

EFFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LA VIA BIOSINTETICA DE LAS
HEXOSAMINAS DON Y ALLOXAN, SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR EN UN
MODELO *IN VITRO* DE CÉLULAS CEREBRALES BAJO CONDICIONES DE
PRIVACIÓN DE GLUCOSA Y OXÍGENO.

LINA MARCELA AGREDO RAMÍREZ

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
BIOLOGIA CON ENFASIS EN CONSERVACION Y BIOLOGIA
MOLECULAR/BIOTECNOLOGIA
SANTIAGO DE CALI
2017

EFFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LA VIA BIOSINTETICA DE LAS
HEXOSAMINAS DON Y ALLOXAN, SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR EN UN
MODELO *IN VITRO* DE CÉLULAS CEREBRALES BAJO CONDICIONES DE
PRIVACIÓN DE GLUCOSA Y OXÍGENO.

LINA MARCELA AGREDO RAMÍREZ

Trabajo de grado para optar al título de Bióloga con énfasis en Biología
molecular/Biotecnología

Tutores

Juliana Rengifo Gómez, Ph.D
Carlos Cardozo, Aspirante a Ph.D

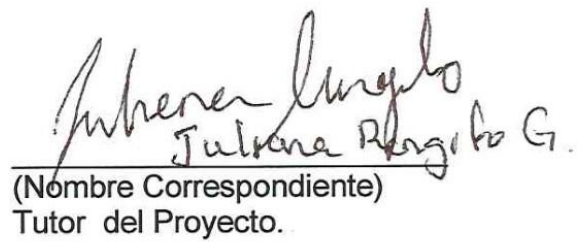
UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
BIOLOGIA CON ENFASIS EN CONSERVACION Y BIOLOGIA
MOLECULAR/BIOTECNOLOGIA
SANTIAGO DE CALI



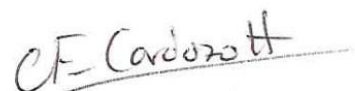
APROBADO POR:



(Nombre Correspondiente)
Evaluador



(Nombre Correspondiente)
Tutor del Proyecto.



Carlos Fdo Cardozo Hdca
(Nombre Correspondiente)
Co-Tutor del Proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	9
1. INTRODUCCION.....	10
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	12
2.1 Planteamiento de la pregunta de investigación y justificación.....	12
2.2 Marco teórico y estado del arte.....	13
2.2.1 Enfermedad cerebrovascular.....	13
2.2.2 Tolerancia Isquémica.....	14
2.2.3 Glicosilación tipo O-GlcNAc.....	16
2.2.4 Inhibidores de las enzimas GFAT y OGT de la vía biosintética de Hexosaminas, Don y Alloxan.....	18
2.3 Objetivos.....	20
2.3.1 Objetivo General.....	20
2.3.2 Objetivos específicos.....	20
2.4 Metodología Propuesta.....	20
2.4.1 Cultivo Celular.....	21
2.4.1.1 Preparación de medios de cultivo y soluciones.....	21
2.4.2 Disección del cerebro y asilamiento de la corteza cerebral.....	22
2.4.3 Disgregación del tejido de la corteza.....	23
2.4.4 Conteo celular y siembra de pozos.....	23
2.4.5 Adición de los inhibidores Don y Alloxan.....	25
2.4.6 Privación de glucosa y oxígeno (pre condicionamiento / OGD).....	26
2.4.7 Evaluación de la viabilidad celular por ensayo MTT.....	29
2.4.8 Análisis Estadístico.....	29
2.4.9 Matriz de Marco lógico.....	30
2.5 Resultados.....	32
2.5.1 <i>Determinación del efecto de los inhibidores Don y Alloxan en cultivos de astrocitos sin ningún estímulo (control).</i>	32
2.5.2 Determinación del efecto de los estímulos OGD en cultivos de astrocitos sin ningún inhibidor.....	33
2.5.3 Efecto de un estímulo no letal (OGD 15 min) en cultivos de astrocitos tratados con Don, Alloxan y Don/ Alx.....	34
2.5.4 Efecto del estímulo letal (OGD 120 min) en cultivos de astrocitos tratados con Don, Alloxan y Don/ Alx.....	35

2.5.5 Efecto del Precondicionamiento (OGD 15/120 min) en cultivos de astrocitos tratados con Don, Aloxan y Don/ Alx.	35
2.5.6 Efecto de los inhibidores Don, Aloxan y Don/Alx en los cultivos <i>in vitro</i> de astrocitos ante los diferentes tratamientos de OGD.	36
2.8 Conclusiones.....	45
ANEXOS.....	50

FIGURAS

Figura 1. Ruta de biosíntesis de hexosaminas. Similitud entre O-GlcNAcilación y fosforilación (Gerald W. Hart, , 2011).....	17
Figura 2. Síntesis de UDP- GlcNAc a través de la vía de hexosaminas y O-GlcNAcilación de proteínas. Enzimas e inhibidores que actúan sobre la vía (Sreenath S. Andrali, 2008).....	19
Figura 3. Diagrama de disección de cerebro de neonato de rata, creado por el profesor e investigador Carlos Fernando.....	22
Figura 4. Distribución de astrocitos en placa de 96 pozos, junto con la distribución de los inhibidores.....	25
Figura 5. Línea de tiempo de procedimiento de privación de glucosa y oxígeno. Los símbolos positivos (+) hace referencia a la realización del procedimiento descrito en la línea de tiempo (adición de inhibidores, estímulo Letal y/o no letal) y los signos negativos (-) no se realizó dicho estímulo. Los tratamientos se abrevian en la figura como; Pre condicionamiento (Prec), Privación de glucosa y oxígeno no letal (OGD 15 min), Privación de glucosa y oxígeno letal (OGD 120 min).....	29

GRAFICAS

Grafica 1. “Porcentaje de supervivencia en células cerebrales. Se representa la supervivencia como el porcentaje de los promedios para cada uno de los ensayos de determinación de tiempos. Aquí se tiene en cuenta el valor de muerte células dado por el tritón. Promedio +/- EEM” (Patiño, 2017).....	28
Grafica 2. Efecto de los inhibidores Don, Aloxan y Don/Alx en cultivos de astrocitos sin reducción de oxígeno ni glucosa. (A) En la gráfica A se registran los datos obtenidos para el ensayo 1. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia. Promedio +/- EEM, n=8 para cada inhibidor. (B) En la gráfica B se registran los datos obtenidos para el ensayo 2. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia,	

normalizadas con respecto al control. Promedio +/- EEM, n=5 para cada inhibidor.....32

Grafica 3. Efecto de los tratamientos a las columnas control (sin inhibidor). (C)

En la gráfica C se registran los datos obtenidos para el ensayo 1. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia. Promedio +/- EEM, n=8 para cada tratamiento. (***) = existe diferencia significativa respecto al control) y (# = existe diferencia significativa entre los tratamientos). (D) En la gráfica D se registran los datos obtenidos para el ensayo 2. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia normalizada con respecto al control. Promedio +/- EEM, n=5 para cada tratamiento. (***) = existe diferencia significativa respecto al control) y (# = existe diferencia significativa entre los tratamientos).....33

Grafica 4. Efecto del estímulo no letal (OGD 15 min) en cultivos de astrocitos tratados con Don, Aloxan y Don/ Alx. (A)

En la gráfica A se registran los datos obtenidos para el ensayo 1. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia. Promedio +/- EEM, n=8 para cada inhibidor. (***) = existe diferencia significativa respecto al control) y (# = existe diferencia significativa entre los tratamientos). (B) En la gráfica B se registran los datos obtenidos para el ensayo 2. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia. Promedio +/- EEM, n=5 para cada inhibidor. (* = existe diferencia significativa respecto al control).....34

Grafica 5. Efecto del estímulo letal (OGD120 min) en cultivos de astrocitos tratados con Don, Aloxan y Don/ Alx. (A)

En la gráfica A se registran los datos obtenidos para el ensayo 1. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia. Promedio +/- EEM, n=8 para cada inhibidor. (* = existe diferencia significativa respecto al control) y (# = existe diferencia significativa entre los tratamientos). (B) En la gráfica B se registran los datos obtenidos para el ensayo 2. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia. Promedio +/- EEM, n=5 para cada inhibidor. (***) = existe diferencia significativa respecto al control) y (# = existe diferencia significativa entre los tratamientos).....35

Grafica 6. Efecto del estímulo Pre condicionante (OGD 15-120 min) en cultivos de astrocitos tratados con Don, Aloxan y Don/ Alx. (A)

En la gráfica A se registran los datos obtenidos para el ensayo 1. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia. Promedio +/- EEM, n=8 para cada inhibidor. (B) En la gráfica B se registran los datos obtenidos para el ensayo 2. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia. Promedio +/- EEM, n=5 para cada inhibidor. (* = existe diferencia significativa respecto al control).....36

Grafica 7. Efecto del inhibidor Don en los cultivos de astrocitos tratados con estímulos no letal (OGD 15 min), letal (OGD 120) y Pre condicionante (OGD 15/120 min). (A)

En la gráfica A se registran los datos obtenidos para el ensayo 1. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia. Promedio +/- EEM, n=8 para cada inhibidor. (***) = existe diferencia significativa respecto al control) y (# = existe

diferencia significativa entre los tratamientos) (B) En la gráfica B se registran los datos obtenidos para el ensayo 2. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia. Promedio +/- EEM, n=5 para cada inhibidor. (* = existe diferencia significativa respecto al control).....37

Grafica 8. Efecto del inhibidor Aloxan en los cultivos de astrocitos tratados con estímulos no letal (OGD 15 min), letal (OGD 120 min) y Pre condicionante (Prec). (C) En la gráfica C se registran los datos obtenidos para el ensayo 1. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia. Promedio +/- EEM, n=8 para cada inhibidor. (***) = existe diferencia significativa respecto al control) y (# = existe diferencia significativa entre los tratamientos) (D) En la gráfica D se registran los datos obtenidos para el ensayo 2. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia. Promedio +/- EEM, n=5 para cada inhibidor. (* = existe diferencia significativa respecto al control).....37

Grafica 9. Efecto de la combinación de los inhibidores Don y Aloxan en los cultivos de astrocitos tratados con estímulos no letal (OGD 15 min), letal (OGD 120 min) y Pre condicionante (Prec). (E) En la gráfica E se registran los datos obtenidos para el ensayo 1. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia. Promedio +/- EEM, n=8 para cada inhibidor. (***) = existe diferencia significativa respecto al control) y (# = existe diferencia significativa entre los tratamientos) (F) En la gráfica F se registran los datos obtenidos para el ensayo 2. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia. Promedio +/- EEM, n=5 para cada inhibidor. (* = existe diferencia significativa respecto al control).....38

TABLAS

Tabla 1. Diseño experimental. Tratamientos, tiempos y estímulos realizados. Se realizó un total de 4 tratamientos, todos asignados a los platos cultivados al azar. Los símbolos positivos (+) hace referencia a la realización de los estímulos (Letal y/o no letal) y los signos negativos (-) no se realizó dicho estímulo. Se registra además el tiempo pre condicionante (OGD 15 min) y letal (OGD 120 min) de los tratamientos. Tiempos encontrado por la estudiante Nicole Tovar Patiño (Patiño., 2017).....27

AGRADECIMIENTOS

Inicialmente quiero agradecer a mi familia. A mi hermano y mi papa, que a pesar de la distancia siempre han estado presente brindándome un apoyo incondicional y motivándome a ser mejor en todos los aspectos. A mi mama, quien ha sido incondicional en todo mi proceso universitario. Sufrió conmigo todas las angustias, trasnochos, malos momentos, pero lo más importante celebró conmigo todos los logros. Sin mi mejor amiga, mi mama, no habría sido posible muchas de las cosas que he logrado hasta ahora. Para ella, el agradecimiento más grande y especial.

Quiero agradecer a Angie, Daniela y Felipe; por brindarme una de las amistades más lindas e incondicional que he tenido. Les agradezco por el aprecio que le tienen a mi mama, y ser los hijos putativos de “Doña Oma”. Gracias por hacer que los ratos sean más agradables.

A todos mis compañeros: Mafe, Natalia, Cardi, Alejo, Andersson, Lau, Caro, Gabby, Manu, Nathalie, Diana y francsico, por aportar de una u otra manera a mi formación profesional y personal.

A Leonardo Herrera, por el apoyo académico y personal. Por sus enseñanzas y por sembrar en el estudiante el amor a la Biología y las ganas de querer aprender más.

Por ultimo quiero agradecer a mis tutores. A Juliana Rengifo, por confiar en mí y aceptarme en su grupo de investigación, por todos las enseñanzas que me ha brindado en mi carrera universitaria y más importante en los últimos semestres. A Carlos Cardozo, que siempre estuvo presente durante el desarrollo del proyecto. Gracias por toda la paciencia, por confiar en mí en el laboratorio, gracias por creer en los estudiantes y enseñarles no solo a ser profesionales sino a ser personas integrales. Muchas gracias a los dos por guiarme durante mi proyecto de grado I-II y por presentarme tan bonita área de la Biología como lo es la Fisiología Animal.

RESUMEN

La enfermedad cerebrovascular es una de las enfermedades que tiene mayor incidencia de discapacidad y muerte alrededor del mundo. Dentro de las enfermedades cerebrovasculares, se encuentra la Isquemia cerebral, patología que se caracteriza por la disfunción focal de tejido cerebral por un desequilibrio entre el aporte y requerimiento principalmente de oxígeno y otros substratos, como glucosa, por la obstrucción o rotura de los vasos sanguíneos dirigidos al cerebro.

Dado que la isquemia cerebral tiene una distribución mundial, el interés en determinar cuáles son los efectos a nivel celular, para posibles tratamientos ha ido aumentando a pasar de los años. Un descubrimiento importante ha sido el encontrar que las células cerebrales pueden adquirir una tolerancia isquémica, cuando son expuestas a estímulos cortos y no letales de privación de glucosa y oxígeno. Esta tolerancia se cree que se genera por los aumentos de modificaciones pos traduccionales a corto plazo como es la glicosilación tipo O-GlcNAc en las células expuestas a un estímulo de privación de glucosa y oxígeno (OGD). Considerando estas modificaciones, estudios se han enfocado en entender el comportamiento de la vía de las hexosaminas, la cual tiene como resultado final la glicosilación O-GlcNAc de las proteínas blanco.

Considerando lo mencionado anteriormente, a lo largo de este proyecto se evaluó el efecto de los inhibidores de la vía biosintética de las hexosaminas Don y Aloxan, sobre la viabilidad celular en un modelo in vitro de células cerebrales bajo condiciones de privación de glucosa y oxígeno, con el fin de determinar si la inhibición de la glicosilación tipo O-GlcNAc tiene un efecto negativo en las células cerebrales.

Se logró determinar que la vía biosintética de las hexosaminas está relacionada con la supervivencia celular de astrocitos sometidos a diferentes estímulos de OGD y diferentes concentraciones de los inhibidores Don y Aloxan sugiriendo con estos datos que la glicosilación tipo O-GlcNAc es importante para determinar la viabilidad celular en momentos de estrés celular.

Palabras Clave: Isquemia cerebral, pre condicionamiento, privación de glucosa y oxígeno (OGD), Glicosilación tipo O-GlcNAc, Don, Aloxan, viabilidad celular.

1. INTRODUCCION

La enfermedad cerebrovascular es un grupo heterogéneo de condiciones patológicas las cuales tienen en común la disfunción focal de tejido cerebral por un desequilibrio entre el aporte y requerimiento, principalmente de oxígeno y otros substratos, como glucosa (Collazos, 2017).

En la actualidad, dentro de las enfermedades cerebrovasculares con más incidencia y porcentaje de muerte es la isquemia cerebral. Este último se caracteriza por la disminución del flujo sanguíneo a un área específica del cerebro ya sea por la oclusión o ruptura de una arteria que se dirige al cerebro (American Heart Association, 2016). La privación del flujo sanguíneo tiene como consecuencia la muerte celular (necrótica o apoptótica) causada por la falta de nutrientes como glucosa y oxígeno a un área específico del cerebro.

Dada la alta incidencia de isquemia cerebral a nivel mundial, se ha despertado gran interés, en entender cuáles son los mecanismos que están implicados en la muerte celular cerebral. Diversos estudios (Hwang, 2010; Shi, 2015; Gidday, 2006) han demostrado que las células cerebrales tienen mecanismos endógenos que las pueden proteger ante eventos de isquemia posiblemente letales, convirtiéndolas tolerantes ante futuros insultos isquémicos.

