
ICDON	320,22	1,15
ICVeh	311,04	1,25
ISQ	310,07	1,31
Psham	309,45	0,86
Naive	315,52	1,23
ShamS	312,55	1,50
PISQ	304,41	1,21

Tabla 3. Masa corporal promedio de los individuos en cada grupo experimental. La BMR es una medida que no solo depende del estado termorregulatorio, digestivo y de movimiento. La BMR aumenta de forma directamente proporcional con el peso del animal. Desviación Estándar (S.D).

Discusión:

2.5.3 Determinación del Volumen de Isquemia Cerebral:

En los resultados, si se remite a la Gráfica 1 puede verse que los controles utilizados son efectivo para contratar a los grupos experimentales, debido a que los controles positivos demuestran que el IPC y los inhibidores no influyen al desarrollo de una isquemia cerebral y que por otra parte, la MCAo si es un método eficaz para inducir una isquemia cerebral. Si se compara el grupo PISQ contra los controles positivos ISQ y DONISQ, hay una clara disminución de la cantidad de tejido muerto y que también la comparación contra el grupo DPISQ muestra la disminución del tamaño del infarto. Sin embargo la presencia de los controles negativos, con valor cero, afecta el análisis que busca encontrar diferencias en las varianzas de los dato. La Gráfica 2 compara el volumen de isquemia cerebral, de los grupos, por parejas. Las comparaciones más importantes son: la **a** entre ISQ y PISQ, muestra que el IPC sí parece activar la tolerancia isquemica en el tejido (Dirnagl et al, 2003) y la comparación **f** entre PISQ y DPISQ parece indicar, mediante la inhibición de la HBP, que la O-GlcNAc es uno de los mecanismos más importantes de tolerancia isquémica. Las comparaciones, entonces, muestran que a pesar de realizar un IPC; la presencia de los inhibidores de la O-GlcNAc ocasiona que no haya una disminución en el tamaño de los infartos, debido a que no existen diferencias significativas entre el grupo DPISQ y los controles positivos.

Los resultados son más visibles en la Figura 4, en donde se pueden comparar los grupos de forma cualitativa. Las fotos de las láminas cerebrales teñidas permiten respaldar los resultados graficados. Así, los controles negativos Psham y DONSS, muestran en todas láminas la ausencia de tejido muerto. Por parte de los positivos puede evidenciarse todo lo contrario. Para ISQ y DONISQ las tinciones muestran la presencia de tejido muerto por isquemia. Comparando las tinciones de ambos tipos de controles con las de los grupos experimentales, se pueden ver cambios

importantes. En primer lugar y el más evidente, es el de PISQ. En este grupo hay un menor número de láminas que muestran la presencia de tejido muerto. Si se comparan estas laminas con los controles positivos, es evidente que el área isquémica tiene un volumen menor. En el caso del grupo DPISQ, los infartos eran casi del mismo tamaño a los controles positivos y por ende en este grupo también tenía un mayor volumen de isquemia en comparación al grupo PISQ.

Este estudio hace una combinación de tratamientos que, claramente, generan un tipo de efecto sobre el volumen de isquemia cerebral. Los estudios de (Gu et al, 2017) concuerdan, con los resultados obtenidos, en que la inhibición de la O-GlcNAc, a través de la irrupción de su síntesis con DON incrementa el infarto cerebral. En (Gu et al ,2017) también inhibieron a la OGA con 0,1µg de Thiamet-G lo cual permitió que niveles moderados de O-GlcNAc aumentaran y que el volumen de infarto disminuyese. El uso de mayores concentraciones de este último inhibidor, ocasiona que los niveles de O-GlcNAc aumenten considerablemente (Gu et el, 2017). Cuando la concentración de O-GlcNAc aumenta mucho, no hay disminución del volumen de isquemia y el tamaño del infarto va del 25-45%. El resultado es parecido al del grupo ISQ de este estudio y también a los del grupo de isquemia con presencia de los inhibidores. La O-GlcNAc, parece cumplir su rol protector contra la isquemia, cuando la concentración de esta no es ni muy alta ni muy baja (Gu et al, 2017) ya que de lo contrario los resultados sería muy similar al de una isquemia sin ningún tipo de tratamiento extra.

Es bastante evidente que el volumen de isquemia para el grupo PISQ, al que se le aplicó el protocolo de IPC, es mucho menor a comparación de los demás. El contraste más interesante resulta de la interacción entre el IPC y los inhibidores DON y ALX. En este caso, parece que los inhibidores son los principales responsables de anular los efectos de tolerancia isquémica que induce el IPC. El IPC tiene varios mecanismos de acción, para generar el estado de tolerancia isquémica (Dirnagl et al, 2003) y particularmente se ha visto que puede aumentar los niveles de expresión de la OGT (Jensen et al, 2013) y del HIF-1 (Semenza, 2010). Con base en lo anterior podemos suponer que al realizar un IPC, se aumenta el nivel de glicosilaciones O-GlcNAc en las proteínas del cerebro, ya que aumenta la expresión de la enzima responsable de la adición del grupo. El aumento en los niveles de glicosilación darse a unas concentraciones óptimas, para que el tejido adquiriera tolerancia (Lazarus et al, 2009; Li et al, 2017). El aumento en la expresión de la OGT, también podría generar una represión en la expresión de la enzima OGA que es su antagonista (Lazarus et al, 2009). Con la OGA inactiva, las glicosilaciones se mantienen en las proteínas y se evita la

acumulación de estados de fosforilación, en los microtúbulos, para que no se activen las rutas apoptóticas (Lazarus et al, 2009)

La supervivencia del tejido también depende de la inversión que haga este para el catabolismo y anabolismo (Sarrafiadeh et al, 2003; Li et al, 2017). Ciertamente los mecanismos moleculares de la célula empiezan a girar en torno la poca disponibilidad de ATP y oxígeno (Wood & Malvin, 1991; Aboagye & Allen, 2014) por lo que la célula debe utilizar esos recursos lo mejor posible, reduciendo algunas funciones fisiológicas y aumentando otras de mayor importancia. La irrupción del flujo de oxígeno al tejido provoca un incremento del metabolismo anaeróbico y como se mencionó antes, el IPC también genera la expresión del HIF 1 (Semenza, 2010) que manda señales para la síntesis de proteínas glicolíticas y transportadores de glucosa. Adicionalmente, este factor contribuye a la expresión de proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 (Li et al, 2017). Es por estos motivos que podría creerse que si a un individuo lo preconditionan antes de un posible ACV hay mayores probabilidades de que el impacto sea menor y se salve tejido importante.

