



**CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE UN MARCADOR DE  
ASTROGLIOSIS REACTIVA EN UN MODELO ANIMAL DE ISQUEMIA  
CEREBRAL EN RATAS EN TRATAMIENTO CON GLUCOSAMINA**

**LINA FERNANDA TORRES REVELO**

**UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
SANTIAGO DE CALI  
2015**



**CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE UN MARCADOR DE  
ASTROGLIOSIS REACTIVA EN UN MODELO ANIMAL DE ISQUEMIA  
CEREBRAL EN RATAS EN TRATAMIENTO CON GLUCOSAMINA**

**LINA FERNANDA TORRES REVELO**

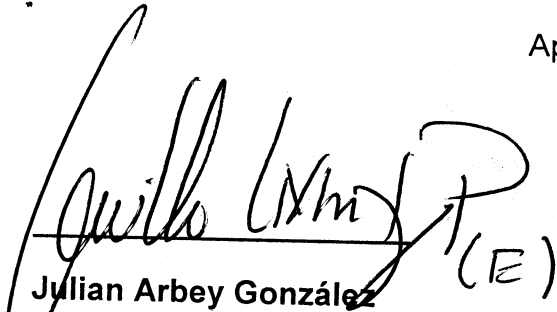
**PROYECTO DE GRADO**

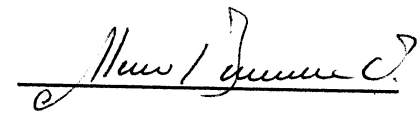
**TUTORA  
JULIANA RENGIFO  
DOCTORA EN FISIOLÓGÍA CELULAR Y MOLECULAR  
PROFESORA DE BIOLOGÍA CELULAR Y FISIOLÓGÍA ANIMAL**

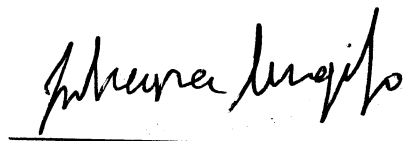
**COTUTORA  
LINA VANESSA BECERRA  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
PROFESORA DE BIOLOGÍA CELULAR Y NEUROANATOMIA**

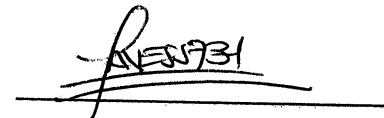
**UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
CALI, COLOMBIA  
2015**

Aprobado por:

  
Julian Arbey González (E)  
Evaluador

  
Álvaro Barrera  
Evaluador

  
Juliana Rengifo  
Director del Proyecto

  
Lina Becerra  
Co- Director del Proyecto

Santiago de Cali, 10 de septiembre de 2015.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Icesi por la formación tanto intelectual como académica que brinda y por permitirnos un espacio para la investigación y desarrollo de nuevas habilidades. Agradezco a la mejor de las tutoras, muchas gracias Doctora Juliana Rengifo por todo su apoyo, dedicación y paciencia. A mi cotutora Lina Becerra por su entrega y compromiso con este proyecto. Al doctor Alejandro Vera y Elisa Viveros por su apoyo incondicional y por compartir su conocimiento con tanto amor. Quiero agradecer a mi familia, en especial a mis padres y abuela por su todo su apoyo y a mis compañeros y amigos, que hicieron de esta etapa un recuerdo inolvidable. Mil gracias a todos.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. RESUMEN DEL PROYECTO .....</b>	<b>5</b>
<b>2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO .....</b>	<b>8</b>
2.1. Planteamiento y justificación del problema .....	8
2.2. Marco teórico y estado del arte.....	9
2.3. Objetivos .....	18
2.3.1. Objetivo general.....	18
2.3.2. Objetivos específicos .....	18
2.4. Metodología propuesta.....	19
2.5. Resultados.....	23
2.5.1. Corteza motora .....	23
2.5.2. Corteza sensitiva .....	26
2.6. Discusión .....	30
2.7. Conclusiones .....	33
2.8. Recomendaciones .....	34
<b>3. REFERENCIAS .....</b>	<b>35</b>
<b>4. ANEXOS .....</b>	<b>37</b>
<b>Anexo 1.</b> Carta de aprobación por parte del comité de ética .....	<b>37</b>
<b>Anexo 2.</b> Matriz de marco lógico.....	<b>38</b>
<b>Anexo 3.</b> Resultados obtenidos en el laboratorio de fisiología animal de la universidad Icesi.....	<b>39</b>
<b>Anexo 4.</b> Imágenes Representativas .....	<b>40</b>
<b>Anexo 5.</b> Análisis estadístico .....	<b>46</b>

## RESUMEN DEL PROYECTO

Se ha reportado que tras la ocurrencia de un episodio de isquemia cerebral, tardan pocas horas en activarse los astrocitos que logran sobrevivir al daño los cuales proliferan y se hipertrofian, ocasionando que se dé la formación de una barrera o cicatriz que aísla el área de la lesión, este proceso es conocido como astrogliosis reactiva (Montaner, 2007). Por otro lado se ha probado que la glucosamina ejerce un efecto neuroprotector en cerebros post-isquémicos de ratas. Debido a esto se planteó como objetivo general determinar el efecto del tratamiento con glucosamina sobre el fenómeno de astrogliosis reactiva en las células gliales de rata en condiciones isquémicas. Para ello se empleó un marcador molecular específico para este tipo de células conocido como proteína gliofibrilar ácida (GFAP).