La tolerancia isquémica es una respuesta evolutivamente conservada de plasticidad cerebral que ocurre en invertebrados y vertebrados, incluido los humanos (Gidday, 2006). Esta tolerancia es la reacción inmediata (aguda) y / o crónica a un estímulo potencialmente nocivo, como hipoxia, isquemia, inflamación, epilepsia, hipo e hipertermia entre otros. Las células cerebrales responden de forma natural a la isquemia, al movilizar una gran cantidad de defensas para contrarrestar las respuestas nocivas, de esta manera mitigando la lesión celular y la muerte (Gidday, 2006).

Investigaciones han demostrado además que, la resistencia del cerebro a la lesión isquémica o tolerancia isquémica, puede aumentarse transitoriamente mediante la exposición previa a un estímulo de pre condicionamiento no perjudicial (Gidday, 2006). El pre condicionamiento hace referencia a la exposición de un tejido u órgano ante cualquier tipo de estímulo capaz de causar daño, pero este último está por debajo del umbral de daño (Ulrich Dirnagl, 2003). El pre condicionamiento puede desencadenar “una respuesta adaptativa significativamente diferente y esta respuesta se caracteriza por dos marcos temporales distintivos de la tolerancia inducida en relación con el estímulo de pre condicionamiento y la posterior isquemia” (Gidday, 2006).

Los mecanismos de acción de las vías de protección endógenas mediadas por el pre condicionamiento aún no se entienden en su totalidad, sin embargo se sabe que actúa por adaptaciones metabólicas (Kitagawa, 2012). Se han identificado dos

ventanas de tiempo en donde el pre condicionamiento tiene efecto, una ventana inicial que representa cambios postraduccionales muy rápidos y de corta duración, y la segunda se desarrolla lentamente, durando días después del insulto inicial (JAN LEHOTSKY, 2009).

Dentro de la respuesta temprana (venta inicial) se presencian cambios postraduccionales muy rápidos, como lo es la Glicosilación tipo O-GlcNAc. Esta última es un tipo único de glicosilación de proteínas y es una de las modificaciones postraduccionales más comunes y similar a la fosforilación de proteínas. La O-GlcNAcilación aumenta cuando las células se enfrentan ante cualquier tipo de estrés celular (Gladys A. Ngoh, 2010) y es producto final de la vía de las hexosaminas.

La vía de las hexosaminas (HBS) es sensible a los cambios en la concentración de glucosa intracelular (Beleznai & Bagi, 2012) y debido a que “la producción de UDP-GlcNAc requiere nutrientes derivados de otras vías metabólicas, la O-GlcNAcilación proteica sirve como un sensor de nutrientes o sensor metabólico” (Sujith Dassanayaka, 2014). Las enzimas reguladoras de esta vía, son entonces los antecesores principales seguida de la glucosa para llevar a cabo la O-GlcNAcilación.

La primera enzima limitante de la HBS es la enzima GFAT; enzima altamente conservada que existe en dos isoformas, GFAT1 y GFAT2 (Sujith Dassanayaka, 2014) y usan glutamina como sustrato para la formación de glucosamina-6-fosfato. Un antagonista de GFAT, como “6-diazo-5 oxonorleucine (DON), irreversiblemente inhibe la enzima, lo que resulta en un flujo reducido de glucosa a través de la HBS” (Sujith Dassanayaka, 2014) y como consecuencia la interrupción de la O-GlcNAcilación proteica. Por otra parte la enzima OGT, es una enzima perteneciente a la familia GT41 glicosil transferasa; (I. George Fantus, 2006) que se encarga de usar el sustrato UDP- GlcNAc para completar la transferencia de GlcNAc al residuo peptídico de serina / treonina de la proteína blanco (Riccardo Trapannone, 2016); finalizando la vía HBS y por ende la glicosilación. El análogo de OGT es el compuesto químico Aloxan; un análogo de uracilo que permite la inhibición de OGT (Adam OSTROWSKI, 2013) y no permite la adición de GlcNAc a las proteínas blanco.

Por tal motivo, este proyecto busco evaluar el efecto de los inhibidores Don, Aloxan y la mezcla de Don/Alx sobre la viabilidad celular en un modelo *In vitro* de células cerebrales bajo condiciones de privación de glucosa y oxígeno. Para ello se determinaron las concentraciones a usar de los inhibidores Don y Aloxan. Se realizaron los estímulos; no letal (15 minutos), letal (120 minutos) y Pre condicionante (15 min-120 min) con la ayuda de cámaras anoxicas, medios burbujeados (N₂) y sonicados. Posterior se realizó un ensayo MTT para medir la viabilidad celular.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1 Planteamiento de la pregunta de investigación y justificación

Según la organización mundial de salud, cada año en Colombia, las enfermedades no transmisibles (ENT) provocan 16 millones de muertes prematuras. Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son una de las principales enfermedades que se presenta dentro esta categoría. Para el año 2008, las ENT causaron el 63% de muerte en Colombia y para los años 2010-2020 se estima un incremento del 15% alcanzando el 73% de mortalidad en el país (Salud, 2013). La enfermedad cardiovascular es la principal causa de muerte en Colombia, y a nivel mundial el 34% de las muertes están relacionadas con esta patología. En la actualidad, la enfermedad isquémica cardiaca y el accidente cerebrovascular, ocupan los puestos 1° y 3° dentro de las diez principales causas de muerte en Colombia (Social, 2017).

Por su alto impacto en la población y su importancia clínica, el estudio de la enfermedad cerebrovascular se ha enfocado a entender los mecanismos moleculares y fisiopatológicos junto con la recuperación y estrategias de mitigación y/o intervención farmacológica. Varios estudios han demostrado que las células cerebrales tienen un grado de respuesta ante estos accidentes/enfermedades cerebrovasculares, las cuales son adaptativas y endógenas, que pueden actuar como protección celular y ayudar al proceso de recuperación después de una isquemia cerebral, la cual es una de las patologías cardiovasculares que más aflige a la sociedad.

Es por esto que el proyecto está enfocado en estudiar el efecto de la inhibición de la vía biosintética de las Hexosaminas, una vía que activa los mecanismos de defensa endógena de las células cerebrales, con la finalidad de proporcionar información de este mecanismo de protección. A largo plazo el proyecto aportara al posible desarrollo de fármacos o tratamientos preventivos para contrarrestar el efecto neurodegenerativo en pacientes con isquemia cerebral, de esta manera buscando mejorar la calidad de vida de los pacientes.

2.2 Marco teórico y estado del arte

2.2.1 Enfermedad cerebrovascular

La organización mundial de la Salud, define la enfermedad cerebrovascular como el rápido desarrollo de signos focales o globales de compromiso de la función cerebral, con síntomas de veinticuatro horas o más de duración o que llevan a la muerte, sin otra causa que el origen vascular (Federico A. Silva, 2006).

La enfermedad cerebrovascular (ECV) es una de las principales enfermedades no transmisibles de importancia para la salud pública, después de la enfermedad coronaria y el cáncer. El accidente cerebrovascular es la causa más común de muerte en la mayoría de los países industrializados. En términos generales, los accidentes cerebrovasculares son un déficit neurológico repentino debido a isquemia cerebral localizada o hemorragia. La mayoría de los accidentes cerebrovasculares se atribuyen a la oclusión focal del vaso sanguíneo cerebral (accidente cerebrovascular de isquemia) y el resto son el resultado de la ruptura de un vaso sanguíneo (WHO, 2006).

De las defunciones debidas al grupo de enfermedad cardiovascular seleccionado, el 56,3% se debieron a enfermedad cardíaca isquémica, 30,6% a enfermedad cerebrovascular, 12,4% a enfermedad hipertensiva y 0,5% a enfermedad cardíaca reumática crónica (Instituto Nacional de Salud, 2013).

En los últimos años, las ECV se ha desarrollado como un campo de la neurología único de investigación dado el significado del impacto social y las amplias variaciones geográficas de su incidencia y prevalencia (Yuri Takeuchi, 1999). Estas enfermedades cerebrovasculares son la principal causa de discapacidades a largo plazo, generando así una responsabilidad social, familiar y de entidades médicas, ya que se estima que el 20% de pacientes afectados necesitaran de un cuidado institucional. En casi todos los países el accidente cerebrovascular aumenta con la edad, con las tasas más altas en el grupo de edad mayor a los 85. En cuanto a la distribución por sexos, el accidente cerebrovascular es ligeramente más frecuente en los hombres que en la mujeres (WHO, 2006).

La tercera causa principal de muerte y discapacidad es el accidente cerebrovascular isquémico. El accidente cerebrovascular isquémico surge en los seres humanos como consecuencia de un paro cardíaco o el paro del flujo sanguíneo al cerebro, que puede deberse a la oclusión embólica o trombótica de las arterias. Tanto la isquemia global como focal son eventos patogénicos muy graves con patogénesis múltiple, paralela y secuencial (JAN LEHOTSKY, 2009).

Cabe resaltar, que la isquemia es una de las patologías de los accidentes cerebrovasculares, y se puede presentar de dos formas; Isquemia global e isquemia

focal como se mencionó anteriormente. Los procesos fisiopatológicos de la isquemia cerebral son el resultado de la secuencia de fenómenos celulares y moleculares a corto y largo plazo que confluyen en dos modalidades de muerte: la primera, relacionada directamente con el déficit energético, o muerte necrótica, y la segunda, que requiere de un adecuado suministro energético de la neurona y corresponde a la muerte celular programada o apoptosis (C. Arango-Davila, 2004).

La obstrucción de las arterias cerebrales, usualmente las principales como la arteria cerebral media, tienen como resultado la disminución del flujo sanguíneo, privando así un área específica del cerebro de oxígeno y glucosa. El impacto de la isquemia cerebral depende de la gravedad y la duración de la reducción del flujo sanguíneo. Una isquemia poco grave pero prolongada produce cambios equivalentes a una isquemia corta y grave; sin embargo, se ha determinado que algunos fenómenos moleculares, como la inhibición de la síntesis proteica, son los mismos sin importar la duración de la isquemia (C. Arango-Davila, 2004). Esta área cerebral que es privada de un flujo sanguíneo, se convierte en el foco necrótico, y el área que lo rodea se denomina el área de “penumbra” (núcleo necrótico circundante de la isquemia), donde aún es alimentada por vasos sanguíneos colaterales (JAN LEHOTSKY, 2009). Sin embargo a pesar de que esta zona recibe flujo sanguíneo, no es lo suficiente para las células cerebrales y eventualmente las neuronas sufrirán un destino apoptótico si no son tratadas a tiempo. Varios estudios están enfocados en los tratamientos y estrategias farmacológicas para disminuir el área de penumbra y evitar que se prolongue/expandan la muerte celular.

La muerte tisular se da ya que, una vez dada la isquemia, se desencadena una secuencia de fenómenos moleculares a corto y largo plazo que se inician con el fracaso energético. Estos están relacionados con la interrupción de los procesos de fosforilación oxidativa y el déficit en la producción de ATP. La interrupción de los gradientes iónicos transmembranales debido a fallos en la bomba de sodio-potasio ATPasa y otras bombas iónicas dependientes de energía, es el punto fundamental relacionado con los mecanismos fisiopatológicos de la isquemia (C. Arango-Davila, 2004).

A pesar de que se han realizado varios estudios de los procesos posteriores a la isquemia, su mecanismo y sus efectos en las células cerebrales, aún sigue siendo una de las áreas de enfoque en la investigación de enfermedades cerebrovasculares dado la magnitud de sus efectos, y es de gran interés terapéutico.

2.2.2 Tolerancia Isquémica

El pre condicionamiento isquémico (PI) es el proceso por el cual una breve exposición a la isquemia (reducción de oxígeno y/o glucosa) activa mecanismos endógenos de protección contra los efectos perjudiciales de un largo período de

isquemia, de esta manera activando la tolerancia isquémica celular. El PI confiere tolerancia en dos Fases: una fase temprana, que se desarrolla inmediatamente y dura entre 2 y 4 horas después del estímulo isquémico, y una fase, que comienza después de 12-24 h y dura 3-4 días (T. Kaneko, 2005).

La activación de vías metabólicas durante y después de una isquemia cerebral, ha sido de gran interés ya que son la reacción inmediata como respuesta a estrés celular. Existen diversos mecanismos que pueden ser de reparación de la neurona o por el contrario mecanismos que conllevan a la apoptosis celular. El precondicionamiento desencadena una cascada de mecanismos de protección intrínseca que aumentan la resistencia de las neuronas a la hipoxia subsiguiente. Esta cascada incluye cambios en la apoptosis, la oncoproteína bcl-2, el factor de necrosis tumoral, la proteína quinasa activada por mitógeno, factor α inducible de hipoxia, survivina, stanniocalcina-1, inhibición de proteínas iNOS, proteínas de choque térmico, funcionamiento mitocondrial entre otros (Rudolf Brödemanna, 2014).

Por esta razón, se han realizado diversos estudios para definir los mecanismos neuroprotectores endógenos evolutivamente conservados del cerebro, los cuales ocurren en la tolerancia isquémica (TI) o después del pre condicionamiento isquémico (PI). La TI inducida por varios paradigmas representa un importante fenómeno de adaptación del sistema nervioso central (SNC) a la isquemia subletal a corto plazo. Esto resulta en una mayor tolerancia del SNC a estímulos letales de isquemia (JAN LEHOTSKY, 2009).

Los diversos estudios dirigidos al pre condicionamiento, se han realizado exitosamente en laboratorios por medio de cultivos *In vitro*, donde las condiciones requeridas para llevar a cabo el procedimiento son fácilmente manipuladas y controladas. De esta manera se ha demostrado que el pre condicionamiento hipóxico (PH) utilizando un contenido reducido de oxígeno o la privación combinada de oxígeno y glucosa proporciona una protección eficaz frente a tensiones perjudiciales en cultivos neuronales. Muchos estudios han demostrado que el pre condicionamiento puede rescatar neuronas de daño celular o apoptosis generado por un insulto severo (Guansong Wang, 2010).

Adicional de los estudios mencionados anteriormente en relación de la tolerancia isquémica y neuronas, también se han registrado respuestas ante este insulto (isquemia) de los astrocitos. Los astrocitos tienen diversas funciones en el cerebro y se podrían considerar como la base para el funcionamiento correcto de las neuronas. Algunas de estas funciones son; “crean el “ambiente” cerebral, construyen la micro arquitectura del parénquima cerebral, mantienen la homeostasis cerebral, almacenan y distribuyen sustratos de energía, controlan el desarrollo de células neuronales, la sinaptogénesis y el mantenimiento sináptico y proporcionan protección cerebral” (Kettenmann H, 2011). Los astrocitos también están involucrados en diferentes tipos de patologías cerebrales; una de ellas siendo

lesiones agudas; traumatismos o accidentes cerebrovasculares (Kettenmann H, 2011).

En un estudio realizado por (Koizumi, 2016), demostró que los astrocitos se podrían convertir en un “fenotipo neuroprotector” ante un estímulo pre condicionante, y afirmo que esta esta respuesta era esencial para la inducción de la tolerancia isquémica. Considerando el papel fundamental de los astrocitos y su relación con la tolerancia isquémica, Koizumi, sugiere “que la comunicación íntima entre la microglía y los astrocitos también debe ser indispensable para la tolerancia isquémica” (Koizumi, 2016).

La importancia de los astrocitos, además de lo dicho anteriormente, se sustenta con el hecho de que los astrocitos están asociados además a la actividad neuronal y el flujo sanguíneo; son los responsables del soporte metabólico local de las neuronas. Estos últimos tiene la capacidad de tomar glucosa de la sangre, “la convierten en lactato, la liberan y así proporcionan un sustrato de energía a las neuronas. Curiosamente, los astrocitos son las únicas células en el cerebro que pueden sintetizar glucógeno y, por lo tanto, pueden servir como depósito de energía” (Kettenmann H, 2011).