En el caso de la inducción de IPC en presencia de los inhibidores de la O-GlcNAc antes del suceso de una isquemia, los resultados serían diferentes. Como se muestran con el grupo DPISQ, el resultado del volumen de isquemia sería muy parecido al de un cerebro isquémico sin protocolo de IPC. Pareciese que los inhibidores anularan los efectos neuroprotectores de la célula preconditionada.

El Don y el ALLOXAN son inhibidores competitivos para varias enzimas fundamentales en la HBP (Lee et al, 2006; Gu et al, 2017). El Don inhibe al GFAT, que es la enzima responsable de isomerizar la fructosa-6-fosfato (Butkinaree et al 2009), que entra en la HBP, para que se forme la glucosamina-6-fosfato y continúe el proceso hasta formarse el uridín difosfato-N-acetilglucosamina (UDP-O-GlcNAc). El ALX inhibe a la OGT, que como ya se ha mencionado, transfiere el grupo O-GlcNAc hacia una proteína. Esta adición la hace desde el UDP-O-GlcNAc (Butkinaree et al 2009). También se ha descrito que además de la OGT, el ALX resulta ser selectivo para la OGA y parece que esta tiende a responder de forma parecida; al igual que la OGT (Lee et al, 2006). La inhibición de estas dos enzimas significa, entonces, un paro definitivo para la síntesis de O-GlcNAc. Según los estudios de (Konrad et al, 2002) el ALX a una concentración 1mM inhibe por completo a la OGT y desde 0,1mM ya se ha alcanzado la mitad de la máxima inhibición. Para la OGA, (Lee et al, 2006) describe un comportamiento casi que idéntico a lo sucedido con la OGT. Al inyectar ambos inhibidores, entonces no sólo se está interrumpiendo la síntesis de O-GlcNAc a través de la imposibilidad de utilizar la materia prima, sino que también se podría estar anulando el sistema de regulación de la modificación.

En este experimento, del grupo de fisiología celular animal, se inyectó a los individuos con una mezcla de Don y ALX a una concentración de 5,0mM, cada uno. Si tenemos en cuenta la información suministrada en (Konrad et al, 2002; Lee et al, 2006) se entiende que si con poco más de 0,1mM de ALX ya se está inhibiendo más de la mitad de la OGT presente, con 5mM no debería de quedar nada de la OGT en su estado activo. Aunque la OGA también presenta una respuesta inhibitoria ante la presencia de ALX, su completa inhibición requiere una concentración más alta que la OGT (Lee et al, 2006). Teniendo en cuenta eso, puede darse el caso de que una actividad mayor de la OGA, antes de su inhibición, contribuya a que se controle la expresión de la OGT (Lazarus et al, 2009). A la luz de lo anterior entonces podría pensarse que el afecto del IPC en cuanto al aumento de la expresión de la OGT sea bloqueado, en primera instancia por la presencia del inhibidor a una concentración que alcanza a bloquear la nuevas enzimas expresadas y en segunda estancia porque podría darse el caso de que hubiese una cantidad de OGA activa que ejerce una presión sobre la expresión de su antagonista.

El hecho de que inhibir la adición de la O-GlcNAc, a las proteínas, como mecanismo de protección neuronal, inducido por el IPC, lleve a que el IPC no produzca ningún cambio significativo en el volumen de tejido isquémico puede significar que es uno de los mecanismos neuroprotectores más importantes y efectivo, en un ambiente con estrés por la hipoxia. Puede pensarse que los demás mecanismos que son inducidos por el IPC no tienen un efecto tan potente, a comparación de la O-GlcNAc para generar tolerancia, pero puede que si cumplan funciones de tolerancia que son imposibles de medir por este método. Por último podría pensarse que para que una célula sea tolerante a condiciones de hipoxia, ocasionadas por un isquemia, es más importante que se mantenga la estabilidad e integridad celular; a nivel estructural y molecular. Los cambios metabólicos que se ajusten al ambiente de estrés celular pueden depender de ello. Si es cierto, la O-GlcNAc podría ser un mecanismo necesario para que la célula obtenga estabilidad y pueda generar cambios fisiológicos.

2.5.4 Medición de la Tasa Metabólica Basal (BMR)

El cerebro al ser el órgano encargado del procesamiento de las distintas señales entre el organismo y el medio ambiente, es un órgano que demanda una cantidad grande de nutrientes y oxígeno, a comparación de otros órganos o tejidos del organismo animal, si se piensa en la relación entre su masa con respecto a la masa del cuerpo entero (Jain et al, 2010). Por ello se pensaría que una patología

que daña una gran parte del cerebro, como lo es la isquemia cerebral, repercutiría sobre el metabolismo (Lakhan et al, 2009). La BMR es una medida metabólica que no presenta sesgos por termorregulación, digestión o movimiento (Luna et al, 2017). En la Gráfica 3, se presentan las tasas metabólicas promedio de todos los grupos experimentales, en general, y no se muestran diferencias significativas. Debido que las comparaciones realizadas en los análisis para la determinación del volumen de isquemia, habían arrojado diferencias en algunos grupos, se esperaba que dichos grupos también las presentasen en los análisis de VO₂. Por la cantidad de procesos implicados en la tolerancia isquémica que demandan un alto gasto de energía (Bier, 1999; Dirnagl et al, 2003)