El propósito del proyecto es evaluar el efecto que tiene la glucosamina intraperitoneal en la magnitud de la lesión isquémica mediante el proceso de astrogliosis reactiva en un modelo animal de infarto cerebral en ratas Wistar. Esto se realizó comparando el número de astrocitos reactivos en cerebro de rata en diferentes grupos experimentales. La técnica empleada para hacer posible aquella detección fue Inmunoistoquímica de fluorescencia.

Los resultados obtenidos fueron que: al realizar una comparación entre el grupo en condiciones de isquemia y su control se halló que, cuando hay isquemia el conteo de astrocitos es significativamente superior; que la glucosamina no ejerce efecto sobre el fenómeno de astrogliosis reactiva al evaluar su efectividad en tejidos sanos y que por el contrario es un prometedor tratamiento neuroprotector cuando es administrada tras la ocurrencia de un episodio de isquemia cerebral, ya que contribuye a la recuperación de las células en el área de penumbra que podrían morir sin tratamiento.

El análisis estadístico se realizó empleando ANOVA, a menos que no se cumpliera uno de los dos supuestos necesarios para realizar dicha prueba paramétrica (que los conteos de astrocitos tengan distribución normal y que haya homogeneidad de varianzas) procediéndose entonces a realizar Kruskal Wallis como prueba no paramétrica. En tal caso de que ambos supuestos si se cumplieran se realizó Tukey como prueba post ANOVA.

**Palabras clave:** astrogliosis reactiva, Proteína gliofibrilar ácida, isquemia cerebral, neuroprotección y glucosamina.

## ABSTRACT

It has been reported that after an episode of cerebral ischemia, the astrocytes that survive the damage, take a few hours to activate again. The ones that proliferate and get hypertrophy, form a barrier or scar that insulates, the injured region, this process is known as reactive astrogliosis (Montaner, 2007). On the other hand it has been proved that the glucosamine has a neuroprotective effect in rats post-ischemic brains. Therefore the general objective of this work is to determine the effect of the treatment with Glucosamine over the phenomenon of reactive astrogliosis in rat glial cells with ischemia conditions. For this we used a specific molecular marker for these type of cells known as acid glial fibrillary protein (GFAP).

The purpose of this project is to evaluate the effect that the intraperitoneal glucosamine has in the magnitude of the ischemia injury region, through the process of reactive astrogliosis in a model of brain attack in a Wistar rat. This was made comparing the numbers of reactive astrocytes in the rat brain of different experimental groups. The technique used to make it possible was the immunohistochemistry of fluorescence.

The results obtained were: when we made a comparison among the group of ischemic condition and its control, we found that when there is ischemia the numbers of astrocytes detected with GFAP is significantly superior. The glucosamine doesn't show any effect over the GFAP signal in healthy brains. We discovered it is a promising neuroprotective treatment when it is administered just before an ischemia episode, because it reduces the number of cells with reactive astrogliosis.

The statistical analysis was made using ANOVA unless one of the two assumptions needed to justify this test was not verified. In that case we used a Kruskal Wallis non-parametric test. For the parametric data Tukey test was performed as post ANOVA test.

**Key words:** Reactive astrogliosis, acid gliofibrilar protein, brain ischemia, neuroprotection and glucosamine.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los accidentes cerebrovasculares son la tercera causa más frecuente de muerte en Europa, América del norte y Sudamérica tras las cardiopatías y el cáncer. El 70% de los casos que no son mortales constituye la primera causa de discapacidad en esta población (Ortiz & Uribe, 2004), Donde cerca de un 85% de los infartos tienen origen isquémico. La isquemia cerebral focal es un tipo de accidente cerebrovascular (ACV), correspondiente a la disminución del flujo sanguíneo en una determinada región del cerebro, lo cual impide mantener el normal funcionamiento de las células cerebrales (Rang, Dale, Ritter, & Flower, 2012).

Se ha demostrado que la glucosamina reduce el tamaño de infarto en un modelo animal. Adicional a esto tiene toxicidad que va de escasa a nula lo cual es una ventaja considerable en caso de probar su efectividad como tratamiento neuroprotector (Hwang, Kim, Lee, & Han, 2010). El grupo de fisiología animal de la universidad ICESI se ha dedicado al estudio de la glucosamina como un tratamiento prometedor en caso de isquemia cerebral focal, obteniendo resultados que sustentan previas investigaciones. Sin embargo el mecanismo de acción de este tratamiento continúa en estudio para ser esclarecido a totalidad.