2.2.3 Glicosilación tipo O-GlcNAc

La glicosilación es una de las formas más comunes y complejas de modificaciones postraduccionales de proteínas en eucariotas. Una de estas modificaciones es la glicosilación tipo O-GlcNAc (O-linked β -N-acetilglucosamina). Esta última se concentra en las proteínas nucleares y está implicada en la regulación de la transcripción, el proteasoma, insulina, señalización de MAP quinasa, el ciclo celular y respuesta al estrés celular (Zachara, 2012). La glucosamina (2-amino-2-desoxi-D glucosa; GlcN) es un azúcar natural que se sintetiza a partir de glucosa por todas las células, y es un componente esencial de glicoproteínas y proteoglicanos. GlcN es un producto principal de la ruta de biosíntesis de hexosaminas que conduce finalmente a la formación de los precursores de glicoproteínas UDP-N-acetil-GlcN (UDP-GlcNAc) y UDPN-acetil-galactosamina (UDP-GalNAc) (SO-YOUNG HWANG, 2010).

La O-GlcNAcilación es un tipo único de glicosilación de proteínas nucleocitoplasmáticas, y se refiere a la transferencia enzimática de β -N-acetilglucosamina (GlcNAc) del donante UDP-GlcNAc al grupo hidroxilo de residuos de serina / treonina de proteínas a través de un enlace O-glicosídico. Este proceso es catalizado por la N-acetilglucosamina transferasa O-enlazada (O-GlcNAc transferasa; OGT), y el grupo O-GlcNAc unido a las proteínas se pueden eliminar con la catálisis de β -N acetilglucosaminidasa (O-GlcNAcase; OGA) (Jianhua Shi1, 2015). Esta última es una de las modificaciones postraduccionales más comunes y similar a la fosforilación de proteínas. Estas similitudes se basan en qué; tanto la O-GlcNAcilación como la fosforilación son modificaciones postraduccionales sobre

residuos de serina y treonina, ambas modificaciones se añaden dinámicamente y se eliminan de las proteínas en respuesta a señales celulares, y a su vez alteran las funciones y/o asociaciones de la proteína (Gladys A. Ngoh H. T., 2010). Sin embargo, a pesar de ser afines, se comprenden algunas diferencias entre estas dos. O-GlcNAc difiere de la fosforilación en que sólo 2 enzimas catalizan la adición y la eliminación de O-GlcNAc en proteínas, mientras que más de 600 quinasas y fosfatasas regulan genéticamente la adición y eliminación de fosforilación en células de mamíferos (Gladys A. Ngoh H. T., 2010). En la figura 1 se puede observar un esquema general de la vía biosintética de hexosaminas y la similitud que presentan la O-GlcNAcilación y la fosforilación.

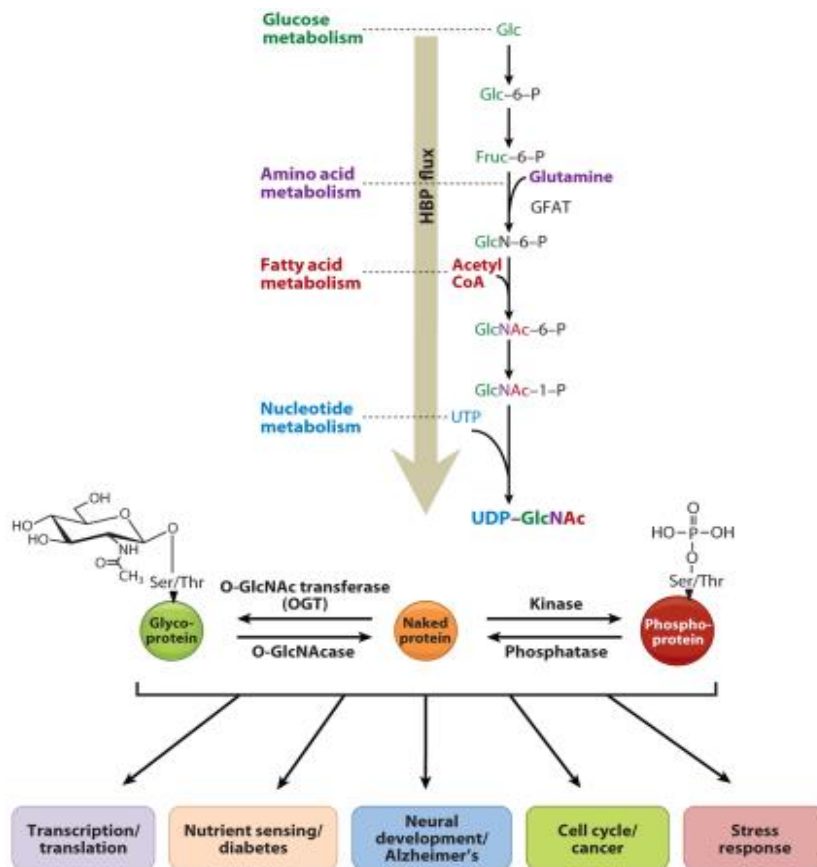


Figura 1. Ruta de biosíntesis de las hexosaminas. Similitud entre O-GlcNAcilación y fosforilación (Gerald W. Hart., 2011)

Como se mencionó anteriormente, la O-GlcNAcilación es particularmente abundante dentro del núcleo, donde se produce en la maquinaria de regulación transcripcional. Aproximadamente una cuarta parte de las proteínas O-GlcNAciladas son factores de regulación de la transcripción o traducción; Las proteínas de poros nucleares están entre las proteínas más fuertemente O-GlcNAciladas. Esto último, también parece ser particularmente abundante en las

proteínas implicadas en la señalización, las respuestas de estrés, y el metabolismo energético. También se produce en muchas proteínas reguladoras del citoesqueleto, como las que regulan el conjunto de actina y el conjunto de tubulina (Gerald W Hart, 2009).

Hasta la fecha, en diversas investigaciones, se ha observado que una de las primeras respuestas ante un estrés celular es el aumento rápido y global de O-GlcNAcilación en una variedad de proteínas. Estos niveles de O-GlcNAc aumentan cuando la célula enfrenta cualquier tipo de estrés como; Choque térmico, etanol, UV, estrés reductivo, junto con la hipoxia. O-GlcNAc puede proteger células estabilizando la estructura proteica, modulando las vías de transducción de señales implicadas previamente en la protección de la glucosa, y finalmente mediante la alteración de la actividad de localización de proteínas de choque térmico, muchas de las cuales son conocidas para ser modificadas por O-GlcNAc (Leonidas D. Arvanitisa, 2011).

Con lo dicho anteriormente y dado que la función de O-GlcNAc es actuar como un sensor de nutrientes, no es sorprendente que la modificación de proteínas desempeñe papeles fundamentales en las enfermedades crónicas, en particular la diabetes, la neurodegeneración, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Gerald W. Hart, 2011). Es por esto último, que la glicosilación tipo O-GlcNAc es un proceso de suma importancia en enfermedades neurodegenerativas y diversas patologías cerebrovasculares como lo es la isquemia cerebral, que es uno de los eventos que más aflige a individuos a nivel mundial. El enfoque de la O-GlcNAcilación y la isquemia se genera ya que desempeña un papel importante en la fisiología y patología neuronal, además que la expresión de OGT y O-GlcNAcase son abundantes en el cerebro, con las concentraciones más altas en las neuronas del hipocampo y las células de Purkinje. Esto sugiere que la modificación de O-GlcNAc en las neuronas puede ser importante ya que puede participar en la neurodegeneración, Particularmente en el hipocampo (SO-YOUNG HWANG, 2010).

2.2.4 Inhibidores de las enzimas GFAT y OGT de la vía biosintética de Hexosaminas, Don y Aloxan.

La vía de las hexosaminas (HBP) ejemplifica una de las vías que tiene como resultado final la O-GlcNAcilación. La HBP consume una pequeña fracción de glucosa e implica una serie de reacciones catalizadas por enzimas que terminan con la formación de UDP-GlcNAc.

La actividad de las enzimas implicadas en esta vía, son entonces los antecesores principales seguida de la glucosa para llevar a cabo la O-GlcNAcilación. Como es de gran interés su funcionamiento, así mismo es, los posibles inhibidores que esta última puede presentar, impidiendo que se llegue al producto final de la vía. Dos de

las enzimas implicadas en la O-GlcNAcilación, OGT y GFAT son consideradas enzimas importantes, dado que con GFAT inicia la vía HBP y OGT la finaliza añadiendo el grupo O-GlcNAc a las proteínas blanco.

La enzima OGT, es una enzima glicosil transferasa independiente de metal perteneciente a la familia GT41 glicosil transferasa; OGT es codificada por un solo gen y reside en gran medida en el núcleo (I. George Fantus, 2006). La enzima comprende un dominio N-terminal, que es esencial para el reconocimiento del sustrato, y un dominio C-terminal catalítico. El sustrato nucleótido de azúcar de OGT, UDP-GlcNAc, es una plantilla para el desarrollo de inhibidores de moléculas pequeñas debido a su tamaño y el modo de unión a la enzima (Adam OSTROWSKI, 2013). Su actividad consiste en que, el sustrato donante UDP- GlcNAc se une al sitio activo de la enzima, seguido por el sustrato polipéptido diana, es decir la proteína blanco. UDP-GlcNAc también funciona como la base catalítica, permitiendo la transferencia de GlcNAc al residuo peptídico de serina / treonina (Riccardo Trapannone, 2016).

Aloxan (2,4,5,6-tetraoxypyrimidine) es un inhibidor de la vía de las hexosaminas, el cual actúa sobre OGT, como se puede observar en la figura 2. Fue uno de los primeros inhibidores de OGT ampliamente utilizado. Aloxan, no es sólo un análogo de uracilo que permite la inhibición de OGT, pero también es un mimético de la glucosa. Un estudio realizado utilizando la estructura cristalina del homólogo OGT bacteriano de *Xanthomonas campestris* (XcOGT), mostro que OGT en unión con Aloxan confirmó su unión en el bolsillo UDP (Adam OSTROWSKI, 2013)

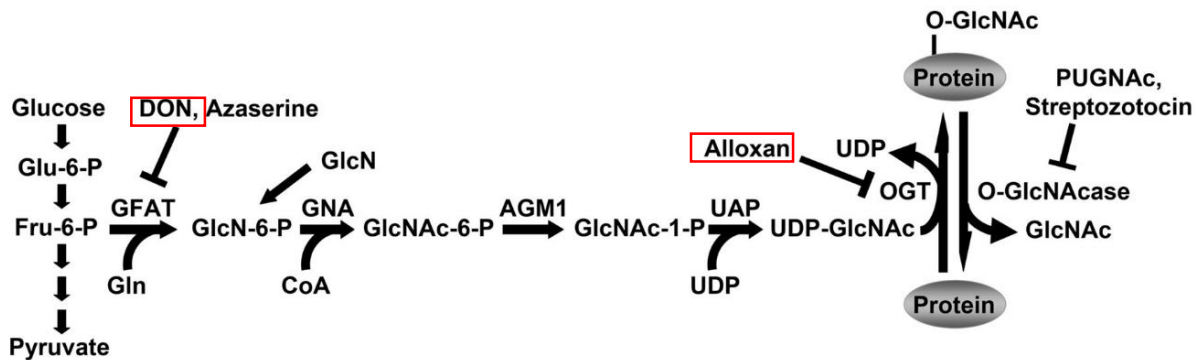


Figura 2. Síntesis de UDP- GlcNAc a través de la vía de hexosaminas y O-GlcNAcilación de proteínas. Enzimas e inhibidores que actúan sobre la vía (Sreenath S. Andrali, 2008).

Por otra parte la enzima GFAT, es una enzima limitante de velocidad con un tiempo de vida aproximadamente de 1 hora, que convierte fructosa-6-fosfato y glutamina a Glc-6-P. Existen dos isoformas de GFAT codificadas por genes separados. GFAT1 se expresa de forma ubicua en el páncreas, placenta, testículos y el músculo

esquelético, mientras que GFAT2 se expresa altamente en el sistema nervioso central (SNC) y en el corazón. Esta enzima puede ser regulada transcripcionalmente, postranscripcionalmente, y mediante la inhibición de la retroalimentación de HBP por UDPGlcNAc (Sujith Dassanayaka, 2014). La concentración de glucosa y la actividad de GFAT son determinantes importantes de los niveles globales de O-glicosilación de proteínas (I. George Fantus, 2006).

El inhibidor Don (acivicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine) actúa sobre GFAT, y como consecuencia, se inhibe la entrada a la vía de las hexosaminas, y se inhibe el aumento de UDP-GlcNAc (Davide Vigetti, 2012) el cual es el producto final de la vía necesaria para la O-GlcNAcilación de proteínas. En la figura 2 se observa de nueva la vía de las hexosaminas, junto con algunos inhibidores incluyendo a Don que actúan sobre ella.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de los inhibidores Don y Aloxan sobre la viabilidad celular en un modelo *In vitro* de células cerebrales bajo condiciones de privación de glucosa y oxígeno.

2.3.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de Don sobre la viabilidad celular bajo condiciones de privación de glucosa y oxígeno.
2. Evaluar el efecto de Aloxan sobre la viabilidad celular bajo condiciones de privación de glucosa y oxígeno.
3. Evaluar el efecto de la combinación de Don y Aloxan sobre la viabilidad celular bajo condiciones de privación de glucosa y oxígeno.

2.4 Metodología Propuesta

El proyecto de investigación se realizó en las instalaciones de la Universidad Icesi, en los laboratorios de Fisiología Animal, Biofarmacia y Biocosmética, y Biotecnología. Los modelos animales implicados en el proyecto (Ratas wistar, P0-P2) fueron cuidados y manipulados por personal autorizado en el Bioterio, ubicado en la Universidad Icesi, y se contó con la aprobación del comité de ética de la Universidad Icesi para el manejo de organismos vivos.

La metodología descrita a continuación tuvo como finalidad la evaluación del efecto de los inhibidores Don y Aloxxan sobre la viabilidad celular en un modelo *In vitro* de células cerebrales (Astrocitos) bajo condiciones de privación de glucosa y oxígeno.

2.4.1 Cultivo Celular

La metodología de cultivo celular se empleó para obtener astrocitos, a partir de la corteza cerebral de neonatos de ratas Wistar (P0-P2). A continuación se describe el protocolo empleado para la preparación de reactivos previo a la iniciación del procedimiento quirúrgico (extracción del cerebro).

2.4.1.1 Preparación de medios de cultivo y soluciones

Solución de Disección

Para un volumen de 50 mL se preparó; Hanks BBS 48,9 mL, Sodio Piruvato 500 µL, D-Glucosa 100 µL, HEPES 500 µL.

Solución Enzimática

Para un volumen de 2 mL se preparó; Solución de disección 1,7 mL, EDTA pH 7 20 µL, DNase I 40 µL, Tripsina 240 µL.

Plating Medium Astrocitos

Para un volumen total de 50 mL se preparó; MEM (Earle's + L-Glu) 48,5 mL, D-glucosa 500 µL, Pen/Strep/Amph B 500 µL, HS 5 mL.

Solución de azul de Tripano

Se preparó 75 uL azul tripano + 15 uL plating médium de astrocitos + 10 uL de suspensión celular en un tubo eppendorf, para posteriormente hacer un conteo celular con ayuda de una cámara de Neubauer.

Recubrimiento de platos de cultivo con Poli-L-Lisina (PLL)

Dado que el cultivo de astrocitos se sembró en placas de 96 pozos, se procedió a recubrir los pozos a utilizar con 50 μ L de Poli-L-Lisina para que las células pudieran adherirse a la placa. Una vez recubiertos con la solución de PLL se incubaron a 37°C/ humedad relativa 100% 24 horas previo a la siembra. Al día siguiente se recolecta la solución de PLL y se almacena de nuevo para su próximo uso. Posterior a la colecta, se realizaron 3 lavados a cada pozo con solución PBS estéril y se dejaron las placas secando en la cabina de flujo laminar.

Los procedimientos y las soluciones preparadas, descritas anteriormente, se prepararon bajo cabina de flujo laminar para evitar cualquier tipo de contaminación cruzada. Los medios de cultivo y las soluciones de disección se prepararon en tubos falcón estériles de 50mL, y las soluciones enzimáticas en tubos falcón estériles de 15mL.

Obtención de neonatos de rata Wistar

Los neonatos P0-P2 fueron trasladados del Bioterio de la Universidad Icesi hasta el cuarto de cultivo del laboratorio 506L.

2.4.2 Disección del cerebro y aislamiento de la corteza cerebral

Para realizar la disección del cerebro, se procedió a anestésiar el neonato con isoflurano (aproximadamente 3-4 gotas) y se sometió a frío unos minutos para bajar metabolismo. Todo lo dicho anteriormente sacado del protocolo previamente establecido por la Universidad Icesi.