En la gráfica 4 hay una comparación entre los individuos Niave con un VO₂ de $2,763 \pm 1,233$ mL/min, el cual sería la BMR normal en una rata Wistar. Los individuos sometidos a inyección intraventricular con Don y ALX (ICDon) y únicamente al vehículo (ICVeh) en promedio obtuvieron un VO₂ de $3,008 \pm 1,147$ mL/min y $3,009 \pm 1,251$ mL/min, respectivamente. La comparación pretendía evaluar si el simple hecho de la inyección y los daños al tejido, durante el procedimiento, producían algún cambio en el VO₂ y por lo tanto en la BMR. El análisis no resultó significativo, pero quería verse si había un gasto energético significativo que el cuerpo invirtiese para los procesos de regeneración de tejido. Podría ser que los cambios a nivel de tejido y son tan pequeños que el método utilizado no tuviese la sensibilidad suficiente para detectarlos, porque evalúa el VO₂ del animal entero.

En la gráfica 3 se observa que el grupo DONSS es el que presenta el valor más bajo de VO₂, a pesar de que no hay muerte de tejido, como se muestra en la figura 4. Esto es contradictorio por que en un cerebro con todas sus células vivas, se supondría que su gasto energético es mayor que el de un cerebro idéntico, pero con parte de su tejido, muerta. Pueden haber distintas razones por las cuales hubo un descenso del VO₂ correspondiente al grupo DONSS. Una, es que las glicosilaciones no sólo se encargan de ayudar al buen funcionamiento de miles de proteínas involucradas en distintos procesos importantes para la vida (Moremen et al, 2012) si no que también están involucradas en los procesos de secreción proteica para que las proteínas sintetizadas estén en su lugar y que se reduzcan las posibilidades del desarrollo de patologías (Moremen et al, 2012 ; Ricciardiello et al, 2018). La síntesis de proteínas es entonces un proceso de mucha demanda energética, no solo por el hecho mismo de la síntesis (Bier, 1999), sino por los procesos que la regulan. Si se tiene todo esto presente, entonces hay fundamento para pensar que un descenso en el VO₂ podría estar relacionado con la energía que ya no es invertida en el proceso de síntesis y modificación postraduccional de las proteínas, por la inhibición de la HBP.

La otra explicación puede ser el hecho de que la BMR es directamente dependiente a la masa corporal (Luna et al ,2017) y los individuos de ese grupo son los de menor masa a comparación del resto (286-310g). Se esperaría entonces que tengan el menor valor de VO₂ con respecto a los demás grupos experimentales. El grupo DONSS tiene otra particularidad, desde el punto de vistas estadístico, y es que posee un n de 5 que sería el más bajo de entre todos los grupos evaluados.

Para la gráfica 5 en la cual se buscaba evaluar el efecto de la isquemia cerebral sobre el metabolismo basal, se compararon 3 grupos: Naive, ShamS e ISQ. La razón de utilizar al grupo ShamS es saber si las incisiones de las cirugías de IPC y MCAo pueden afectar el VO₂, ya que este grupo cuenta con la anestesia y las incisiones de las cirugías pero no el bloqueo de arterias. Los resultados no arrojaron diferencias significativas. El VO₂ de Naive $2,763 \pm 1,233$ mL/min no es diferente del VO₂ del grupo con isquemia cerebral $3,418 \pm 1,311$ mL/min. Se esperarían diferencias porque siendo el cerebro un órgano tan costoso, debería haber una diferencia, de la energía que se consume, si una porción importante de él se muere (Jain et al, 2010).

La gráfica 6 hace una comparación entre los grupos **a** entre ISQ y PISQ, y **b** entre PISQ y DPISQ. Estadísticamente los resultados no presentan diferencias significativas. En la comparación **a** el grupo PISQ no presenta diferencias significativas con ISQ. Se esperaría que si la misma comparación en función del volumen de isquemia, hecha en la gráfica 2 a, dónde el volumen de isquemia es mucho menor para PISQ que en ISQ, también habrían diferencias entre las tasas metabólicas basales de ambos grupos. Si se tienen en cuenta todos los diferentes mecanismos inducidos por el IPC, se esperaría que debiese tener un impacto sobre el metabolismo basal del animal (Dirnagl et al, 2003; Moremen et al, 2012 ; Li et al, 2017). El organismo invierte energía en síntesis y control de síntesis de las proteínas, y eso representa un gasto energético grande. El estado de tolerancia isquémica no solo parece preparar a la célula para racione los recursos disponibles, sino también para que la maquinaria celular se vuelve estable ante el estrés y así recurrir otro tipo de producción de energía (Wood & Malvin, 1991; Sarrafzadeh et al, 2003; Semenza, 2010; Aboagye & Allen, 2014; Li et al, 2017). Esos mecanismos en conjunto son muy caros para el organismo, pero es necesaria para que pueda sobrevivir la mayor cantidad de tejido dada una isquemia (Bier, 1999; Gu et al, 2017). También si tenemos en cuenta de que al haber menos volumen de isquemia, hay un mayor número de células vivas y por ende se esperaría que hubiese un mayor gasto energético que pudiese evidenciarse en las mediciones de VO₂.

En el caso de la comparación **b** entre PISQ y DPISQ a pesar de tampoco es significativa, ni siquiera por las diferencias en la masa promedio del grupo DPISQ con el grupo PISQ, en más de 5g. En este grupo se esperaría el mismo resultado que se esperaría para la comparación anterior, teniendo en cuenta que los análisis de volumen de isquemia, en la gráfica 2 f, mostraban el volumen de isquemia cerebral era significativamente menor en PISQ con respecto a DPISQ. Ello sería lo esperado, porque según lo mencionado previamente, en cuanto el grato energético que implica el IPC, la presencia de Don y ALX inhibiendo la HBP deberían estar impidiendo la glicosilación de muchas proteínas. Por lo tanto la energía invertida, por los individuos de DPISQ, debería ser menor y el VO₂ también, con respecto a PISQ. Aunque no se esperaría que la diferencia fuese tan grande como con el grupo ISQ, porque puede que los otros mecanismos de tolerancia isquemica también tengan una influencia sobre el metabolismo basal (Semenza, 2010).