Los astrocitos son las células gliales más abundantes y constituyen el 25% del volumen cerebral (Guillamón & Gómez, 2012). Tras la ocurrencia de un episodio de isquemia cerebral, los astrocitos que logran sobrevivir al daño proliferan y se hipertrofian. Es decir que cuando hay daño ocurre sobreexpresión de estos y su morfología y procesos son más marcados.

La proteína ácida fibrilar glial (GFAP) pertenece a la familia de proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular, en particular de células gliales como los astrocitos y células de Schwann. Es considerado como un marcador sensible y fiable para la identificación inmunohistoquímica de la mayoría de astrocitos reactivos que están respondiendo a lesiones del SNC. Dicho marcador no es inmunohistoquímicamente detectable en igual magnitud en astrocitos del tejido sano o lejano al lugar de la lesión. Emplear esta proteína es ideal, debido a que permite realizar comparaciones entre un tejido sano y uno en condiciones de isquemia de una forma efectiva.



## 2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

### 2.1 Planteamiento y justificación del problema

Cerca del 85% de los accidentes cerebrovasculares tienen origen isquémico, en general por una trombosis de una arteria cerebral principal y el porcentaje restante corresponde a ictus hemorrágicos ocasionados por la rotura de una arteria cerebral. El único fármaco aprobado en la actualidad como tratamiento es el activador del plasminogeno tisular recombinante, que se administra por vía intravenosa y mediante la disgregación de los coágulos recupera el flujo sanguíneo. Para que este fármaco ejerza su acción de forma eficaz se requiere que sea administrado en las primeras 3 horas tras un episodio trombótico. Este fármaco debería emplearse exclusivamente para ictus que son de origen isquémico y no hemorrágico (Rang, Dale, Ritter, & Flower, 2012).

Adicional a la función que cumple el Alteplasa la cual es vital, sería ideal administrar fármacos neuroprotectores que intenten recuperar las células de la zona de penumbra de la lesión y que podrían morir sin tratamiento. No obstante hasta el momento ninguno de los numerosos fármacos neuroprotectores que han resultados eficaces en modelos animales resulta eficaz en igual magnitud en los ensayos clínicos. Es por esto que la realización de estudios que contribuyan a la identificación de nuevos agente terapéuticos con potencial neuroprotector se hace esencial. Encontrar un fármaco efectivo que cumpla esta función contribuiría a la disminución de la mortalidad y al mejoramiento de la calidad de vida de pacientes que hayan sufrido accidente cerebrovascular.

La hipótesis de esta investigación plantea que los procesos post-traduccionales de glicosilación de proteínas, podrían tener consecuencias en los mecanismos de sobrevida celular en condiciones de isquemia, enfocándose en el fenómeno de astrogliosis reactiva.

El presente proyecto tiene como finalidad evaluar el efecto que tiene la glucosamina intraperitoneal en el fenómeno de astrogliosis reactiva en un modelo animal de infarto cerebral en ratas Wistar. Para ellos se comparara el grado de expresión de la proteína gliofibrilar ácida en cerebro de rata sana y en condiciones de isquemia con el propósito de evaluar el efecto que tiene la glucosamina en el grado de magnitud de la lesión isquémica, usando como herramienta la técnica de inmunohistoquímica. Esto con el propósito de evaluar si dicho tratamiento incrementa la tolerancia al estrés mejorando de esta manera la supervivencia celular.

## **2.2 Marco teórico y estado del arte**

El cerebro es altamente dependiente del flujo sanguíneo debido a que es quien le suministra el oxígeno necesario para la realización de sus funciones. Cuando el tejido cerebral es privado de la irrigación sanguínea sufre necrosis isquémica o infarto (Arias & Aller, 2000). La isquemia focal tiene como causas principales la trombosis y la embolia, la frecuencia relativa de estos es aproximadamente 50% para accidentes cerebrovasculares (ACV) trombóticos, 30% embólicos, el 20% restante corresponde a ACV hemorrágicos (Purves, Augustine, Fitzpatrick, & Hall, 2008).

La isquemia no es homogénea en todo el territorio afectado, sino que establece la denominada lesión isquémica o del ictus. Aquí existe un núcleo central densamente isquémico, el cual evolucionara a infarto, y alrededor se generaran unas áreas de isquemia con menos intensidad, donde las células que aquí se localizan se encuentran estructuralmente intactas sin embargo están funcionalmente inactivas. Esta segunda zona es la denominada penumbra isquémica, la cual a su vez incluye dos áreas: las isquémicas que logran recuperarse espontáneamente y las que avanzan hacia cambios irreversibles a menos que se actué a tiempo proporcionando un tratamiento apropiado. La penumbra es la diana más relevante desde el punto de vista clínico (Montaner, 2007).