Una vez anestésiado el neonato, se procedió a la decapitación y extracción del cerebro con la ayuda de un Kit de disección. Obtenido el cerebro, se sumergió en el medio de disección a 4°C. Bajo un estereoscopio se realizó el aislamiento de la estructura de interés; en este caso la corteza. El procedimiento de extracción de la corteza se puede observar en la figura 3; procedimiento ya estandarizado e imagen creada por el profesor e investigador Carlos Fernando.

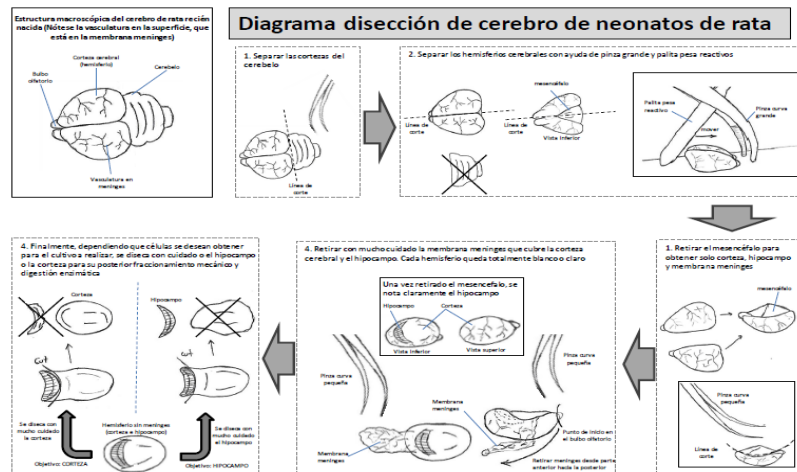


Figure 1. Diagrama de disección de cerebro de neonato de rata, creado por el profesor e investigador Carlos Fernando.

Obtenida la corteza, se sumergió en una caja petri con solución de disección fresca y se guardó en hielo hasta que todas las demás cortezas a utilizar fueran asiladas.

2.4.3 Disgregación del tejido de la corteza

Una vez obtenida la(s) corteza(s), se sumergió el tejido en la solución enzimática preparada previamente e incubada a 37°C en baño maría y se procedió a la disgregación mecánica (con la ayuda de una pala de pesar reactivos) y enzimática. Una vez disgregado el tejido, se incubó por 20 minutos a 37°C en baño maría en la solución enzimática, agitando cada 5 minutos. Terminada la incubación, se realizó bajo cabina de flujo laminar 3 lavados con 4 mL de plating médium de astrocitos.

Terminado los lavados se re suspendió el tejido en 2 mL de plating médium de astrocitos, y se realizó de nuevo una disgregación mecánica con pipetas de pasteur de vidrio de diferentes diámetro de poro (creadas por el docente Carlos Cardozo). El orden de la disgregación se inició con la pipeta de poro mayor, después a poro medio, y finalmente con la de poro pequeño. En cada disgregación, con las pipetas descritas anteriormente, se realizaron 10 pasos de carga-descarga de esta manera asegurando la homogenización del tejido.

Realizada la disgregación, se dejó decantar por 120 segundos. Se tomó posteriormente 1 mL del sobrenadante y se trasvaso a un tubo nuevo de 15 mL. A la solución inicial con tejido restante se le adiciono 1 mL de solución de Plating médium de astrocitos y se realizó una disgregación adicional con la pipeta de poro pequeño y se dejó decantar de nuevo 120 segundos. Después de los 120 segundos, se tomó de nuevo 1 mL del sobrenadante y se agregó al tubo de 15 mL con el sobrenadante ya tomado previamente, esto con el fin de obtener el mayor número de células posibles.

2.4.4 Conteo celular y siembra de pozos

Para realizar el conteo celular se tomó 10 μ L de la suspensión celular y se mezcló con la solución de azul de tripano. De esta mezcla, se tomaron 8 μ L y con la ayuda de un microscopio invertido, se realizó el conteo celular utilizando una cámara de Neubauer. Con el promedio total de células observadas en los cuadrantes de la cámara se hizo un cálculo matemático para determinar el volumen total de suspensión celular que iría en cada pozo.

Cultivo de Astrocitos

Las células disgregadas, con el procedimiento descrito anteriormente, se sembraron en frascos de cultivo de 25cm². Estos cultivos se dejaron incubando por una semana, y se les cambio el medio día de por medio. Una vez completado el proceso de incubación de los astrocitos, estos se desprendieron del frasco de cultivo.

Para desprender las células, se realizaron pequeños golpes a los frascos para desprender microglia que posiblemente haya crecido junto con los astrocitos. Posterior a esto se eliminó el medio completo y se procedió a hacer 3 lavados con HBSS estéril. Se adiciono 2 mL de una solución de Tripsina para desprender las células adheridas a la superficie del frasco. Una vez adicionada la solución con tripsina se revisaron las células en un estereoscopio para asegurar que la tripsina estuviera activa, y se llevó a incubar a 37°C durante 4 minutos; revisando cada minuto el estado de las células. Pasado el tiempo de incubación, se adiciono 1 mL de plating Medium de astrocitos para inactivar la enzima (tripsina).

La suspensión celular fue colectada en un tubo falcón de 15 mL y se centrifugo a 1200 rpm durante 4 minutos. Pasado el tiempo de centrifuga, el sobrenadante se descartó y el pellet se re suspendió con 2 mL de plating médium de astrocitos. Se empleó una pipeta de poro pequeño, para desprender y homogenizar el pellet. Obtenida la suspensión celular, se procedió a calcular el volumen a sembrar por cada pozo.

Las células se sembraron en los pozos previamente recubiertos con PLL. En un total de 4 placas (4 tratamientos) se sembraron 5 columnas y 8 filas. En cada pozo se sembró 100 µL de la suspensión celular con la ayuda de una pipeta multicanal. La distribución de los astrocitos se puede observar en la Figura 4.

Una vez distribuidas las células se llevó la placa a incubar a una temperatura de 37°C/ humedad relativa 100%. Después de cuatro horas de incubación, se realizó el primer cambio de medio, y de nuevo se llevó a incubar la placa. Al segundo día *in vitro* se realizó el segundo cambio de medio; en donde se retiró 30% del medio y se le adiciono de nuevo 30% de medio fresco. Al cuarto día *In vitro*, se realizó un cambio completo para todos los pozos. Al sexto día, se realizó otro cambio de medio, en donde se removió el 30% del medio, y se reemplazó por un 30% de medio fresco. Finalmente al día 7-8 *in vitro* se llevó a cabo la aplicación de los inhibidores Don y Aloxan.

Cabe aclarar que se realizaron algunas modificaciones en cuanto la siembra de los astrocitos en las placas de 96 pozos, por motivos externos de los investigadores. Se realizaron en total 2 ensayos, es decir 2 experimentos. Esto último por el retraso de la disponibilidad del laboratorio de cultivo celular ubicado en la Universidad Icesi, dado que en el espacio se presentó una fuerte contaminación, y retrasó la fecha de iniciación del proyecto. Ahora bien en cuanto la siembra de los pozos, como se

mencionó anteriormente en el diseño experimental esta descrito que se haría la siembra de 5 columnas y 8 filas para los 4 tratamientos establecidos. Esta distribución tuvo que ser modificada por falta de reactivos necesarios para la siembra de los astrocitos.

En el primer ensayo, se realizó la siembra de las 5 columnas y 8 filas para los 4 tratamientos como estaba establecido desde el inicio. Sin embargo por motivos de escases de medios, se tuvo que modificar la distribución de la siembra para el segundo ensayo; se removieron filas sembradas, es decir, se sembraron 5 columnas y 5 filas en los 4 tratamientos pertenecientes al ensayo 2.

2.4.5 Adición de los inhibidores Don y Aloxxan

Al día *In vitro* 8 se adiciono a las placas los inhibidores Don, Aloxxan y la mezcla de estos dos. Los inhibidores tuvieron la siguiente distribución; Dos columnas control, es decir sin inhibidor, otra columna con el inhibidor Don, la siguiente columna con el inhibidor Aloxxan, y la última columna con la combinación de ambos inhibidores, Don y Aloxxan. Esta distribución fue igual para las 4 placas, es decir para los 4 tratamientos de cada experimento. La adición de los inhibidores se puede observar en la siguiente figura.

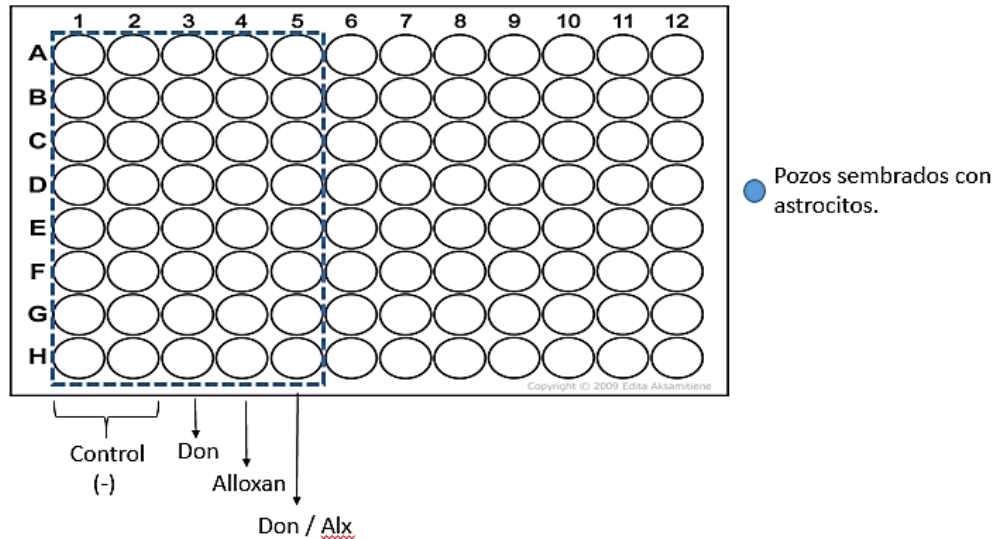


Figura 4. Distribución de astrocitos en placa de 96 pozos, junto con la distribución de los inhibidores.

Para determinar la concentración de los inhibidores a adicionar a los cultivos, se realizó una revisión bibliográfica en la cual se encontraron diversos estudios relacionados con los inhibidores Don y Aloxxan en modelos experimentales *In vitro*. En un estudio realizado por (Willis & Edwin Seegmiller, 1977) en una suspensión de

linfoblastos humanos, encontró que la exposición de las células a 0,3 mM de Don, inhibe más del 95% de la actividad de la vía de las hexosaminas. Adicional a esto, se encontraron dos estudios independientes, en donde (Hamiel, Pinto, Hau, & Wischmeyer, 2009) y (Al-Oanzi, 2013) encontraron que con 40 µL de Don, era suficiente para la inhibición de la enzima GFAT en cultivos *In vitro* de fibroblastos embrionicos murinos y cultivos *in vitro* de Hepatocitos respectivamente. Se tomó además como referencia los tiempos de incubación del inhibidor la cual fue de 18 horas.

Se procedió a hacer la misma revisión bibliográfica para el inhibidor Aloxan. Se tomó como referencia 3 trabajos independientes los cuales midieron el efecto del inhibidor en cultivos *in vitro*, los trabajos de (Konrad et al., 2002), (Dehennaut et al., 2007) y (Hamiel et al., 2009), este último citado anteriormente, obtuvieron como resultado que la exposición de las células a una concentración en los rangos de 1-5 mM de Aloxan, tuvieron una respuesta positiva, es decir se obtuvo una inhibición exitosa de la vía en donde la enzima blanco de Aloxan está presente. Los tiempos de incubación en los estudios citados varían entre 1 a 12 horas.

Considerando los datos mencionado anteriormente, se constituyeron los tiempos y las concentraciones con los cuales serían tratados los cultivos. El tiempo de incubación de los inhibidores se estableció a 16 horas tanto para Don y Aloxan. En cuanto a las concentraciones de los inhibidores se diluyeron 5,5 µL de **Don** [29,21mM] en 4 mL de medio de astrocitos para tener una concentración final de 40 µL. Para Aloxan se diluyo 20 uL de **Aix** [100 mM] en 4 mL de medio de astrocitos para una concentración final de 0,5 µL. Los inhibidores fueron adicionados a todas las placas que representaron los 4 tratamientos, como se puede observar en la Tabla 1.

2.4.6 Privación de glucosa y oxígeno (pre condicionamiento / OGD)

Al día 9 *in Vitro*, se realizó la privación de glucosa y oxígeno a las placas cultivadas. El procedimiento inicio con el constante burbujeo del medio HBSS con nitrógeno. Este burbujeo fue constante durante todo el procedimiento para garantizar que el nitrógeno se disolviera y desplazara al oxígeno. Además del burbujeo, las soluciones fueron sonicadas, para remover cualquier burbuja de oxígeno presente en el medio.

Una vez que el medio estuviera sonicado y burbujeado, se retiró una de las placas de la incubadora y bajo cabina de flujo laminar se realizaron 3 lavados con el medio sonicado y burbujeado con N₂; en el cuarto cambio de medio las células fueron dejadas un breve momento, para posteriormente llevar a cabo el respectivo tratamiento. Este procesos se realizó lo más rápido posible para evitar de difusión de oxígeno presente en el ambiente.

Una vez cambiado el medio, se realizó la hipoxia. La hipoxia se efectuó en cámaras anoxicas diseñadas por el docente/ estudiante de Doctorado Carlos Cardozo. Inicialmente las cámaras fueron limpiadas con etanol para evitar posibles contaminaciones al cultivo. Las placas sembradas fueron escogidas al azar para asignarles su respectivo tratamiento. Los tratamientos se pueden observar en la siguiente tabla.

Cultivo de Astroцитos			
Tratamiento	Inhibidor	Estimulo (no letal)	Estimulo (letal)
Control	Si	-	-
OGD 15 min	Si	+	-
OGD 120 min	Si	-	+
Prec	Si	+	+

Tabla 1. Diseño experimental. Tratamientos, tiempos y estímulos realizados. Se realizó un total de 4 tratamientos, todos asignados a los platos cultivados al azar. Los símbolos positivos (+) hace referencia a la realización de los estímulos (Letal y/o no letal) y los signos negativos (-) no se realizó dicho estímulo. Se registra además el tiempo no letal es decir, pre condicionante (OGD 15 min) y letal (OGD 120 min) de los tratamientos. Tiempos encontrado por la estudiante Nicole Tovar Patiño (Patiño., 2017). El pre condicionamiento se abrevia como Prec en la tabla.

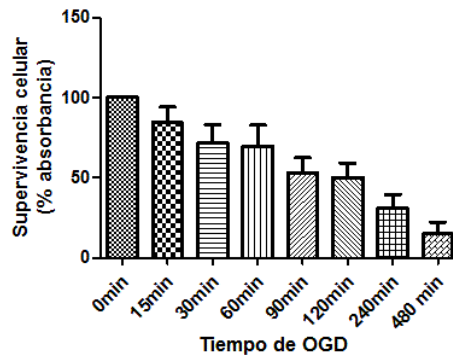
Seguido de esto, se introdujo la placa escogida juntos con los elementos necesarios requeridos para hacer cambio de medios dentro la cámara anoxica. Se procedió a retirar el aire de la cámara con la ayuda de una bomba y luego la cámara se llenó de nuevo con nitrógeno, este procedimiento se repitió 3 veces. Una vez llena la cámara de N₂, se ventilo el cultivo con la tapa de la placa con el objetivo de que el nitrógeno desplazara posibles cantidades de oxígeno presente en el ambiente y el cultivo; se hicieron 3 lavados con HBSS sonicado y burbujeado (dentro de la cámara), para asegurar de nuevo que se estuviera efectuando la hipoxia.

Al tercer lavado dentro de la cámara anoxica el tiempo se registró y en ese momento inicio el estímulo no letal (OGD 15 min). El tiempo lo determino la estudiante Nicole Tovar Patiño, en donde encontró en su tesis de grado que “el tiempo no letal de privación simultanea de glucosa y oxígeno es de 15 minutos, ya que la supervivencia celular es de 84 % +/- 9,722” (Patiño, 2017). Sellado el cultivo en una sub cámara anoxica, esta se llevó a incubar por 15 minutos a 37°C/ humedad relativa al 100%.