2.5.5 Relación entre una Isquemia Cerebral y el Metabolismo Basal

Los resultados esperados predecían que a mayor volumen de isquemia, el metabolismo basal debería ser más bajo. Los resultados obtenidos en el estudio son distintos. Permiten hacerse una idea de lo que puede estar sucediendo, pero no hacer una conclusión concisa respecto a la relación que ambas variables pudiesen tener. La literatura consultada me permitió que se formularan ideas de los posibles sucesos en un temática sin casi referencias disponibles.

La isquemia cerebral al ser una patología que causa la muerte de una porción de tejido cerebral, debido al estrés celular por falta de nutrientes e hipoxia, genera daños moleculares que pueden evidenciarse a simple vista (Lakhan et al, 2009). Análisis neurológicos adicionales, tendían a mostrar parálisis en los animales después de una hora ocurrida la isquemia (Alonso De Leciñana, 2003). Los resultados más dramáticos parecían ser de aquellos individuos con un mayor volumen de isquemia que se supone es equivalente a una gran cantidad de conexiones muertas. Esa cantidad de conexiones muertas representan a un tejido que ya no realiza metabolismo por el mismo hecho de estar muerto. El desarrollo de métodos como el IPC logró evidenciar que había mecanismos por los cuales el tejido podía volverse tolerante ante el ambiente de estrés causado por la isquemia (Dirnagl et al, 2003). Los análisis de TTC revelaron que cuando se aplica un IPC antes de generarse una isquemia cerebral, la cantidad de tejido muerto es mucho menor si se contrasta con aquellos individuos que no fueron acondicionados. Como puede verse en la gráfica 2 a.

Muchos trabajos han descrito algunos de los mecanismos inducidos por el IPC que confieren el estado de tolerancia isquémica a la célula y entre ellos podemos ver elevaciones en los niveles de glicosilación O-GlcNAc, la expresión de HIF-1 y proteínas anti-apoptóticas, y supresión metabólica (Wood & Malvin, 1991; Sarrafzadeh et al, 2003; Semenza, 2010; Jensen et al, 2013; Aboagye & Allen, 2014; Li et al, 2017). Cabe aclarar, que la supresión metabólica no parece ser el simple hecho de disminuir el consumo de energía, sino que al parecer es invertir esa energía en procesos que son de vital importancia para la célula (Wood & Malvin, 1991; Sarrafzadeh et al, 2003; Aboagye & Allen, 2014). Los resultados de los análisis con TTC también resaltaron que la inhibición de la HBP, que sintetiza a la O-GlcNAc, parecen anular los efectos de este mecanismo de tolerancia isquémica, por lo que no hay reducción del tejido muerto (Konrad et al, 2002; Lee et al, 2006; Gu et al, 2018). Esto parece explicar que la O-GlcNAc es uno de los mecanismos endógenos de tolerancia isquemia más importantes.

La comparación de los resultados de la determinación del volumen de isquemia cerebral con el metabolismo basal del animal no parecen seguir lo esperado. El metabolismo animal mide el consumo mínimo de oxígeno durante condiciones específicas que permiten atribuir esa medida a la del gasto energético de las funciones vitales del organismo (Luna et al, 2017). Sin significancia, en ninguno de los resultados de la medición de la tasa metabólica basal, resulta casi imposible decir si el volumen de isquemia es inversamente proporcional al consumo de oxígeno. Ello puede deberse a que la metodología utilizada no fuese la más apropiada para dicha medición por diferentes motivos, que se mencionarán más adelante. En las gráficas no se muestran diferencias significativas de VO₂ cuando se aplica el IPC al individuo en comparación de los individuos con isquemia y lo que se pensaría es que deberían haber diferencia por todos los procesos a nivel de expresión y síntesis de proteínas que se llevan a cabo (Wood & Malvin, 1991; Sarrafzadeh et al, 2003; Semenza, 2010; Moremen et al, 2012; Jensen et al, 2013; Aboagye & Allen, 2014; Li et al, 2017). Se esperaría igualmente que debiera haber un aumento del VO₂ de los grupos con IPC en comparación de los grupos que además de haberles aplicado un IPC también tenían la presencia de los inhibidores de la HBP, por el simple hecho de que al inhibir la ruta, entonces no podrían darse muchos procesos de alto costo energético. Sin embargo hay factores que pueden interferir con el resultado esperado y que el método experimental no puede controlar.

La literatura explica que cuando hay una isquemia cerebral, hay una zona del tejido que está destinada a morir (núcleo) mientras que la zona circundante (penumbra) puede ser salvada si se actúa a tiempo (Dirnagl et al, 2003; Lakhani et al, 2009). El tejido cerebral al ser tan dependiente del metabolismo aeróbico,

tiende a morir rápido si no hay suministros de nutrientes y oxígeno (Lakhan et al, 2009; Jain et al, 2010). Durante una isquemia, el cerebro empieza a buscar alternativas para obtener energía y opta por las vías anaerobias, que a pesar de ser una buena estrategia, el cerebro no puede obtener la misma cantidad de ATP que con el mecanismo aerobio (Li et al, 2017). La actividad de la glicosilación intenta aumentar en algunas zonas para que la célula pueda seguir funcionando, pero después de 1h la O-GlcNAc disminuye sus concentraciones y las células de la zona isquémica comienzan a hacer apoptosis porque no pueden obtener la energía necesaria para realizar sus funciones vital (Jensen et al, 2013; Gu et al, 2017).