Tras la ocurrencia de un episodio de isquemia cerebral, tardan pocas horas en activarse los astrocitos que logran sobrevivir al daño los cuales proliferan y se hipertrofian. Esto genera que se dé la formación de una barrera o cicatriz que aísla el área de la lesión. Este proceso se conoce como astrogliosis reactiva (Montaner, 2007).

En el presente proyecto de investigación la isquemia será inducida en los sujetos experimentales (Ratas Wistar adultas) mediante la oclusión de la arteria cerebral media. La oclusión de esta arteria produce los siguientes signos y síntomas: hemiparesia y hemihipoestesia contralateral que afecta principalmente a la cara y el brazo; afasia, en el caso de que se afecte el hemisferio izquierdo. (Snell, 2010).

### **Células gliales**

Las células de la glía constituyen la mayor parte de las células del sistema nervioso; estas células se encargan principalmente de dar soporte a las neuronas e intervenir en el procesamiento cerebral de la información en el organismo. La glía se conserva a lo largo de la evolución y su porcentaje en el sistema nervioso (SN) está ligada al tamaño del animal: por ejemplo,

es del 65% en ratas y 90% en humanos, debido a que la proporción es alta en ambos se puede hacer una correlación entre estos para evaluar fenómenos que ocurren a nivel de las células gliales. Este tipo de células se clasifican según su función, morfología y localización en: microglía, astrocitos y células de shwann y oligodendrocitos. Los astrocitos son los más abundantes, constituyen el 25% del volumen cerebral (Guillamón & Gómez, 2012).

### **Morfología de los astrocitos**

Los astrocitos se han dividido en dos subtipos principales con base en diferencias en su morfología celular y localización anatómica: astrocitos fibrosos y astrocitos protoplasmáticos. Los astrocitos fibrosos predominan en la sustancia blanca, tienen un soma mediano de aproximadamente 15  $\mu\text{m}$ , del cual parten numerosas prolongaciones simétricas, extensas y delgadas que irradian del soma. Su núcleo es irregular y su membrana nuclear presenta invaginaciones profundas lo cual facilita su reconocimiento. Los astrocitos protoplasmáticos por su parte se localizan principalmente en la sustancia gris, presentan un soma mediano y procesos citoplasmáticos vigorosos más cortos e intrincados que los de los fibrosos. El núcleo es oval, con una membrana que posee pocas invaginaciones y su retículo endoplasmático rugoso es muy escaso (Escobar & Pimienta, 2008).

### **Funciones de los astrocitos:**

#### **1. Desarrollo del sistema nervioso**

Durante el desarrollo embrionario los axones en crecimiento son guiados hacia sus células blanco mediante moléculas guía derivadas de astrocitos, como es el caso de tenascina C y proteoglicanos. Los astrocitos también participan activamente en la sinaptogénesis, no solo durante el desarrollo sino también tras la lesión. Las trombospondinas (proteínas asociadas a la matriz extracelular) median el aumento del número de sinapsis. Estas son una familia de cinco proteínas homologas, de las cuales al menos cuatro son expresadas por los astrocitos durante el desarrollo y tras el daño cerebral. Adicional a lo ya nombrado, los astrocitos participan en la construcción de nuevos circuitos y en la reconstrucción de los mismos tras la lesión (Guillamón & Gómez, 2012).

## **2. Control de la función sináptica**

Los astrocitos liberan moléculas sinápticamente activas llamadas: gliotransmisores en respuesta a la actividad sináptica neuronal, que genera excitación de los astrocitos con oleadas de iones calcio, produciendo simultáneamente excitabilidad neuronal. Estudios han demostrado que estas células liberan los gliotransmisores mediante exocitosis lisosomal. Entre las sustancias liberadas por los astrocitos están: glutamato, D-serina, factores de crecimiento y citoquinas; estas dos últimas ejercen efectos más potentes y prolongados sobre la sinapsis. Los astrocitos también participan en la correcta actividad sináptica por medio de la regulación de la homeostasis del fluido intersticial sináptico. Manteniendo los niveles adecuados de pH, iones y neurotransmisores (Guillamón & Gómez, 2012).

## **3. Regulación del flujo sanguíneo**

Los astrocitos ejercen esta función gracias a que tienen dos dominios: un pie vascular y un pie neuronal. A esta íntima unión entre neuronas, astrocitos y vasos sanguíneos se le conoce como unión neurovascular. Los astrocitos producen y liberan diversos mediadores moleculares, como: prostaglandinas óxido nítrico y el ácido araquidónico, que pueden aumentar o disminuir el diámetro del vaso sanguíneo y el flujo de sangre en una de manera coordinada (Sofroniew & Vinters, 2009).