Pasado el tiempo de incubación, se retiró el cultivo de la cámara anoxica y se expuso el cultivo a condiciones normales, y se le realizo un cambio de medio que se encuentra en condiciones de normoxia (MEM, D-glucosa, Pen/Strep/Amph, HS). La placa se dejó en “reposo” durante una hora en la incubadora a 37°C /humedad

relativa 100% y en este momento finaliza el estímulo no letal. Pasada la hora, se llevó a cabo el estímulo letal (OGD 120 min), el procedimiento para realizar el estímulo es el mismo descrito previamente, con la única diferencia siendo el tiempo en el cual se dejó el cultivo con privación de glucosa y oxígeno. El tiempo letal escogido fue de 120 minutos “ya que en promedio el porcentaje de supervivencia celular es de 50% +/- 9,083” (Patiño, 2017). Estos tiempos descritos y escogidos para los ensayos se pueden observar en la siguiente gráfica, obtenida por la estudiante Nicole Tovar Patiño en su tesis de grado.

Porcentaje de Supervivencia de Células Cerebras



Gráfica 1. Porcentaje de supervivencia en células cerebrales. “Se representa la supervivencia como el porcentaje de los promedios para cada uno de los ensayos de determinación de tiempos. Aquí se tiene en cuenta el valor de muerte células dado por el tritón. Promedio +/- EEM”. (Patiño, 2017).

El procedimiento descrito anteriormente se realizó para el cultivo con el tratamiento pre condicionante (OGD 15 min y OGD 120 min) es decir positivo para los dos estímulos, como se puede observar en la Tabla 1. Para los cultivos con un solo estímulo, se realizó el mismo procedimiento descrito, variando únicamente los tiempos de privación de glucosa y oxígeno, es decir un cultivo se sometió a solo 15 minutos de hipoxia (estímulo no letal) y otro cultivo se sometió a 120 minutos de hipoxia (estímulo letal). Los cultivos control se sometieron únicamente a lavados con HBSS sonificado y burbujeado. Se realizó la misma cantidad de lavados que los otros tratamientos, y posteriormente se dejó en el medio plating médium astrocitos en condiciones de normoxia. El cultivo control fue negativo para los estímulos tanto letal como no letal. En la siguiente figura se resume de manera gráfica el procedimiento descrito anteriormente.

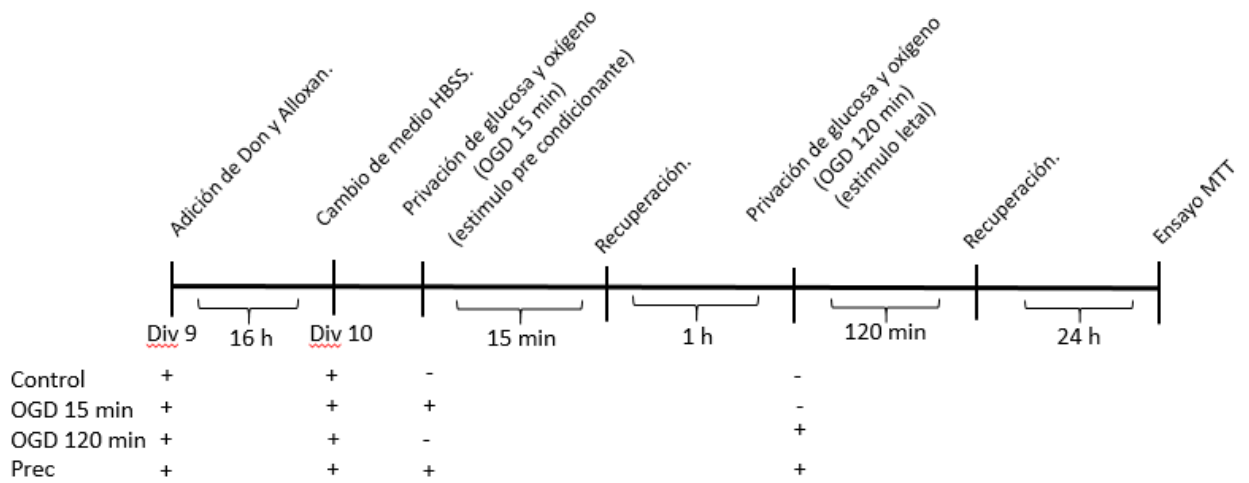


Figura 5. Línea de tiempo de procedimiento de privación de glucosa y oxígeno. Los símbolos positivos (+) hace referencia a la realización del procedimiento descrito en la línea de tiempo (adición de inhibidores, estímulo Letal y/o no letal) y los signos negativos (-) no se realizó dicho estímulo. Los tratamientos se abrevian en la figura como; Pre condicionamiento (Prec), Privación de glucosa y oxígeno no letal (OGD 15 min), Privación de glucosa y oxígeno letal (OGD 120 min).

2.4.7 Evaluación de la viabilidad celular por ensayo MTT.

Pasada las 24 horas de incubación, como se puede observar en la figura 5, se realizó el ensayo MTT para medir la viabilidad celular. Para el ensayo MTT se siguió el protocolo ya establecido en el laboratorio de Biofarmacia de la universidad Icesi.

Se inició haciendo un cambio total de medio, 100 μ L plating médium astrocitos /pozo. En este paso se adicionaron 3 pozos adyacentes a la última columna sembrada, y estos se tomaron como blancos; además, se escogió la última fila de pozos sembrados como pozos de muerte. Estos últimos fueron tratados con solución de plating médium de astrocitos que contenía 1 μ L de Triton.

Se pesó 2,5 mg de MTT y se disolvió en 500 μ L de HBSS. Preparado el MTT, se agregó a cada pozo 10 μ L de la solución MTT y posteriormente se llevó a incubar por 4 horas a 37°C /humedad relativa 100%. Pasada las 4 horas se retiró 85 μ L del medio y se adiciono 50 μ L de DMSO (DiMetilSulfOxido) a cada pozo. Se incubaron de nuevo los cultivos por 10 minutos y finalmente se realizó la lectura de la absorbancia de los cultivos, con un lector de platos a 540 nm.

2.4.8 Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron con el software GraphPad Prism 5. Inicialmente se determinó la distribución normal de los resultados con un test de normalidad de D' Agostino y Pearson. Dependiendo de la normalidad de los

resultados, se procedió a realizar una prueba de 1way- ANOVA (distribución normal) y posteriormente un test de comparación múltiple de Tukey; o una prueba de Kruskal wallis (Distribución no normal) y posteriormente una test de comparaciones multiple de Dunn.

2.4.9 Matriz de Marco lógico

Objetivos	Actividades	Supuestos	Indicadores
<p>1. Evaluar el efecto de Don sobre la viabilidad celular bajo condiciones de privación de glucosa y oxígeno.</p>	<p>Capacitación en preparación de cultivo celular y manejo de kit MTT.</p> <p>Estandarización de pruebas colorimétricas para análisis de supervivencia celular.</p> <p>Comparar porcentaje de supervivencia celular con placas sin y con inhibidores mediante pruebas estadísticas.</p>	<p>Disponibilidad del kit MTT.</p> <p>Capacitación en el uso de espectrofotómetro.</p> <p>Disponibilidad y buen funcionamiento de lector de placas.</p> <p>Suministro constante de electricidad.</p> <p>Buen funcionamiento de computadores para análisis de espectrofotometría.</p>	<p>Porcentaje de supervivencia celular determinado.</p> <p>Evaluación de viabilidad celular bajo condiciones de privación de glucosa y oxígeno mediante análisis estadístico realizado.</p>

<p>2. Evaluar el efecto de Aloxan sobre la viabilidad celular bajo condiciones de privación de glucosa y oxígeno.</p>	<p>Capacitación en preparación de cultivo celular y manejo de kit MTT.</p> <p>Estandarización de pruebas colorimétricas para análisis de supervivencia celular.</p> <p>Comparar porcentaje de supervivencia celular con placas sin y con inhibidores mediante pruebas estadísticas.</p>	<p>Disponibilidad del kit MTT.</p> <p>Capacitación en el uso de espectrofotómetro.</p> <p>Disponibilidad y buen funcionamiento de lector de placas.</p> <p>Suministro constante de electricidad.</p> <p>Buen funcionamiento de computadores para análisis de espectrofotometría.</p>	<p>Porcentaje de supervivencia celular determinado.</p> <p>Evaluación de viabilidad celular bajo condiciones de privación de glucosa y oxígeno mediante análisis estadístico realizado.</p>
<p>3. Evaluar el efecto de la combinación de Don y Aloxan sobre la viabilidad celular bajo condiciones de privación de glucosa y oxígeno.</p>	<p>Capacitación en preparación de cultivo celular y manejo de kit MTT.</p> <p>Estandarización de pruebas colorimétricas para análisis de supervivencia celular.</p> <p>Comparar porcentaje de supervivencia celular con placas sin y con inhibidores mediante pruebas estadísticas.</p>	<p>Disponibilidad del kit MTT.</p> <p>Capacitación en el uso de espectrofotómetro.</p> <p>Disponibilidad y buen funcionamiento de lector de placas.</p> <p>Suministro constante de electricidad.</p> <p>Buen funcionamiento de computadores para análisis de espectrofotometría.</p>	<p>Porcentaje de supervivencia celular determinado.</p> <p>Evaluación de viabilidad celular bajo condiciones de privación de glucosa y oxígeno mediante análisis estadístico realizado.</p>

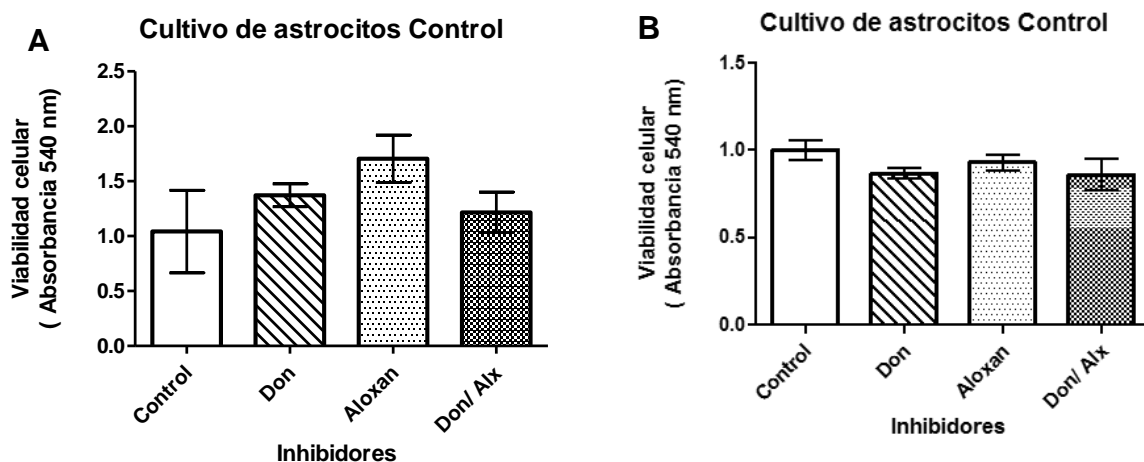
2.5 Resultados

2.5.1 Determinación del efecto de los inhibidores Don y Aloxan en cultivos de astrocitos sin ningún estímulo (control).

Previamente se describió el protocolo y el diseño experimental empleado para determinar el efecto que tienen los inhibidores Don y Aloxan sobre la viabilidad celular de un cultivo *In vitro* de células cerebrales. Se plantearon 4 tratamientos; Control (sin estímulo), estímulo pre condicionante (Prec), estímulo letal (OGD) y por ultimo un estímulo PrecOGD, es decir pre condicionante y letal. Cada uno de estos tratamientos tuvo como propósito, ayudar a determinar el comportamiento (viabilidad celular) de las células cerebrales bajo diferentes estímulos, una vez se haya inhibido la vía de las hexosaminas que conlleva a la glicosilación proteica.

En total se realizaron dos experimentos. Cada uno con los mismos tratamientos, inhibidores y distribución explicados en la metodología. Sin embargo debido a problemas de tiempo y disponibilidad de reactivos, se realizaron cambios en el segundo ensayo, este último siendo la distribución de la siembra en la placa de 96 pozos. En el primero ensayo se sembraron 5 columnas y 8 filas, para obtener un total de 40 pozos sembrados; En el segundo ensayo se sembraron 5 filas y 5 columnas, para un total de 25 pozos sembrados. Se tiene que considerar entonces que existe una diferencia entre los tratamientos de 15 pozos, es decir 15 lecturas de absorbancia.

A continuación se registran las gráficas obtenidas para el tratamiento control.



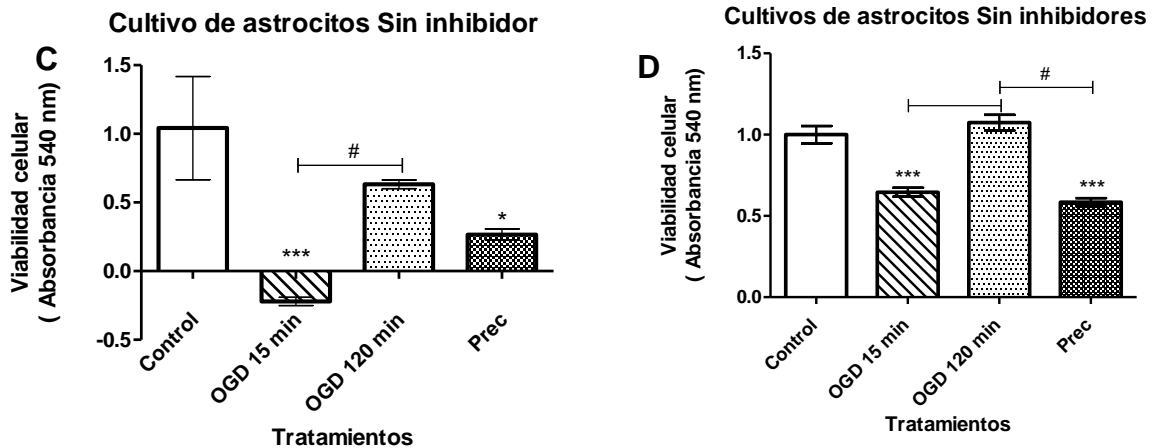
Gráfica 2. Efecto de los inhibidores Don, Aloxan y Don/Alx en cultivos de astrocitos sin reducción de oxígeno ni glucosa. (A) En la gráfica A se registran los datos obtenidos para el ensayo 1. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia normalizada con respecto al control. Promedio +/- EEM, n=8 para cada inhibidor. (B) En la gráfica B se registran los datos obtenidos

para el ensayo 2. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia, normalizadas con respecto al control. Promedio +/- EEM, n=5 para cada inhibidor.

Para cada ensayo, se realizó de manera independiente el análisis estadístico descrito en la sección 2.4.8. Los dos ensayos presentan distribución normal; por lo cual se procedió a realizar 1way-ANOVA y posteriormente un post test de comparación múltiple de Tukey. No se observan diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) entre las columnas tratadas con los diferentes inhibidores para el ensayo 1 (**gráfica A**); valor $p= 0.5296$. De igual manera, no se presentan diferencias estadísticamente significativas entre las columnas tratadas con los diferentes inhibidores para el ensayo 2 (**gráfica B**); valor $p= 0.2809$.

2.5.2 Determinación del efecto de los estímulos OGD en cultivos de astrocitos sin ningún inhibidor.

Se tomaron además, todas las columnas control designadas para cada tratamiento (control, OGD 15 min, OGD 120 min, Prec), es decir todas las columnas que no tenían inhibidor, pero si la exposición a la reducción de oxígeno y glucosa correspondiente a cada tratamiento. Esto con el fin de registrar el comportamiento de las células, sin ninguna inhibición, ante diferente tipo de OGD. Los resultados se pueden observar en las siguientes gráficas.