Cuando se realiza un IPC, se preconditiona todo el órgano y no sólo la zona de riesgo. Este método no solo induce que hayan aumentos en la glicosilación, sino que se aumente la expresión de enzimas glicolítica, de transportadores de glucosa y proteínas que evitan las señales de apoptosis en la célula (Sarrafzadeh et al, 2003; Semenza, 2010; Moremen et al, 2012; Jensen et al, 2013; Li et al, 2017). Así mismo el tejido empieza a volverse más sensible a concentraciones pequeñas de oxígeno y solo se invierte energía en síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas (Wood & Malvin, 1991; Aboagye & Allen, 2014). Todos estos procesos aumentan el metabolismo del animal para que el órgano pueda estar preparado y ser tolerante ante la isquemia. Cuando se inhibe la HBP el VO₂ se esperaría que disminuyese casi parecido al de un individuo al que no se le realizó IPC (Konrad et al, 2002; Lee et al, 2006). Pero también debería tenerse en cuenta que la diferencia entre los individuos pre condicionados, con inhibidores (DPISQ) y los individuos con isquemia (ISQ), es que en los primeros aún hay mecanismos tolerantes activados en el tejido que pueden estar consumiendo energía. Parece entonces que la O-GlcNAc estabiliza no solo la maquinaria de la célula, sino que también su estructura (Lazarus et al, 2009). Por eso podría creerse que para que la célula pueda ser tolerante ante el estrés causado por la isquemia, la integridad de la célula debe de ser estable.

A la luz de lo anterior, cuando el cerebro es tolerante ante la isquemia, va a tener un volumen de isquemia menor y por todos los mecanismos involucrados, el animal debería tener un VO₂ mayor. Cuando el volumen de isquemia es mayor, el VO₂ del animal debería ser menor, al menos con respecto a los individuos preconditionados. La O-GlcNAc parece ser uno de los mecanismo que más gasta energía porque los individuos con IPC e inhibidores (DPISQ) tienen un volumen de isquemia cerebral parecido a los individuos sufrieron de isquemia (ISQ e DONISQ) y por lo tanto un VO₂ también parecido.

Las ideas presentadas son ideas, puesto que la metodología para medir el VO₂ tal vez no fue la mejor para evaluar lo que está ocurriendo exclusivamente en el

cerebro. El sistema mide el consumo de oxígeno entero del animal, por lo que el metabolismo basal medido era el del animal en sí. Aunque el cerebro es el órgano que más energía demanda, no parece haber detección de cambios importantes a causa de la isquemia o los tratamientos que afectan los mecanismos endógenos de tolerancia isquémica con la metodología usada. Puede que se deba a que el volumen de tejido isquémico representa menos del 25% del órgano y que la relación entre la masa del cerebro y la masa corporal no sea la misma que en los humanos y que entonces los cambios sean más leves y no puedan ser detectados así. Otra cosa que afectó los resultados es que la metodología no limita al máximo el movimiento del animal y que el peso entre los diferentes grupos varió mucho. Por ello podría pensarse en otra metodología que sea más sensible a cambios pequeños del VO₂ y que nos permita evaluar el metabolismo del órgano sin la influencia del resto del cuerpo.

2.6 Conclusiones:

A partir del estudio realizado, es difícil decidir cuál es la naturaleza de la relación entre el volumen de isquemia cerebral y el metabolismo basal de las ratas Wistar. En la literatura consultada existen muchos estudios acerca de las respuestas moleculares causadas por la isquemia cerebral y de algunos de los tratamientos experimentales que parecen conferir tolerancia isquémica al tejido. Dichos estudios permiten pensar en que existe una relación inversamente proporcional entre ambas variables porque el metabolismo aeróbico parece disminuir en la zona afectada y es reemplazado por las rutas anaeróbicas.

Un método para llegar a la tolerancia isquémica es el IPC, que se encarga de activar varios mecanismos endógenos de protección celular y uno de los más importantes es la glicosilación O-GlcNAc, que al parecer se ha demostrado que puede reducir el tamaño de la isquemia brindando estabilidad a la maquinaria celular. Este tipo de modificación involucra procesos de expresión y síntesis que pueden ser los responsables de un aumento del metabolismo basal ocurrido una isquemia. Se dice que es uno de los mecanismos de tolerancia isquémica porque su inhibición evita la reducción del tamaño del infarto en el cerebro.

La dificultad para responder la pregunta problema de este estudio, puede recaer en que la metodología de medición no fue la que podría haberse ajustado más a las necesidades del estudio. En primer lugar porque la medición del metabolismo se hizo en el animal entero, no solamente del cerebro. En segundo lugar, la masa de los individuos varía mucho y algunos de ellos tenían valores de masa corporal

relativamente bajos. La masa corporal es uno de los principales factores que afectan este tipo de mediciones y en tercer lugar, la cámara no es un lugar en el cual se reduzca completamente el movimiento del animal, por lo que habían momentos en los que el animal se movía para acomodarse o acicalarse y la energía utilizada para moverse también quedaba registrada en forma de VO₂. Por ello sería ideal contar con una metodología que permita la medición del VO₂ del cerebro, únicamente, y así saber si hay cambios significativos en la tasa metabólica basal si se varía el tamaño de isquemia cerebral en presencia de los tratamientos que afectan los mecanismos endógenos de tolerancia isquémica.