## **4. Energía y metabolismo del Sistema nervioso central**

Los astrocitos capturan la glucosa de la circulación y otorgan a las neuronas metabolitos energéticos. Constituyen la reserva principal de gránulos de glucógeno en el SNC y dichos gránulos abundan en zonas de alta densidad sináptica (Guillamón & Gómez, 2012).

## **5. Metabolismo lipídico y secreción de lipoproteínas**

El colesterol y las lipoproteínas en SNC son sintetizados por células gliales principalmente por astrocitos. Alteraciones en el metabolismo de los lípidos, especialmente del colesterol, se encuentran directamente relacionadas con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Guillamón & Gómez, 2012).

## **Citoesqueleto y caracterización molecular, proteína ácida fibrilar glial y otros marcadores astrocitarios**

El citoesqueleto es una estructura adaptativa y dinámica que otorga a la célula una forma y organización definida, cierto grado de resistencia mecánica y dependiendo de la necesidades de la célula puede ensamblarse y desensamblarse. El citoesqueleto está compuesto por: microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermedios.

La proteína ácida fibrilar glial (GFAP) pertenece a la familia de proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular, en particular de células gliales como los astrocitos y células de Schwann. Los filamentos intermedios cumplen diversas funciones: dar soporte a diversos componentes de la célula, modificación de la forma de la célula, o bien como elementos clave en la organización de la matriz citoplasmática. Los filamentos intermedios son los componentes más estables del citoesqueleto, estos se ensamblan formando dímeros helicoidales (Jiménez & Merchant, 2003).

GFAP es considerado como un marcador sensible y fiable para la identificación inmunohistoquímica de la mayoría de astrocitos reactivos que están respondiendo a lesiones del SNC, no es inmunohistoquímicamente detectable en igual magnitud en astrocitos del tejido sano o lejano al lugar de la lesión. El uso de GFAP como marcador está limitado por factores como: La GFAP no está presente en todo el citoesqueleto, únicamente en las principales ramificaciones; por tanto, la estimación del nivel de ramificación y del tamaño de los astrocitos mediante inmunohistoquímica de GFAP es limitada. Su expresión no es exclusiva de astrocitos fibrosos y protoplasmáticos; dentro de SNC también es expresada por la glía de Müller en retina, glía de Bergman en cerebelo, entre otros (Sofroniew & Vinters, 2009)

Otros marcadores moleculares que se han utilizado durante identificación inmunohistoquímica de astrocitos y astrocitos reactivos incluyen: ApoE, ApoJ, MFGE8 y S100b (Sofroniew & Vinters, 2009). ApoE, ApoJ, MFGE8 participan en la secreción de partículas lipoproteicas por los astrocitos y que actúan probablemente como opsoninas (moléculas que mejoran la fagocitosis mediante el marcado de un antígeno para una respuesta inmune) que facilitan la fagocitosis. Por otro lado S100b es un miembro de la familia de proteínas S100 las cuales son una fracción heterogénea de proteínas gigantes de calcio, S100b en particular se localiza en las células gliales (León, 2012).

### **Astroglisis reactiva y cicatriz glial**

Los cambios que llegan a experimentar los astrocitos reactivos varían dependiendo de la severidad de la lesión. Es por tanto que no se puede definir la astroglisis reactiva como un fenómeno “Todo o nada”. Esta se puede clasificar dependiendo del grado de severidad en: astroglisis reactiva leve o moderada, astroglisis reactiva severa difusa y astroglisis reactiva severa con formación de cicatriz glial compacta (Sofroniew & Vinters, 2009).

- **Astrogliosis reactiva leve o moderada:** ocurre hipertrofia tanto del cuerpo celular como de los procesos astrocitarios y se evidencia un aumento en la expresión de GFAP. Lo cual se produce dentro del dominio propio del astrocito, lo que significa que no ocurre solapamiento con astrocitos vecinos y la proliferación es de escasa a nula. A este nivel de severidad la astrogliosis reactiva es reversible y se aprecia en traumatismos leves.
- **Astrogliosis reactiva severa difusa:** se genera cuando ocurren lesiones focales graves o infecciones con neurodegeneración crónica. Se evidencia sobreexpresión de GFAP y la hipertrofia del cuerpo celular y procesos son más pronunciados. Ocurre solapamiento de astrocitos e incremento en la proliferación.
- **Astrogliosis reactiva severa con formación de cicatriz glial compacta:** adicional a los cambios ya mencionados se forma la cicatriz glial, la cual impide que se de regeneración axonal y migración celular. Sin embargo protege frente a la llegada de células inflamatorias y agentes infecciosos. Este nivel de severidad es desencadenado por lesiones graves de SNC, infecciones invasivas y abscesos, infecciones sistémicas y neurodegeneración crónica.