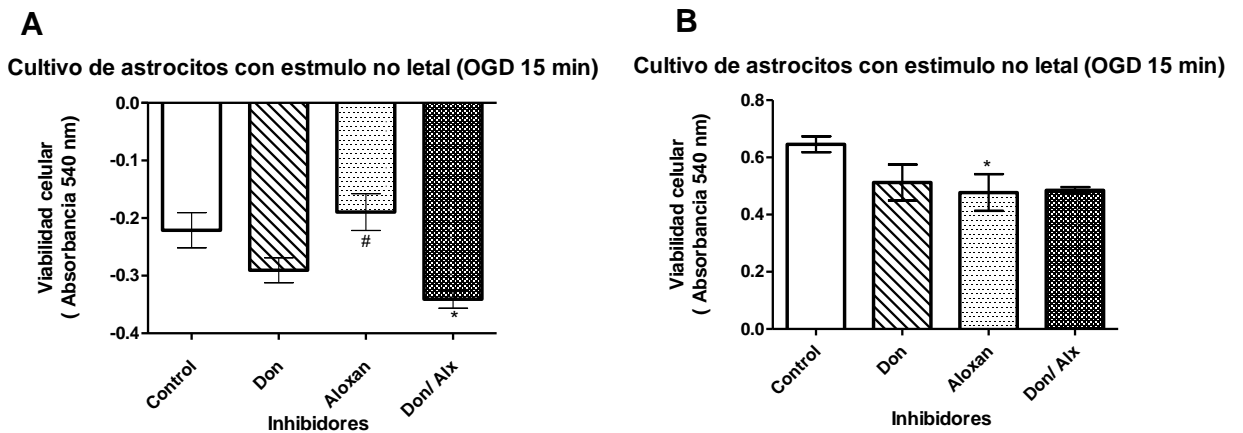


Gráfica 3. Efecto de los tratamientos a las columnas control (sin inhibidor). (C) En la gráfica C se registran los datos obtenidos para el ensayo 1. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia normalizada con respecto al control. Promedio +/- EEM, n=8 para cada tratamiento. (***) = existe diferencia significativa respecto al control) y (# = existe diferencia significativa entre los tratamientos). (D) En la gráfica D se registran los datos obtenidos para el ensayo 2. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia normalizada con respecto al control. Promedio +/- EEM, n=5 para cada tratamiento. (***) = existe diferencia significativa respecto al control) y (# = existe diferencia significativa entre los tratamientos).

Se realizó de manera independiente el análisis estadístico el ensayo 1 y el ensayo 2. Los dos ensayos presentan distribución normal; por lo cual se procedió a realizar 1way- ANOVA y posteriormente un post test de comparación múltiple de Tukey. Se observan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.0001$) entre las columnas control de los diferentes tratamientos para el ensayo 1 (**grafica C**). De igual manera, Se presentan diferencias estadísticamente significativas entre las columnas control de los diferentes tratamientos para el ensayo 2 (**grafica D**); valor $p < 0.0001$

2.5.3 Efecto de un estímulo no letal (OGD 15 min) en cultivos de astrocitos tratados con Don, Aloxan y Don/ Alx.

La segunda evaluación fue determinar el efecto del estímulo no letal (OGD 15 minutos) en los cultivos de astrocitos. Los resultados se pueden observar en las siguientes gráficas.

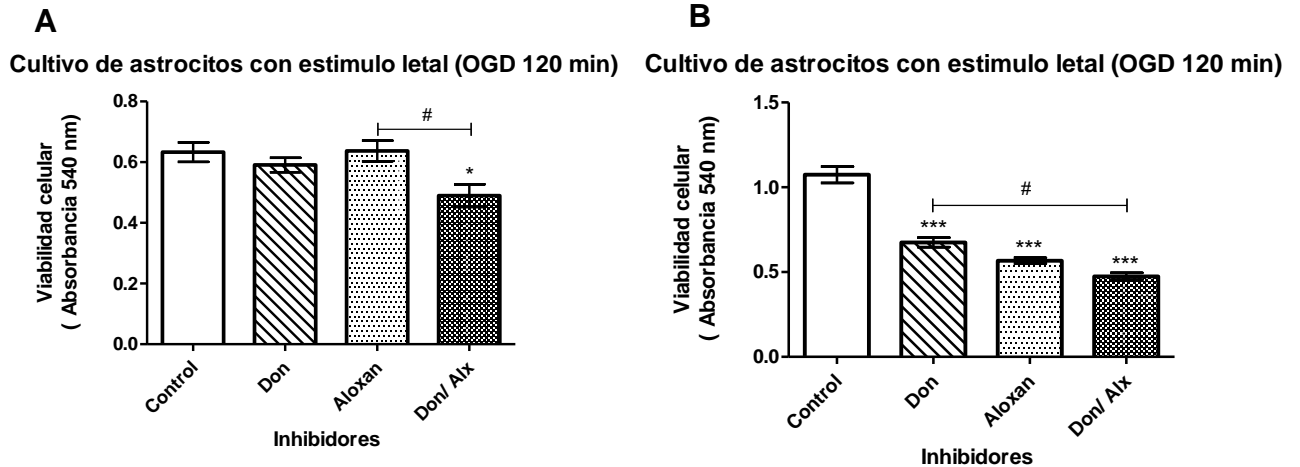


Gráfica 4. Efecto del estímulo no letal (OGD 15 min) en cultivos de astrocitos tratados con Don, Aloxan y Don/ Alx. (A) En la gráfica A se registran los datos obtenidos para el ensayo 1. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia normalizada con respecto al control. Promedio +/- EEM, $n=8$ para cada inhibidor. (***) = existe diferencia significativa respecto al control) y (# = existe diferencia significativa entre los tratamientos). (B) En la gráfica B se registran los datos obtenidos para el ensayo 2. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia normalizada con respecto al control. Promedio +/- EEM, $n=5$ para cada inhibidor. (* = existe diferencia significativa respecto al control).

Los dos ensayos presentan distribución normal; Se observan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre las columnas de los inhibidores ante el estímulo no letal (OGD 15 min). Para el ensayo 1 (**grafica A**); valor $p = 0.0095$. De igual manera, se presentan diferencias estadísticamente significativas entre las columnas de los diferentes inhibidores para el ensayo 2 (**grafica B**); valor $p = 0.0193$

2.5.4 Efecto del estímulo letal (OGD 120 min) en cultivos de astrocitos tratados con Don, Aloxan y Don/ Alx.

La tercera evaluación fue determinar el efecto del estímulo letal (OGD 120 minutos) en los cultivos de astrocitos. Los resultados se pueden observar en las siguientes gráficas.



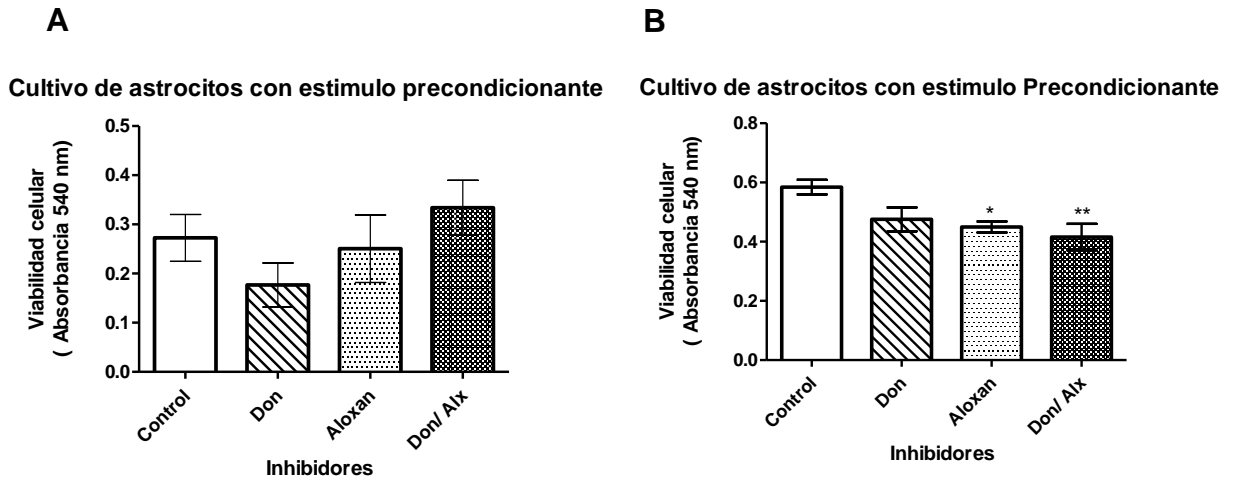
Gráfica 5. Efecto del estímulo letal (OGD120 min) en cultivos de astrocitos tratados con Don, Aloxan y Don/ Alx. (A) En la gráfica A se registran los datos obtenidos para el ensayo 1. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia normalizada con respecto al control. Promedio +/- EEM, n=8 para cada inhibidor. (* = existe diferencia significativa respecto al control) y (# = existe diferencia significativa entre los tratamientos). (B) En la gráfica B se registran los datos obtenidos para el ensayo 2. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia normalizada con respecto al control. Promedio +/- EEM, n=5 para cada inhibidor. (***) = existe diferencia significativa respecto al control) y (# = existe diferencia significativa entre los tratamientos).

Los dos ensayos presentan distribución normal; Se observan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre las columnas de los inhibidores ante el estímulo letal (OGD). Para el ensayo 1 (**gráfica A**); valor $p = 0.0249$. De igual manera, se presentan diferencias estadísticamente significativas entre las columnas de los diferentes inhibidores para el ensayo 2 (**gráfica B**); valor $p < 0.0001$.

2.5.5 Efecto del Pre condicionamiento (OGD 15/120 min) en cultivos de astrocitos tratados con Don, Aloxan y Don/ Alx.

Para finalizar el procedimiento y ultimar el diseño experimental, se determinó el efecto que tiene un protocolo que podría generar un pre condicionamiento que

consta de un OGD de 15 min seguido por un OGD de 120 min en los cultivos de astrocitos. Los resultados se pueden observar en las siguientes gráficas.

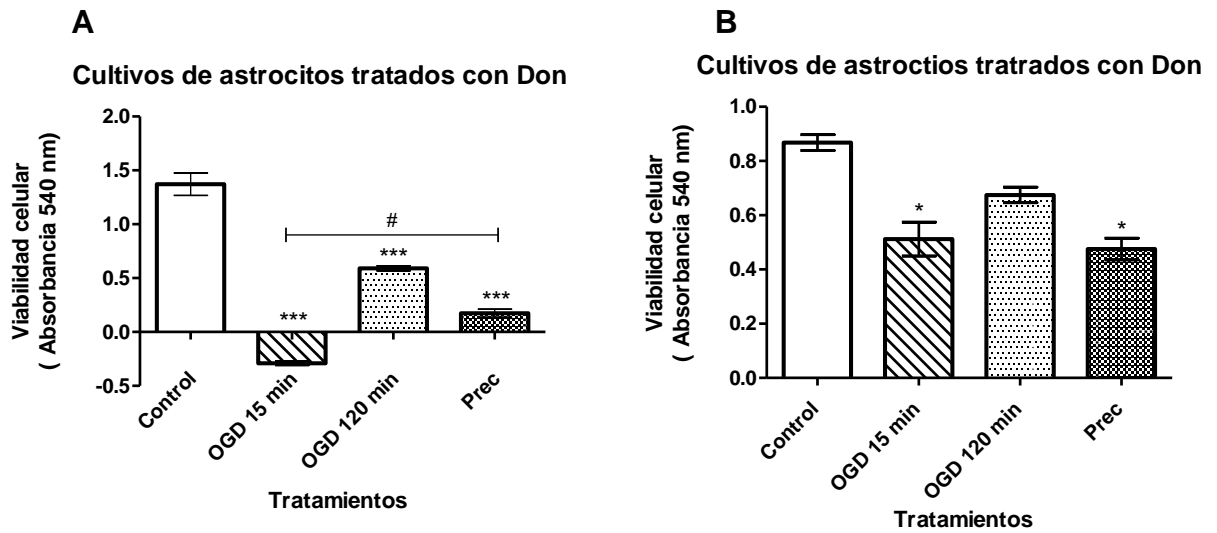


Gráfica 6. Efecto del estímulo Pre condicionante (OGD 15-120 min) en cultivos de astrocitos tratados con Don, Aloxan y Don/Alx. (A) En la gráfica A se registran los datos obtenidos para el ensayo 1. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia normalizada con respecto al control. Promedio +/- EEM, n=8 para cada inhibidor. (B) En la gráfica B se registran los datos obtenidos para el ensayo 2. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia normalizada con respecto al control. Promedio +/- EEM, n=5 para cada inhibidor. (* = existe diferencia significativa respecto al control).

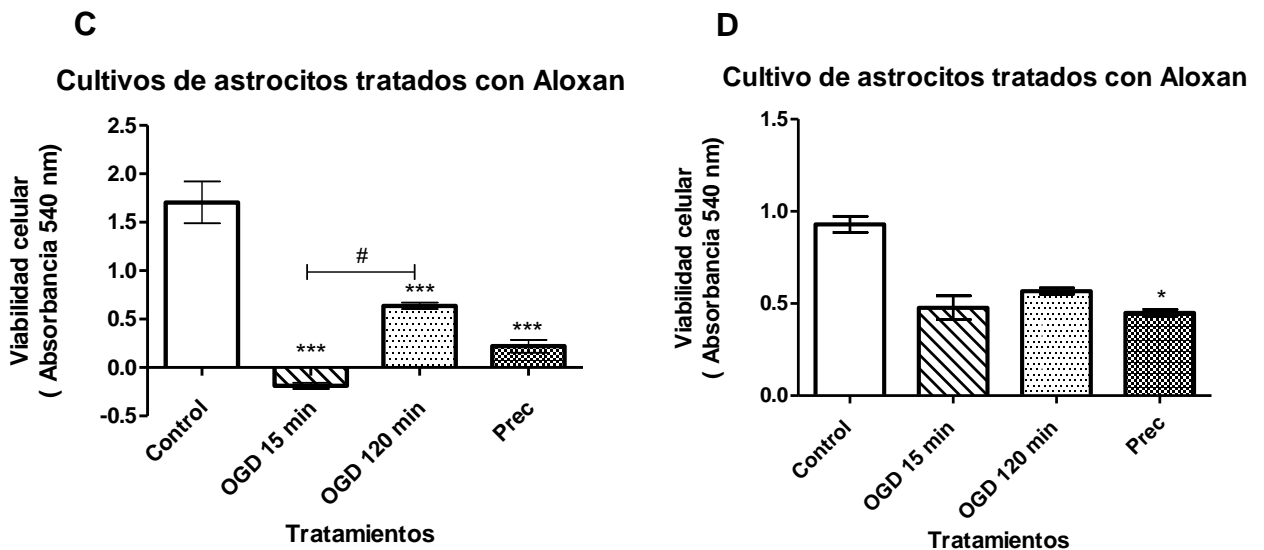
Los dos ensayos pasaron la prueba de normalidad; No se observan diferencias estadísticamente significativas entre las columnas de los inhibidores ante el pre condicionamiento (OGD 15/120 min)) para el ensayo 1 (**gráfica A**); valor $p = 0.2304$. Por otra parte, se presentan diferencias estadísticamente significativas entre las columnas de los diferentes inhibidores respecto al control para el ensayo 2 (**gráfica B**); valor $p = 0.0049$.

2.5.6 Efecto de los inhibidores Don, Aloxan y Don/Alx en los cultivos *in vitro* de astrocitos ante los diferentes tratamientos de OGD.

Se pretendió evaluar de manera independiente el efecto que tenían los inhibidores Don, Aloxan y Don/Alx en los cultivos de astrocitos sometidos a diferentes tratamientos de OGD. Para esto, se tomaron las columnas tratadas con Don de los 4 tratamientos y se procedió a graficarlas, se realizó esto para cada inhibidor. En las siguientes graficas se observan los resultados.