2.7 Recomendaciones:

Lo más conveniente para estudiar la relación y el efecto de una isquemia cerebral y los tratamientos que afectan los mecanismos endógenos de protección celular, sobre el metabolismo basal es hacer las mediciones del consumo de oxígeno del órgano in-vivo, sin que haya interferencia por metabolismo del resto del cuerpo. Una opción muy utilizada en salud es la tomografía de emisión de positrones (PET), pero el costo del equipo es muy alto. Para ello otra opción recomendable sería utilizar cultivos celulares a lo que se le aplicarían los tratamientos experimentales. El VO₂ de los cultivos podría ser medido a través de un microrespirómetro que contenga soda lime y gel de Sílica para absorber el vapor de agua y CO₂ producidos en la respiración celular, algunos otros microrespirómetros utilizan KOH para precipitar el CO₂. Trabajos como los de (Levasseur, 2000) utilizaban este tipo de métodos para cuantificar el oxígeno consumido en los cultivos cerebrales. Hoy en día existen microrespirómetros en tiempo real, que permiten seguir la actividad metabólica microbiana o de cultivos celulares, mediante su alta sensibilidad

El metabolismo basal sería más fácil de medir, en teoría. El cultivo no podría moverse. Las células cultivadas pueden mantenerse a 37°C, durante la medición, que es la temperatura corporal interna de un mamífero y por último puede hacerse la simulación del ayuno proporcionando una menor cantidad de nutrientes al cultivo, con respecto a la cantidad normalmente utilizada para la manutención del mismo. Las desventajas con los cultivos, es que ellos no responden de igual manera a las células in-vivo y se debe que las células son muy sensibles y se necesita que las células estén adheridas a un medio que tenga las condiciones óptimas estandarizadas que exige el estudio para poder trabajar con ellas y obtener el tipo de respuesta esperada. Las células animales tienen crecimientos lentos y demandan nutrientes muy específicos. Eso hace que sean costosos los

ensayos y hay alto riesgo de contaminación por la mala manipulación de los medios.

Adicionalmente podrían hacerse pruebas para analizar la presencia de metabolitos como el lactato, que es el producto principal de la ruta anaeróbica de la glicolisis. Así podría saberse si uno de los mecanismos de tolerancia isquémica inducidos por el IPC genera un aumento en la expresión de enzimas glicolíticas para producir una mayor cantidad de energía a través del metabolismo anaeróbico.

2.8 Bibliografía:

- A. S. Sarrafzadeh, K. L.-A. (2003). Metabolic changes during impending and manifest cerebral hypoxia in traumatic brain injury. *British Journal of Neurosurgery*, 1-8.
- Aboagye DL, A. P. (2014). Metabolic and locomotor responses of juvenile paddlefish *Polyodon spathula* to hypoxia and temperature. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 1-6.
- Amir Livnat, E. B.-M. (2010). Real-time monitoring of spatial and temporal metabolic changes during focal cerebral ischemia in rats. *Brain Research*, 1-8.
- Bier, D. M. (1999). The Energy Costs of Protein Metabolism: Lean and Mean on Uncle Sam's team. En I. o. Committee on Military Nutrition Research, *The Role of Protein and Amino Acids in Sustaining and Enhancing Performance* (págs. 109-121). Washington D.C: National Academy Press.
- Brooke D. Lazarus¹, Dona C. Love¹, John A. Hanover *. (27 Marzo 2009). O-GlcNAc cycling: Implications for neurodegenerative disorders. *ELSEVIER*, 41, 1-11.
- Chutikarn Butkinaree, Kyoungsook Park, Gerald W. Hart. (9 Agosto 2009). O-linked β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *ELSEVIER*, 1800, 1-10.

- Drewab, L. K. (2014). Ischemia/reperfusion injury resistance in hibernators is more than an effect of reduced body temperature or winter season. *Temperature*, 1-3.
- EZ Longa, PR Weinstein, S Carlson and R Cummins. (1989). Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *STROKE*, 20, 1-9.
- Facundo Luna, H. N. (2017). Understanding evolutionary variation in basal metabolic rate: An analysis in subterranean rodents. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1-8.
- Francesca Ricciardiello, G. V. (2018). Inhibition of the Hexosamine Biosynthetic Pathway by targeting PGM3 causes breast cancer growth arrest and apoptosis. *Cell Death and Disease*, 1-17.
- González, A. V. (2016). *Evaluación del efecto neuroprotector de la glucosamina sobre la o-glicosilación y otras vías de señalización intracelular en dos modelos de isquemia cerebral focal en la rata wistar adulta (tesis doctoral)*. Cali: universidad del valle.
- Hill, R. W. *Animal Physiology* (2012). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- Jin-hua Gu, J. S.-l.-b.-h.-X. (2017). O-GlcNAcylation Reduces Ischemia-Reperfusion-Induced Brain Injury. *Nature*, 1-12.
- Joseph E. Levasseur,¹ Beat Alessandri,² Michael Reinert,² Ross Bullock,² and H.A. Kontos¹. (2000). Fluid Percussion Injury Transiently Increases Then Decreases Brain Oxygen Consumption in the Rat. *JOURNAL OF NEUROTRAUMA*, 17, 1-11.
- Kelley W. Moremen, M. T. (2012). Glycans associated with cell surface and intracellular diversity, synthesis and function. *Nature*, 1-15.
- Malvin, S. C. (1991). Behavioral thermoregulation of the toad, *Bufo marinus*: Effects of air humidity. *Journal of Experimental Zoology*, 1-5.

- María Alonso De Leciñana. (2003). GUÍA NEUROLÓGICA 8. CAPITULO 9 Madrid: Asociación Colombiana de Neurología.
- Matthiew T. Andrews, K. P.-G. (2008). Adaptative Mechanisms regulate preferred utilization of ketones in the heart and brain of an hibernating mammal during arousal from torpor. *American Physiological Society* , 1-11.
- Michelle A Puchowicz¹, J. L. (2008). Neuroprotection in diet-induced ketotic rat brain after focal ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 1-10.
- Nathaniel, T. I. (2008). Brain-regulated metabolic suppression during hibernation: a neuroprotective mechanism for perinatal hypoxia–ischemia. *International Journal of Stroke*, 1-8.
- P.L. Rodríguez García, L. R. (2010). Diagnosis of delayed cerebral ischaemia and cerebral vasospasm in subarachnoid haemorrhage. *Neurología*, 1-4.
- Powers, W. L. (2017). Oxygen metabolism in acute ischemic stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 1-19.
- Ramsay, K. J. (2011). Direct Animal Calorimetry, the Underused Gold Standard for Quantifying the Fire of Life. *National Institute of Health*, 1-26.
- Rebekka Vibjerg Jensen, j. J. (2013). Ischemic preconditioning increases myocardial o-glcnac glycosylation. *Scandinavian cardiovascular journal*, 1-8.
- Robert J. Konrad, F. Z. (2002). Alloxan is an inhibitor of the enzyme O-linked N-acetylglucosamine transferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1-6.
- Semenza, G. L. (2010). Hypoxia-inducible factor 1: Regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1-6.
- Shaheen E Lakhan, A. K. (2010). Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *Journal of Translational Medicine*, 1-11.