La cicatriz glial que como ya se mencionó consiste principalmente en la acumulación de astrocitos reactivos en el área de la lesión, supone reorganización tisular y cambios estructurales, los cuales se mantienen incluso después de la desaparición del agente que ocasiono el daño (Montaner, 2007).

La astrogliosis reactiva es un fenómeno del sistema nervioso central, el cual es común a varios procesos neuropatológicos donde se destacan: isquemia, Alzheimer o esclerosis múltiple. Este proceso es caracterizado ampliamente por la sobreexpresión de la proteína gliofibrilar ácida.

### **Astrogliosis reactiva en modelos animales**

En las diversas lesiones que puede sufrir el sistema nervioso central, se ha evidenciado un patrón fuertemente marcado de la respuesta astrocítica, asegurándose que esta es función tanto del tiempo como de la distancia a la que estos se encuentren del centro de la lesión. Tras la lesión es posible identificar grandes cambios a nivel morfológico (Brosnan, 2013).

En un estudio de lesión a la medula espinal de ratón se evidencio ampliamente que tras la ocurrencia del daño los astrocitos proliferaron con procesos superpuestos alargados que se formaron en el borde de la lesión, con el propósito de prevenir que se dé la propagación de las células inflamatorias y contribuyendo a que se dé la pérdida neuronal del tejido adyacente que no fue afectado (Brosnan, 2013).

## **Implicaciones de los astrocitos en patologías del sistema nervioso central**

A pesar de que los astrocitos reactivos inhiben que se dé la regeneración axonal, no se pueden catalogar exclusivamente como perjudiciales, ellos son la reacción a una lesión a nivel de SNC, que a su vez proporciona ciertos beneficios, como lo son: captación de glutamato potencialmente excitotóxico, neuroprotección mediante la liberación de adenosina, liberando glutatión para contrarrestar el estrés oxidativo (Sofroniew & Vinters, 2009).

Adicionalmente, los astrocitos reactivos producen metaloproteasas de matriz extracelular y sus inhibidores, que participan en la remodelación de los componentes de la matriz extracelular e influyen en la arquitectura de la cicatriz glial después de la lesión, cicatriz que limita la difusión de células inflamatorias y agentes infecciosos. En presencia de daño neuronal asociado a alteraciones en la barrera hematoencefálica, los astrocitos reactivos promueven la reparación de la misma por medio de la producción de componentes de la matriz extracelular (Pérez, 2006).

## **Resistencia metabólica de las células gliales frente a la isquemia**

Se ha demostrado que las neuronas aisladas en cultivo presentan una elevada sensibilidad a la hipoxia, ocurriendo rápidamente su muerte ante una privación brusca de oxígeno. Mientras que los astrocitos en cultivo son muy resistentes a la hipoxia y a la privación aislada de glucosa. Por lo cual para poder apreciar su muerte deben ser privados simultáneamente de estos dos sustratos energéticos. Estudios in vitro muestran que la mortalidad de una población de células gliales ocurre mucho más tardíamente que la neuronal. Esto se debe a que las células gliales presentan una mayor resistencia metabólica, debido a su capacidad de mantener en el tiempo un metabolismo anaerobio y de que con sus antitransportadores  $H^+$  /  $Na^+$  puede amortiguar la acidosis metabólica resultante.

No obstante el hecho de que los astrocitos sean más resistentes que las neuronas, no implica que no sufran daño. Cuando ocurre isquemia cerebral la interacción entre neuronas y células gliales se ve perjudicada y teniendo en cuenta el importante papel que cumplen las células gliales, los procedimientos terapéuticos dirigidos exclusivamente a preservar la funcionalidad neuronal podrían resultar incompletos. Así una terapéutica racional frente a la isquemia debería incluir fármacos protectores contra la excitotoxicidad del glutamato como fármacos correctores del edema glial (Pascual, Gonzales, Carceller, & Roda, 2000).

## **Corteza cerebral**

La corteza cerebral es el nivel más alto de organización del sistema nervioso central y siempre funciona en relación con los centros más inferiores. Recibe una gran cantidad de información y responde de una forma precisa, produciendo los cambios más apropiados. Esta recubre por completo ambos hemisferios y esta subdividida en seis capas o laminas, que organizadas de la más exterior a la más interior son: capa plexiforme; capa granulosa externa; capa piramidal externa; capa granulosa interna; capa piramidal interna, también conocida como ganglionar y capa multiforme. En el presente proyecto se hará énfasis en las láminas IV y V para la toma de fotografías; la lámina IV característica de las cortezas sensoriales y la V destacada principalmente en las cortezas motoras (Gabriel Arteaga D., 2004). El área tanto motora como sensitiva están coordinadas, en tal forma que para región motora corresponde una sensitiva (Gutierrez, 2004).