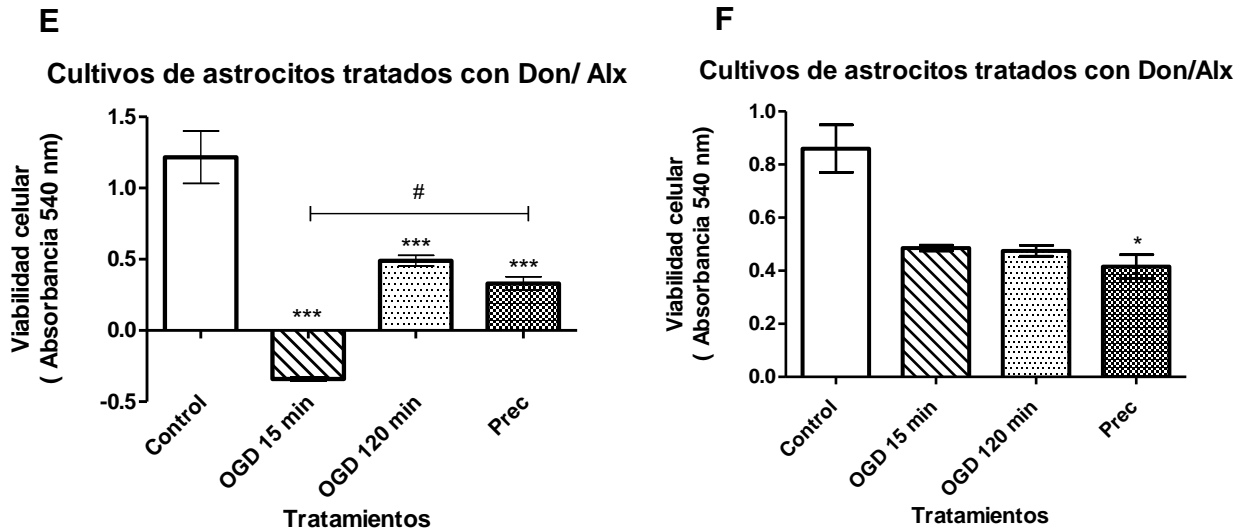


Gráfica 7. Efecto del inhibidor Don en los cultivos de astrocitos tratados con estímulos no letal (OGD 15 min), letal (OGD 120) y Pre condicionante (OGD 15/120 min). (A) En la gráfica A se registran los datos obtenidos para el ensayo 1. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia normalizada con respecto al control. Promedio +/- EEM, n=8 para cada inhibidor. (***) = existe diferencia significativa respecto al control) y (# = existe diferencia significativa entre los tratamientos) (B) En la gráfica B se registran los datos obtenidos para el ensayo 2. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia normalizada con respecto al control. Promedio +/- EEM, n=5 para cada inhibidor. (* = existe diferencia significativa respecto al control).



Gráfica 8. Efecto del inhibidor Aloxan en los cultivos de astrocitos tratados con estímulos no letal (OGD 15 min), letal (OGD 120 min) y Pre condicionante (Prec). (C) En la gráfica C se registran los datos obtenidos para el ensayo 1. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia

normalizada con respecto al control. Promedio +/- EEM, n=8 para cada inhibidor. (***) = existe diferencia significativa respecto al control) y (# = existe diferencia significativa entre los tratamientos) (D) En la gráfica D se registran los datos obtenidos para el ensayo 2. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia normalizada con respecto al control. Promedio +/- EEM, n=5 para cada inhibidor. (* = existe diferencia significativa respecto al control).



Gráfica 9. Efecto de la combinación de los inhibidores Don y Aloxan en los cultivos de astrocitos tratados con estímulos no letal (OGD 15 min), letal (OGD 120 min) y Pre condicionante (Prec). (E) En la gráfica E se registran los datos obtenidos para el ensayo 1. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia normalizada con respecto al control. Promedio +/- EEM, n=8 para cada inhibidor. (***) = existe diferencia significativa respecto al control) y (# = existe diferencia significativa entre los tratamientos) (F) En la gráfica F se registran los datos obtenidos para el ensayo 2. La viabilidad se mide en nivel de absorbancia normalizada con respecto al control. Promedio +/- EEM, n=5 para cada inhibidor. (* = existe diferencia significativa respecto al control).

2.6 Discusión

2.6.1 Determinación del efecto de los inhibidores Don y Aloxan en cultivos de astrocitos sin ningún estímulo (control).

Con el fin de determinar el efecto que tienen los inhibidores Don, Aloxan y la combinación de estos dos en el cultivo de astrocitos obtenidos de la corteza cerebral de neonatos de rata, se realizaron siembras de las células en placas de 96 pozos como se puede observar en la **figura 4**. Se hizo una distribución por columnas de los inhibidores Don, Aloxan y la combinación de estos dos. La concentración de los

inhibidores fue determinada dada una revisión bibliográfica donde varios autores (Willis & Edwin Seegmiller, 1977); Hamiel, Pinto, Hau, & Wischmeyer, 2009; Al-Oanzi, 2013; Konrad et al., 2002; & Dehennaut et al., 2007) en estudios independientes determinaron las concentraciones adecuadas de Don y Aloxan para la inhibición de la vía de las hexosaminas, con más de un 80% de inhibición.

Inicialmente se realizó un cultivo control para los dos ensayos realizados; el cultivo control contaba con la adición de los inhibidores, como se describe en el diseño experimental, pero no hubo ningún estímulo de privación de glucosa y oxígeno. Esto con el fin de evaluar el comportamiento y/o el efecto que tenían los inhibidores sobre los astrocitos en condiciones normales. Resultados que se presentan en la gráfica 2.

Como se mencionó anteriormente en el apartado 2.4.4, se realizaron en total 2 ensayos los cuales varían en su número de n, es decir en el tamaño de muestra. Para el ensayo 1 se realizaron siembra de 40 pozos, en contraste con el ensayo 2 en donde se sembraron un total de 25 pozos. En la **gráfica 2A** se puede observar los resultados obtenidos del ensayo 1 para los astrocitos sembrados con los respectivos inhibidores bajo condiciones normales. A simple vista se puede observar que los astrocitos presentan variaciones en cuanto la viabilidad celular. Se esperaría que las columnas arrojaran valores semejantes entre ellas mismas, es decir entre los diferentes inhibidores y con respecto al control, ya que estudios realizado han encontrado que bajo condiciones de normoxia las células son relativamente insensibles a la presencia de Don y Aloxan, y no presentan ningún tipo de toxicidad para las células (H. Zhang, 1995) (Jia Liu, 2007).

Sin embargo, esta variación puede ser resultado de errores en la siembra de los astrocitos. Para realizar la siembra de estos últimos, se empleó una pipeta multicanal la cual presentaba pequeños problemas de absorción, dado que las puntas empleadas parecían no estar sellando correctamente con los canales. Además de esto el canal #8 de la pipeta siempre tomaba un volumen menor respecto a los otros canales. Con esto se llega a que la posible causa de la variación de la viabilidad celular es la diferenciación del volumen en el cual crecían las células. Posiblemente algunos pozos obtuvieron un volumen menor de plating médium de astrocitos y por falta de nutrientes tuvieron una proliferación menor respecto a los otros pozos. Esta diferencia de células por cada pozo, puede variar la lectura de la absorbancia de las columnas ya que a mayor número de células, mayor la absorbancia (en condiciones normales) (ORDOÑEZ, 2016).

Ahora bien, analizando los resultados del ensayo 2, mostrados en la **gráfica 2B**, se puede observar que la viabilidad celular es similar entre las columnas (entre los inhibidores) y respecto al control. Estos resultados son esperados ya que muestran que los inhibidores no tienen ningún efecto perjudicial ni afectan la viabilidad celular bajo condiciones normales (H. Zhang, 1995 & Jia Liu, 2007).

Los resultados de los ensayos (1 y 2) fueron todos normalizados con la columna control del tratamiento control de su respectivo ensayo. Como se explicara más adelante en la discusión, a simple vista se puede observar que los resultados para el ensayo 1 no son exactamente los esperados. Considerando las anomalías presentes en los resultados del ensayo 1, estos mismos no fueron tomados para realizar el análisis como tal, sin embargo, se usaron para hacer algunas comparaciones entre ensayos.

Ahora bien, dado que los resultados son tan diferentes, en el caso del ensayo 1 que tiene un par de datos que no son concluyentes de ninguna manera, no se considera unir los resultados de los dos ensayos, dado que al hacer esto, los resultados del ensayo 1 alterarían de una manera significativa los datos en su totalidad y solo aumentaría la incertidumbre y la variabilidad de los datos.

Cuando se comparan los resultados del ensayo 1 (**grafica 2A**) con respecto al ensayo 2 (**grafica 2B**), se puede observar diferencias significativas. Sin embargo estas diferencias se deben a cambios en el procedimiento y en el número de n como se mencionó anteriormente. Algunos de los cambios realizados para el ensayo 2 fue la concentración de la tripsina empleada a la hora de desprender los astrocitos de los frascos para trasplantar las células a las placas de 96 pozos, y el tiempo de centrifuga de los astrocitos previo a la siembra en los platos. Para el ensayo 1 se utilizó una tripsina al 0,25% lo cual se cree que fue una concentración muy alta para el desprendimiento de las células, lo cual pudo haber generado muerte celular. Adicional a esto, en uno de los pasos previos a la siembra de los astrocitos, se requirió de la centrifugación de la suspensión celular a 1200 rpm por 10 minutos; procedimiento que también parece tener un efecto negativo en las células. Debido a todo lo mencionado anteriormente, para el ensayo 2, se usó una concentración de tripsina menor, y se disminuyó el tiempo de centrifuga a 4 minutos.

Con los cambios realizados para el ensayo 2, se esperaba tener entonces mejores resultados, y por ende una diferencia entre ensayos; además de que el número de pozos sembrados fue diferente, como se ha mencionado a lo largo del texto, lo cual arroja diferencias esperadas.

Cultivos de astrocitos sin inhibidor

En la **gráfica 3C y 3D** para los ensayos 1 y 2 respectivamente, se observan las respuestas de las columnas control (sin inhibidor) ante los diferentes tratamientos de OGD. Para el ensayo 1 (**grafica 3C**) se muestran todas las columnas control para todos los estímulos de OGD realizados. Respecto a la gráfica 3C se puede observar que el tratamiento no letal (OGD 15 min) obtuvo una absorbancia negativa. Este resultado se debe a que en el plato tratado con el estímulo de OGD 15 minutos para el ensayo 1, todas las células murieron. Se cree que este resultado se obtuvo por la

concentración de la tripsina que estropeo de manera significativa a las células y posibles errores experimentales a la hora de realizar el OGD al plato.

Sin embargo si se comparan las dos graficas (**3C y 3D**) se puede ver que las columnas control para los tratamientos del estímulo letal (OGD 120 min) arrojaron un viabilidad celular mayor, en comparación con las columnas control tratadas con el estímulo pre condicionante (OGD 15 min- OGD 120 min). Estos resultados son contradictorios a varios estudios realizados, ya que se esperaría que las células tratadas con un estímulo “pre condicionante” (OGD 15 min) le confiera a las células “una respuesta auto protectora a la disponibilidad de nutrientes y al estrés celular” (Sujith Dassanayaka, 2014) ante un estímulo posterior que es letal (OGD 120 min) y de esta manera aumentando su supervivencia celular, en comparación a aquellas células que se sometieron solamente a un estímulo letal (OGD 120 min) (Hausenloy DJ, 2009).

La alta viabilidad celular de los astrocitos tratados con un OGD 120 minutos comparada con la viabilidad con un OGD de 15 min es visible en todos los ensayos; tanto en el 1 como en el 2. Esta respuesta también se puede observar en los cultivos tratados con Don bajo diferentes estímulos de OGD (**grafica 7**), cultivos tratados con Aloxan (**grafica 8**) y cultivos tratados con Don y Aloxan (**grafica 9**). Con esto se puede decir que el estímulo pensado como “pre- condicionante” (OGD 15 min) en sí, no está beneficiando a las células y no se puede tomar como un tiempo de pre-condicionamiento isquémico que favorezca y aumente la viabilidad celular. Pero este además es un resultado extraño que nos obliga a estudiar las condiciones en las que se hizo el ensayo de 15 min comparado con el ensayo de 120 min.

2.6.2 Efecto del estímulo no letal (OGD 15 min), letal (OGD 120 min) y pre condicionante (OGD 15-120 min) en cultivos de astrocitos tratados con Don, Aloxan y Don/ Alx.

El segundo procedimiento fue determinar el efecto de los estímulos letal, no letal y el estímulo pre condicionante, el cual se define como un estímulo no letal (OGD 15 min) seguido de un estímulo letal (OGD 120 min), (Patiño, 2017) (Rudolf Brôdemann, 2014).

Los resultados para el estímulo no letal (OGD 15 minutos) se pueden observar en la **gráfica 4**. Como se mencionó anteriormente, es evidente que se presentó un error de procedimiento a la hora de efectuar el estímulo de OGD 15 min a la placa del ensayo 1 (**grafica 4A**) por lo cual los resultados obtenidos arrojaron una absorbancia negativa. Por este motivo no se tendrá en cuenta estos resultados, ya que no son concluyentes de ninguna manera ante el estímulo no letal de los astrocitos. Por otra parte la **gráfica 4B** muestra los resultados obtenidos para el ensayo 2.

El estímulo no letal (OGD 15 min) en el ensayo 2 (**gráfica 4B**) arrojo resultados esperados en cuanto la respuesta de las células ante los inhibidores. Se esperaba obtener una mayor disminución de la viabilidad celular de las células tratadas con Don y Aloxan, ya que al ellos inhibir la vía de las hexosaminas, la cual es muy sensible a los cambios en la concentración de glucosa intracelular (Timea Beleznai, 2012), frenaba el proceso de glicosilación (O-GlcNAc) de las células. Es importante resaltar que “La pérdida de la homeostasis de O-GlcNAc tiene serias consecuencias para la función celular normal” (Sung-Kyun Park, 2017) y como consecuencia ante los estímulos de privación de glucosa y oxígeno una muerte celular más pronunciada.

A pesar de demostrar que si se presenta una disminución de la viabilidad celular respecto al control, se esperaba obtener diferencias estadísticamente significativas entre las columnas tratadas con Don, Aloxan y Don/Alx. Esto dado a que los inhibidores actúan de manera diferente sobre las enzimas GFAT y OGT de la vía de las hexosaminas (**Figura 2**). Sin embargo, puede ser que la viabilidad celular este mediada por otros mecanismos que son activados ante la privación de glucosa y oxígeno. Varios estudios han demostrado que un estímulo pre condicionante (estimulo no letal OGD 15 min) puede activar diversos mecanismos y actuar en las células de forma diferente. Este estimulo no letal puede alterar/activar vías diferentes de señalización de las células en dos ventanas de tiempo. Una de estas representa cambios pos traduccionales muy rápidos y de corta duración, mientras que la segunda ventana se desarrolla lentamente después de los insultos iniciales adquiriéndole a las células una protección y resistencia ante la muerte celular (JAN LEHOTSKY, 2009). Adicional a esto, un estudio realizado por (SO-YOUNG HWANG, 2010), demostró que la O-GlcNAcilación usualmente ocurre en múltiples sitios de la célula, y la inhibición en un sitio específico, puede inducir a la glicosilación en otras áreas de la células, incluso en nuevos residuos de serina y treonina.

Todo lo dicho anteriormente hace referencia al estímulo no letal, un OGD de 15 minutos que altera a la célula dado el estrés generado sobre ella, y por ende, esta última activa mecanismos de protección celular para contrarrestar posibles lesiones ante futuros insultos isquémicos. Sin embargo para las células que fueron tratadas con un tratamiento letal (OGD 120 min) como se puede observar en la **gráfica 5** la respuesta es diferente.

En la **gráfica 5A** se registran los datos obtenidos para el ensayo 1. Una vez más, los datos arrojados por el ensayo 1 no son los esperados y no concuerdan con la literatura. En la gráfica 5A se puede observar que la columna control tiene una viabilidad celular aproximadamente de 0.023, un valor demasiado pequeño. Además que la columna tratada con el inhibidor Aloxan bajo condiciones de OGD letal presenta la misma viabilidad celular, resultados que se contradicen, ya que según la teoría, se esperaría que la columna con el inhibidor Aloxan bajo privación de glucosa y oxígeno, presente una muerte celular mayor, en este caso una viabilidad celular menor.

Por otra parte para el ensayo 2 (**grafica 5B**) se puede ver que si hay diferencias significativas entre las columnas tratadas con los diferentes inhibidores. Este resultado concuerda con los resultados esperados y la literatura. Se esperaba que las células tratadas con los inhibidores Aloxan y Don/Alx mostraran una viabilidad menor que las células tratadas solo con el inhibidor Don. Esto último ya que Don actúa sobre la enzima GFAT (figura 2), una enzima limitante de velocidad la cual convierte fructosa-6-fosfato a glucosamina-6-fosfato (Beleznai & Bagi, 2012). La inhibición de la enzima por parte de Don pueda que disminuya el flujo de glucosa a través de la HBS disminuyendo la O-GlcNAcilación, pero esta no se inhibe en su totalidad ya que, GlcN se puede convertir en glucosamina-6-fosfato y puede entrar y ser sintetizado por la enzima GNA y continuar con a la vía hasta completar la glicosilación de las proteínas como se puede observar en la figura 2. Por estos motivos se espera que la columna tratada con Don tenga mayor viabilidad celular comparada con las columnas tratadas con Aloxan y Don/Alx pero a su vez una menor viabilidad compara con el control como se observa en la gráfica **5B**.