- Sijie Li, A. H. (2017). Preconditioning in neuroprotection: From hypoxia to ischemia. *Progress in Neurobiology*, 1-13.
- So-young Hwang, J.-H. S.-s.-y.-a.-s.-b.-k. (2010). Glucosamine exerts a neuroprotective effect via suppression of inflammation in rat brain ischemia/reperfusion injury. *Glia*, 1-12.
- Tang R, Lin Y-Mei, Liu H-Xing, Wang E-Song, Neuroprotective effect of docosahexaenoic acid in rat traumatic brain injury model via regulation of TLR4/NF-Kappa B signaling pathway, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (2010), <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.03.017>
- Thomas N. Lee, W. E. (2006). Alloxan is an inhibitor of O-GlcNAc-selective N-acetyl-b-D-glucosaminidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1-6.
- Ulrich Dirnagl¹, Roger P. Simon² and John M. Hallenbeck. (2003). Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *TRENDS in Neurosciences*, 26, 1-7.
- Varsha Jain, Michael C Langham and Felix W Wehrli. (2010). MRI estimation of global brain oxygen consumption rate. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 30, 1-10.
- Witty M. (2012). Topographischer Nachweis der Keimfähigkeit der Getreidefrüchte durch Tetrazoliumsalze (Topographic Detection of Germination in Cereal Crops by Tetrazolium Salts) — A Translation of Lakon's 1942 Paper on Tetrazolium Seed Testing. *Seed Technology* 34. 275-282.
- World health statistics 2017: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Yifan Zhang, S. Z.-V. (2014). Decreased Carbon Shunting from glucose toward oxidative metabolism in diet-induced ketonic rat brain. *JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY*, 1-12.

Anexos :

Grupos experimentales	Sujeto	% Isquemia
PSham	0341	0,000
	0344	0,000
	0386	0,000
	0440	0,000
	0688	0,000
ISQ	0334	37,915
	0442	22,895
	0452	23,128
	0460	34,064
	0588	21,080
	0660	14,561
	0694	19,541
PISQ	0415	6,992
	0433	18,342
	0449	14,857
	0450	13,715
	0581	16,404
	0636	2,305
	0684	7,018
	0697	5,312
DONSS	0612	0,000
	0640	0,000
	0641	0,000
	0642	0,000
	0643	0,000
DONISQ	0564	21,200
	0565	22,402
	0568	19,259
	0578	26,916
	0629	14,287
	0659	33,435
DPISQ	0441	24,926
	0570	21,145
	0573	17,979

	0586	14,851
	0630	23,029
	0579	15,061
	0591	13,248

Anexo 1: Datos del Porcentaje de Isquemia Cerebral en los individuos utilizados

Grupo	Rata	Fecha	Masa (g)	VO2 (mL/min)	S.D	S.E	CV (%)
DONISQ	0814	20170902	297,4	1,868	0,052	3,00E-03	2,788
	0707	20170906	299,4	1,978	0,009	5,46E-03	0,478
	0834	20170914	285,6	1,184	0,01	5,85E-03	0,856
	0890	20170914	302,6	1,415	0,034	1,99E-03	2,443
	0941	20171027	332,1	4,232	0,018	1,09E-03	0,447
	0922	20171028	307,0	2,663	0,036	2,11E-03	1,373
	0914	20171028	327,0	4,58	0,055	3,23E-03	1,222
	0934	20171104	326,3	5,044	0,163	9,00E-03	3,242
	0923	20171114	324,6	5,102	0,037	2,19E-03	0,744
	0848	20170830	324,4	1,806	0,014	8,59E-03	0,824
DONSS	0759	20170908	286,1	1,392	0,081	4,71E-03	5,87
	0762	20170908	292,6	1,927	0,061	3,52E-03	3,17
	0824	20170915	292,0	1,511	0,016	9,52E-04	1,093
	0928	20171114	319,6	3,171	0,081	4,71E-03	2,578
	0942	20171116	310,9	2,968	0,017	1,02E-03	0,596
DPISQ	0870	20170902	298,0	4,705	0,397	1,60E-02	8,457
	0840	20170906	304,7	4,298	0,127	7,35E-03	2,967
	0876	20170914	288,7	4,7	0,109	6,32E-03	2,334
	0888	20170914	305,6	5,099	0,031	1,83E-03	0,62
	0898	20170915	299,3	5,557	0,07	4,06E-03	1,266
	0938	20171027	341,9	2,673	0,163	9,00E-03	6,13
	0932	20171104	336,6	3,668	0,091	5,28E-03	2,499
DPSham	0816	20170908	284,1	3,515	0,073	4,23E-03	2,087
	0823	20170908	291,8	3,583	0,046	2,70E-03	1,308
	0940	20171114	305,8	4,931	0,037	2,14E-03	0,754
	0915	20171114	310,9	2,76	0,102	5,92E-03	3,722
	0970	20171116	298,3	4,792	0,022	1,27E-03	0,469
	0865	20170830	321,9	4,301	0,07	4,07E-03	1,643
ICDon	0814	20170901	315,6	2,716	0,163	0,009	6,026
	0870	20170901	301,6	1,456	0,076	4,44E-03	5,288