La corteza cerebral debe ser considerada como la estación final implicada en una línea de estaciones que reciben información de los ojos, oídos y de los órganos de la sensibilidad general. En términos generales la función de la corteza consiste en discriminar y relacionar la información recibida con los recuerdos del pasado, donde la información será almacenada, desechada o traducida en una acción. En todo este proceso, hay una interrelación entre la corteza y los núcleos de la base, mantenida por múltiples conexiones nerviosas corticales y subcorticales (Snell, 2010).

Las lesiones de la corteza motora primaria en un hemisferio ocasionan parálisis de las extremidades contralaterales, resultando principalmente afectados los movimientos más finos y especializados. La destrucción del área motora primaria, produce una parálisis más grave que si la destrucción ocurre en el área motora secundaria.

Por otro lado se tiene la corteza sensitiva. Los centros inferiores de encéfalo, especialmente el tálamo actúan como una estación de relevo de un gran número de señales sensitivas hacia la corteza para su análisis. La corteza es necesaria para apreciar el reconocimiento espacial, el reconocimiento de la intensidad relativa y el reconocimiento de similitudes y diferencias. Las lesiones en esta área ocasionan trastornos sensitivos contralaterales que son de mayor intensidad en las partes distales de las extremidades. Se afectan los estímulos dolorosos, táctiles y térmicos, es decir que el paciente es incapaz de juzgar los grados de calor y dolor; no obstante se cree que esto se debe principalmente al funcionamiento del tálamo. Otro síntoma de las lesiones de la corteza sensitiva es la pérdida del tono muscular (Snell, 2010).



## Glucosamina y glicosilación

La glucosamina (2-amino-2-deoxi-D-glucosa; GlcN) es un amino azúcar, sintetizado a partir de la glucosa. Es el producto principal de la ruta biosintética de las hexosaminas. La d-glucosamina se encuentra en muchos polisacáridos de los tejidos de los vertebrados y es también componente principal de la quitina, polisacárido estructural presente en el exoesqueleto de los insectos y de los crustáceos (Lehninger, 1982).

La glucosamina ha demostrado mejoras en el funcionamiento global de pacientes con demencia mixta (Arango, Fernández & Ardila, 2003).

Estudios muestran que al bloquearse la vía biosintética de las hexosaminas, disminuye la sobrevivencia de las células. Por lo que confirma que la glucosamina producto principal de esta vía puede estar implicada en la recuperación funcional (Zachara, O'Donnell, Cheung, Mercer, Marth, & Hart, 2004).

La transferencia de un grupo N- acetilglucosamina con enlace de tipo O-GlcNAc a proteínas es un tipo de modificación post-traducciona similar a la fosforilación, dicha transferencia que puede ser inducible regula la función de canales iónicos, enzimas, factores de transcripción y proteínas asociadas al citoesqueleto. Dicha transferencia ocurre cuando una enzima enzima O-GlcNAc – transferasa transfiere una  $\beta$ -N- acetilglucosamina del UDP-N-acetilglucosamina a las cadenas laterales justo en el grupo hidroxilo de los aminoácidos de treonina o serina que se encuentran presentes en una proteína. Se ha probado que el tratamiento con glucosamina en modelos de estrés miocárdico agudo genera cardioprotección (Laczy, y otros, 2008).

Hipótesis sugieren que las modificaciones post-traduccionales de proteínas de tipo O-GlcNAc poseerían un efecto anti- apoptótico, ya sea favoreciendo el aumento de las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, las cuales son una familia de proteínas transmembranales que participan en la regulación de las cascadas de muerte celular intrínseca, o por medio de la atenuación de la sobre carga de calcio que viene junto con una lesión hipoxico/isquémica con reperfusión (Chatham, 2010). Por otra parte la glucosamina tiene una toxicidad que va de escasa a nula lo cual es una ventaja considerable en caso de probar su efectividad como tratamiento neuroprotector (Hwang, Kim, Lee, & Han, 2010).

Se cuenta con evidencia científica de que la glucosamina es completamente biodisponible tras la administración por vía intraperitoneal y que su eliminación es rápida, tras seis horas de su administración la concentración es casi indetectable. Esto fue probado en un estudio donde se administró una dosis única de 350 mg.kg<sup>-1</sup> de clorhidrato de glucosamina a ratas de

forma tanto oral, como intraperitoneal e intravenosa. Obteniéndose por vía oral una menor biodisponibilidad lo cual es debido a que sufre metabolismo de primer paso. Estudios farmacocinéticos de la glucosamina en voluntarios sanos, solo se han realizado para este fármaco vía oral. No se cuenta con información disponible acerca de la biodisponibilidad, metabolismo y eliminación de este fármaco por vía intraperitoneal en humanos (Aghazadeh & Pasutto, 2002).

## **2.3 Objetivos**

### **2.3.1 Objetivo general**

Determinar el efecto del tratamiento con glucosamina (glicosilación de proteínas tipo O-GlcNAc) sobre el fenómeno de astrogliosis reactiva en las células gliales de rata en condiciones isquémicas.