Ahora bien el inhibidor Aloxan actúa sobre la enzima OGT y tiene como consecuencia la inhibición total de la O-GlcNAcilación, ya que esta enzima es la encargada de unir UDP-GlcNAc por enlaces O a los residuos de las proteínas. Debido a que Aloxan se deriva de uracilo y OGT usa UDP-GlcNAc como sustrato, el investigador (Robert J. Konrad, 2002) y colaboradores probaron la idea de que “Aloxan puede interferir con la O-GlcNAcilación por ser un inhibidor de OGT, posiblemente a través de una interacción de Aloxan con el dominio de unión UDP en OGT” (Robert J. Konrad, 2002). La inhibición de OGT mediada por Aloxan, detiene la O-GlcNAcilación en su totalidad ya que la enzima OGT es en sí, la encargada del último paso de la vía de HBS. Para la unión de UDP-GlcNAc solamente funciona la enzima OGT, y si esta se ve afectada, las proteínas no podrán ser glicosiladas y por ende no se le adquieren a las células estabilidad o ningún tipo de protección que ofrece la Glicosilación tipo O-GlcNAc ante los estímulos de OGD. Todo lo dicho anteriormente se puede observar en la **gráfica 5B** en donde la viabilidad es menor en comparación de la columna tratada con Don. Resultado que es concordante según la literatura.

Por ultimo al analizar la columna tratada con la combinación Don y Aloxan, se puede ver a simple vista que la viabilidad celular es mucho menor en comparación a las columnas control, Don y Aloxan. Esta diferencia fue esperada y concuerda con lo dicho anteriormente ya que al inhibir dos enzimas implicadas en dos pasos fundamentales de la vía HBS (vía de las hexosaminas) se espera obtener una glicosilación casi nula, evitando la protección de las células mediadas por O-GlcNAcilación.

Los resultados obtenidos para los platos tratados con un estímulo pre condicionante (OGD 15 min y posteriormente OGD 120 min) **grafica 6** pueden ser explicados de la misma manera a los resultados que fueron tratados con un estímulo letal (OGD 120 min) ya que si se compara la **gráfica 5B** con la **gráfica 6B**, se puede observar

que tiene la misma tendencia a disminuir la viabilidad celular dependiendo del inhibidor (Viabilidad celular Don > Viabilidad celular Aloxan > Viabilidad celular Don/Alx).

Con esto se puede concluir que los inhibidores tiene un efecto negativo en las células dado que bloquean la vía de las hexosaminas (HBS) lo cual inhibe la glicosilación tipo O-GlcNAc. Estos datos sugieren que la Glicosilación tipo O-GlcNAc si está relacionada con la supervivencia celular, lo cual a su vez concuerda con diversos estudios realizados.

2.7 Dificultades

Durante la realización del proyecto se presentaron algunas dificultades debido a una fuerte contaminación en el laboratorio por microorganismos (posiblemente hongos). Por tal motivo no fue posible iniciar el proyecto en la fecha determinada. Este retraso fue de dos meses aproximadamente, lo cual acorto de manera significativa el tiempo para el desarrollo experimental. Dada esta contaminación, la Universidad Icesi pidió agentes desinfectantes, que tardaron varias semanas en llegar, y una vez en la institución, se demoraron otro par de semanas para la aprobación de su uso, mediado por la oficina de Salud Ocupacional y Medio Ambiente (SOMA) de la universidad Icesi. Obtenidos los descontaminantes se planificaron varias jornadas de limpieza del laboratorio, lo cual no resulto exitosa la primera vez por lo que se tuvieron que realizar dos más, actividad que tomaba aproximadamente un día entero.

Adicional a esto, se tuvo problemas con la disponibilidad de los Bio modelos (Neonatos de ratas Wistar P0-P1). Dado que no se tenía certeza del estado del laboratorio, no fue posible determinar una fecha exacta para pedir los Bio modelos al Bioterio previo a la iniciación del proyecto. Por lo cual en gran medida, la fecha de inicio lo establecía el nacimiento de los neonatos (una vez que el laboratorio estuviera desinfectado).

Por otra parte, durante el desarrollo experimental se presentaron algunos inconvenientes que posiblemente tuvieron efecto en los resultados finales de los ensayos. El primer problema, fue con el material para el desarrollo del proyecto. Para hacer la siembra de los cultivos, se hizo uso de una pipeta multicanal la cual presentaba problemas con las puntas suministradas por la Universidad. Las puntas disponibles no permitían la succión del mismo volumen para todos los canales. Durante la siembra se rectificaba a simple vista si los volúmenes eran iguales, sin embargo esto no es posible determinar de esta manera, y puede que el volumen haya variado entre los pozos de los platos utilizados.

2.8 Conclusiones

Con el proyecto realizado se obtuvo evidencia de que la vía biosintética de las hexosaminas es importante para la viabilidad celular en momentos de estrés, lo cual sugiere que la glicosilación tipo O-GlcNAc está relacionada con la supervivencia celular. Cuando las células cerebrales, en este caso los astrocitos, son tratados con estímulos de privación de glucosa y oxígeno (OGD) y en simultáneo presentan una inhibición de la vía de las hexosaminas por los inhibidores Don y Aloxan, se observó una disminución en la viabilidad celular, lo cual se puede observar en las gráficas **4B**, **5B** y **6B**.

Se logró determinar además que la inhibición de la vía de las hexosaminas por la combinación de Don y Aloxan presento una viabilidad celular menor, en comparación de los otros inhibidores por separado, es decir, comparado con Don y comparado con Aloxan. Estas observaciones son coherentes en cuanto los resultados esperados para el estudio.

Se evidencio además que el estímulo no letal, OGD de 15 min, no presentaba un efecto pre condicionante que aumentara la viabilidad celular a futuros insultos letales como un OGD de 120 minutos. Esto demostrado en las gráficas **3,7**, **8** y **9**. Se concluyó de igual manera que este tiempo no letal (OGD 15 min) era perjudicial para los astrocitos empleados en los ensayos, ya que en los dos ensayos, las células bajo este estímulo no letal, presentaban una viabilidad menor en comparación con los otros estímulos. Este último siendo un resultado extraño que es de gran importancia en fases posteriores de este proyecto. Es trascendente ensayar un menor tiempo de OGD para probar si este tiempo resulta pre condicionante ante un evento mayor de OGD.

2.9 Recomendaciones

Para futuras investigaciones relacionadas con pre condicionamiento, se recomienda hacer ensayos adicionales de tiempos de privación de glucosa y oxígeno (OGD) para determinar los tiempo letales y no letales de las células cerebrales. Más importante, estos ensayos serian para determinar el tiempo no letal, pues nuestros resultados indican que 15 min de OGD no son protectores ante un estímulo letal y por lo tanto no es pre condicionante.

Por otra parte determinar una concentración no perjudicial de tripsina empleada para el desprendimiento de los astrocitos de los frascos de cultivo. Esto para asegurar que las células en los frascos no se vean tan perjudicadas y estropeadas durante el proceso de trasplante a los platos de 96 pozos.

Se recomienda además realizar ensayos en donde se evalúe diferentes concentraciones de los inhibidores Don y Aloxan, para ver cómo estos afectan la viabilidad celular bajo estímulos de privación de glucosa y oxígeno, y determinar una concentración exacta e indicada de inhibición de la vía de las hexosaminas.

Finalmente, para fortalecer los resultados y demostrar que la glicosilación tipo O-GlcNAc está relacionada con el pre condicionamiento isquémico y la supervivencia celular, realizar ensayos de inmunocitoquímica para medir los niveles de O-GlcNAc en cultivos con diferentes concentraciones de inhibidores de la vía de las hexosaminas y con diferentes tratamiento de OGD.

BIBLIOGRAFIA

- Adam OSTROWSKI, D. M. (2013). Chemical tools to probe cellular O-GlcNAc signalling. *Biochem J*, 1–12.
- Al-Oanzi, Z. H. (2013). The role of the hexosamine biosynthesis pathway in control of hepatic glucose metabolism. *Institute of Cellular Medicine*, 277.
- American Heart Association. (2016). *El ataque isquémico al cerebro*.
- C. Arango-Davila, M. E.-B.-G.-J. (2004). Fisiopatología de la isquemia cerebral focal: aspectos básicos y proyección a la clínica.
- Collazos, M. M. (2017). Enfermedad cerebrovascular. *Asociacion Colombiana de Neurologia*, 206-237.
- Davide Vigetti, S. D. (2012). Role of UDP-N-Acetylglucosamine (GlcNAc) and O-GlcNAcylation of Hyaluronan Synthase 2 in the Control of Chondroitin Sulfate and Hyaluronan Synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 35544–35555.
- Federico A. Silva, M. ,.-C. (2006). Enfermedad cerebrovascular en Colombia. Floridablanca, Santander, Colombia.
- Gerald W Hart, Y. A. (2009). The O-GlcNAc Modification. In V. A, *Essentials of Glycobiology. 2nd edition* (p. Chapter 18). NY: Esko JD, et al., editors.
- Gerald W. Hart, C. S.-C. (2011). Cross Talk Between O-GlcNAcylation and Phosphorylation: Roles in Signaling, Transcription, and Chronic Disease. *National Institute of Health* , 825–858.
- Gidday, J. M. (2006). Cerebral preconditioning and ischemic tolerance. *Neuroscience*, 12.
- Gladys A. Ngoh, H. T. (2010). O-GlcNAc Signaling in the Cardiovascular System. *American Heart Association*, 171-185.

- Guansong Wang, D. Z. (2010). Hypoxic preconditioning suppresses group III secreted phospholipase A2-induced apoptosis via JAK2-STAT3 activation in cortical neurons. *JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY*, 1039-1048.
- H. Zhang, K. ö. (1995). Insulinoma cells in culture show pronounced sensitivity to alloxan-induced oxidative stress. *Diabetologia*, 635–641.
- Hausenloy DJ, Y. D. (2009). Preconditioning and postconditioning: Underlying mechanisms and clinical application. *Atherosclerosis*, 334-341.
- I. George Fantus, H. J. (2006). The Hexosamine Biosynthesis Pathway . In C. E. Pedro Cortes, *The Diabetic Kidney* (pp. 117-133). Totowa, NJ: Humana Press.
- JAN LEHOTSKY, J. B. (2009). Ischemic Tolerance: The Mechanisms of Neuroprotective Strategy. Slovakia.
- Jia Liu, R. B. (2007). Glutamine-induced protection of isolated rat heart from ischemia/reperfusion injury is mediated via the hexosamine biosynthesis pathway and increased protein O-GlcNAc levels. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 42 , 77–185.
- Jianhua Shi1, J.-h. G.-I.-X. (2015). O-GlcNAcylation regulates ischemia-induced neuronal apoptosis through AKT signaling. *Scientific Reports*, 14.
- Kettenmann H, V. A. (2011). Neuroglia - Living Nerve Glue. *Fortschritte der Neurologie und Psychiatri*, 588-597.
- Kitagawa, K. (2012). Ischemic Tolerance in the Brain: Endogenous Adaptive Machinery Against Ischemic Stress. *Journal of Neuroscience Research*, 1043-1054.
- Koizumi, S. (2016). Ischemic tolerance mediated by microglia-astrocytes communications. *14th Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry*. Malaysia: Front. Cell. Neurosci.
- Leonidas D. Arvanitisa, K. V. (2011). Hypoxia upregulates the expression of the O-linked N-acetylglucosamine containing epitope H in human ependymal cells. *Pathology – Research and Practice*, 91-96.
- ORDOÑEZ, P. A. (2016). *EVALUACIÓN DEL PRECONDICIONAMIENTO HIPÓXICO COMO UN MECANISMO PROTECTOR EN CULTIVOS PRIMARIOS NEURONALES DE RATA WISTAR*. Cali.
- Patiño, N. T. (2017). *EVALUACIÓN DEL EFECTO PRE-CONDICIONANTE DE UNA PRIVACIÓN SIMULTANEA NO-LETAL DE GLUCOSA Y OXÍGENO, SOBRE LA CITOPROTECCIÓN EN UN MODELO IN VITRO DE CÉLULAS DE LA CORTEZA CEREBRAL DE RATAS WISTAR*. Cali.
- Riccardo Trapannone, K. R. (2016). O-GlcNAc transferase inhibitors: current tools and future challenges. *Biochemical Society Transactions*, 1-6.
- Robert J. Konrad, F. Z. (2002). Alloxan is an inhibitor of the enzyme O-linked N-acetylglucosamine transferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 207–212.
- Rudolf Brödemann, B. V. (2014). Dynamic aspects of cerebral hypoxic preconditioning measured in an in vitro model. *Neuroscience Letters*, 175-179.

- Rudolf Brödemanna, B. P. (2014). Dynamic aspects of cerebral hypoxic preconditioning measured in an in vitro model. *Neuroscience Letters*, 175– 179.
- Salud, I. N. (2013). *Enfermedad cardiovascular: principal causa de muerte en Colombia*. Bogota: Observatorio Nacional de Salud.
- Social, M. d. (2017, Mayo 8). MINSALUD. Retrieved from Enfermedades Cardiovasculares: <https://www.minsalud.gov.co/salud/publica/PENT/Paginas/enfermedades-cardiovasculares.aspx>
- 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*, 1881–1892.
- Sujith Dassanayaka, S. P. (2014). O-GlcNAc and the cardiovascular system. *Pharmacology & Therapeutics*, 62–71.
- Sung-Kyun Park, X. Z. (2017). A Conserved Splicing Silencer Dynamically Regulates O-GlcNAc Transferase Intron Retention and O-GlcNAc Homeostasis. *Cell Reports*, 1088–1099.
- T. Kaneko, K. Y. (2005, Junio 27). Late preconditioning with isoflurane in cultured rat cortical neurones.
- Timea Beleznai, Z. B. (2012). Activation of hexosamine pathway impairs nitric oxide (NO)-dependent arteriolar dilations by increased protein O-GlcNAcylation. *Vascular Pharmacology*, 115–121.
- Timea Beleznai, Z. B. (2012). Activation of hexosamine pathway impairs nitric oxide (NO)-dependent arteriolar dilations by increased protein O-GlcNAcylation. *Vascular Pharmacology*, 115–121.
- Ulrich Dirnagl, R. P. (2003). Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Neurosciences*, 1-7.
- WHO. (2006). Stroke. In *NEUROLOGICAL DISORDERS: Public health challenges* (p. 209). Switzerland: World Health Organization 2066.
- Yuri Takeuchi, M. ., (1999). Prevalencia de las enfermedades neurológicas en el Valle del Cauca. Estudio Neuroepidemiológico Nacional (EPINEURO). Colombia.
- Zachara, N. E. (2012). Detection and Analysis of (O-linked-N-Acetylglucosamine)-Modified Proteins. Chapter 13.
- Dehennaut, V., Lefebvre, T., Sellier, C., Leroy, Y., Gross, B., Walker, S., ... Bodart, J.-F. (2007). O-linked N-acetylglucosaminyltransferase inhibition prevents G2/M transition in *Xenopus laevis* oocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(17), 12527–36. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700444200>
- Hamiel, C. R., Pinto, S., Hau, A., & Wischmeyer, P. E. (2009). Glutamine enhances heat shock protein 70 expression via increased hexosamine biosynthetic pathway activity. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 297(6), C1509-19.

<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00240.2009>

Konrad, R. J., Zhang, F., Hale, J. E., Knierman, M. D., Becker, G. W., & Kudlow, J. E. (2002). Alloxan is an inhibitor of the enzyme O-linked N-acetylglucosamine transferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293(1), 207–212. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00200-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00200-0)

Willis, R. C., & Edwin Seegmiller, J. (1977). The inhibition by 6-diazo-5-oxo-L-norleucine of glutamine catabolism of the cultured human lymphoblast. *Journal of Cellular Physiology*. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040930308>

ANEXOS

Carta de aprobación del comité de ética.

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

Sr. Juliana Rengifo Gómez
Investigador Principal- Universidad Icesi

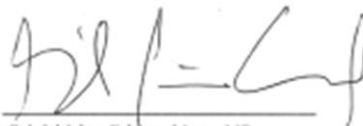
ASUNTO: Aprobación proyecto: *"Evaluación de la glicosilación tipo O-GlcNAc como un mecanismo citoprotector en un modelo experimental *in vitro* de acondicionamiento hipóxico"*.

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

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

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

Cordialmente,



Gabriel Jaime Echeverri Junca MD
Presidente -CIECUAE- Universidad Icesi