	0876	20170913	316,2	2,898	0,059	3,42E-03	2,047
	0834	20170913	313,9	1,021	0,041	2,41E-03	4,091
	0888	20170914	317,1	4,145	0,014	8,53E-04	0,357
	0890	20170914	316,0	1,734	0,017	1,01E-03	1,014
	0898	20170914	306,3	3,952	0,016	9,34E-04	0,409
	0824	20170914	306,7	1,672	0,122	7,05E-03	7,318
	0941	20171026	345,4	2,593	0,089	5,15E-03	3,442
	0938	20171026	332,6	4,429	0,147	8,00E-03	3,328
	0922	20171027	315,1	1,363	0,267	1,00E-02	11,324
	0914	20171027	329,0	4,298	0,045	2,64E-03	1,063
	0924	20171104	351,5	2,238	0,164	9,00E-03	7,365
	0926	20171104	292,1	3,767	0,022	1,29E-03	0,594
	0923	20171113	340,5	4,662	0,137	7,00E-03	2,952
	0928	20171113	336,7	3,166	0,015	9,06E-04	0,496
	0940	20171113	318,0	4,245	0,068	3,94E-03	1,61
	0915	20171113	318,3	2,032	0,108	6,26E-03	5,34
	0970	20171116	310,0	4,347	0,055	3,22E-03	1,285
	0942	20171116	321,8	2,669	0,095	5,53E-03	3,591
ICVeh	0825	20170901	301,0	3,779	0,046	2,68E-03	1,228
	0763	20170901	328,5	1,487	0,055	3,18E-03	3,712
	0842	20170904	309,4	3,809	0,059	3,44E-03	1,567
	0742	20170904	310,1	1,839	0,115	6,66E-03	6,281
	0839	20170906	313,3	3,928	0,033	1,91E-03	0,842
	0868	20170906	311,9	1,634	0,029	1,71E-03	1,811
	0698	20170907	309,2	4,062	0,236	1,30E-02	5,827
	0738	20170907	301,3	1,565	0,075	4,37E-03	4,844
	0739	20170908	310,7	4,14	0,1	5,81E-03	2,434
	0846	20170908	308,6	1,873	0,051	2,95E-03	2,73
	0627	20170912	310,7	4,119	0,045	2,63E-03	1,109
	0871	20171023	307,9	1,95	0,078	4,53E-03	4,03
	0891	20171023	302,8	4,343	0,058	3,35E-03	1,352
	0906	20171024	304,5	2,151	3,78E-03	2,18E-04	0,175
	0815	20171024	321,8	4,71	0,037	2,14E-03	0,786
	0869	20170831	312,4	4,261	0,012	7,19E-04	0,292
0764	20170831	323,5	1,501	0,014	8,44E-03	0,975	
ISQ	0825	20170901	297,2	4,407	0,051	2,97E-03	1,17
	0764	20170901	308,2	1,837	0,075	4,33E-03	4,086
	0871	20171024	302,1	2,183	0,088	5,08E-03	4,036
	0906	20171025	295,5	2,754	0,106	6,13E-03	3,863
	0815	20171025	309,6	4,504	0,07	4,07E-03	1,569
	0943	20171103	347,8	4,824	0,064	3,69E-03	1,327
Naive	0840	20170901	306,4	2,601	0,155	9,00E-03	5,966
	0707	20170901	304,5	1,332	0,039	2,29E-03	2,08
	0839	20170905	320,0	3,118	0,092	5,34E-03	2,969

	0868	20170905	318,4	1,531	0,074	4,29E-03	4,856
	0627	20170911	306,2	3,716	0,051	2,97E-03	1,387
	0892	20170911	323,5	1,474	0,114	6,60E-03	7,769
	0876	20170912	315,6	3,872	0,075	4,36E-03	1,954
	0834	20170912	318,3	1,465	0,023	1,36E-03	1,614
	0833	20171115	302,3	4,542	0,086	4,98E-03	1,902
	0757	20171115	311,5	2,39	0,312	1,80E-02	13,084
	0970	20171115	334,2	4,773	0,009	5,47E-04	0,198
	0942	20171115	325,3	2,345	0,057	3,29E-03	2,434
PISQ	0763	20170901	306,2	1,825	0,027	1,57E-03	1,488
	0869	20170901	312,4	4,621	0,108	6,27E-03	2,352
	0739	20170909	298,0	4,047	0,022	1,27E-03	0,543
	0627	20170913	293,1	3,229	0,027	1,62E-03	0,859
	0891	20171024	298,5	4,925	0,234	1,30E-02	4,766
	0933	20171103	342,8	2,502	0,123	7,13E-03	4,94
	0900	20171125	279,9	4,796	0,077	4,47E-03	1,617
Psham	0817	20170807	303,5	4,177	0,028	1,64E-03	0,681
	0839	20170907	306,5	4,055	0,082	4,77E-03	2,041
	0925	20171107	331,7	2,688	0,074	4,31E-03	2,782
	0908	20171111	316,2	4,322	0,053	3,08E-03	1,237
	0946	20171111	316,6	3,948	0,069	4,01E-03	1,76
	0760	20171125	282,2	2,317	0,057	3,29E-03	2,461
ShamS	0845	20170831	309,1	4,468	0,028	1,65E-03	0,642
	0742	20170905	312,8	4,412	0,026	1,55E-03	0,609
	0868	20170907	300,0	2,157	0,014	8,31E-03	0,67
	0846	20170909	309,1	1,464	0,034	1,97E-03	2,335
	0892	20170913	304,9	1,453	0,05	2,92E-03	3,449
	0969	20171107	330,4	4,704	0,043	2,53E-03	0,933
	0936	20171111	343,3	2,439	0,026	1,55E-03	1,102
	0835	20171124	290,8	4,863	0,033	1,96E-03	0,698

Anexo 2. Datos de BMR en los individuos utilizados