### **2.3.2 Objetivos específicos**

1. Implementar el marcaje de células gliales de los cortes obtenidos de los diferentes grupos de ratas (Con y sin isquemia) con inmunohistoquímica empleando en anticuerpo GFAP (proteína gliofibrilar ácida).
2. Identificar y comparar el fenómeno de astrogliosis reactiva en las células gliales de rata de un tejido sano con un tejido en condiciones de isquemia.
3. Determinar el efecto que tiene la glucosamina sobre el fenómeno de astrogliosis reactiva en muestras de tejido cerebral en condiciones de isquemia.

## 2.4 Metodología propuesta

Con el objetivo de evaluar el efecto que tiene la glucosamina intraperitoneal y la magnitud de la lesión isquémica en el proceso de astrogliosis reactiva en un modelo animal de infarto cerebral, se toma los siguientes sujetos experimentales y se plantea el siguiente diseño experimental:

### Sujetos experimentales y cirugía

Se emplearan ratas Wistar adultas, cuya edad oscile entre 120 a 180 días, las cuales serán machos, cuyo peso se debe encontrar en un rango de 240 a 320 gramos. A las ratas se les realizo la cirugía MCAO (Oclusión de la arteria cerebral media).

### Diseño experimental

Se trabajara a partir de cortes de cerebro de ratas previamente tratadas y clasificadas en 4 grupos como se explicara a continuación: hay dos grupos control denominados F y E a los cuales se les anestesia y hace la disección pero no se les genera la isquemia, y los grupos B y D a los cuales si les es generada isquemia. A los grupos B y D les es bloqueada la arteria cerebral media por un periodo de tiempo de 90 minutos y posteriormente las ratas son sacrificadas a las 6 horas. A continuación se muestra dicha clasificación:

**Tabla 1.** Clasificación de los grupos experimentales

Isquemia	-		+	
Glucosamina	-	+	-	+
Grupo	F	E	B	D

El tratamiento con glucosamina fue suministrado a los sujetos experimentales del grupo E (control) y a los pertenecientes al grupo D (con isquemia). La aplicación de la glucosamina se realizó una hora antes de inducida la isquemia con una dosis única de 200mg/Kg.

La metodología empleada para el análisis de las muestras fue inmunohistoquímica de fluorescencia. Para ello primero fue necesario obtener los cortes de cerebro que serían posteriormente tratados.

### **Procedimiento para el seccionamiento del tejido y uso del vibrátomo**

Para la obtención de los cortes de tejido cerebral, se empleó el vibrátomo Leica 1000 B, el cual permite obtener cortes de 50 micras en las muestras de cerebro de rata Wistar de los grupos experimentales ya seleccionados, los cuales fueron previamente almacenados en solución anticongelante.

Los cortes de tejido cerebral fueron realizados siguiendo el procedimiento operativo estándar (POE) para el uso del vibrátomo en muestra de cerebro de rata, elaborada en el laboratorio de fisiología animal de la Universidad Icesi.

Posteriormente a la realización de estos cortes, se preservaron en una solución anticongelante de: etilenglicol 30%, Sacarosa 30% y el volumen restante de PBS (Frohman, 2010).

### **Inmunohistoquímica de fluorescencia**

El primer paso a realizar fue lavar los tejidos con el propósito de eliminar los excesos de solución anticongelante. Se realizaron tres lavados cada uno de diez minutos, en Buffer Fosfato Salino (PBS). A continuación se lavaron en PBS-Twin una vez durante 30 minutos con el propósito de permeabilizar la membrana. Posteriormente se realizó de nuevo tres lavados con PBS pero esta vez con una duración de cinco minutos cada uno. La adhesión a antígenos inespecíficos se bloqueó con albumina en PBS, este paso tuvo una duración de 60 minutos. Después los tejidos se incuban con los anticuerpos primarios durante toda la noche a una temperatura de 4°C, los cuales están diluidos en PBS con Tritón al 0,5%.

A dichos tejidos se les realizó tres lavados que tuvieron una duración de cinco minutos cada uno. Las placas con el tejido fueron expuestas al anticuerpo secundario por 40 minutos y lavados con solución de PBS tres veces también durante cinco minutos.

Cada tejido se monta en un portaobjetos (previamente rotulado) con la ayuda de un pincel y se agrega una gota de glicerina, para evitar burbujas. A continuación se procede a colocar delicadamente un cubreobjetos sobre la muestra teniendo cuidado de no mover el tejido, ni dañarlo. Finalmente se coloca esmalte transparente en todo el borde del cubreobjetos para mantener este fijo durante todo el proceso de manipulación y uso de la placa.

**Tabla 2.** Anticuerpo primario

<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Generado en</b>	<b>Concentración</b>
Anti GfAPGA5	Ratón	Dilución 1:500

**Tabla 3.** Anticuerpo secundario.

<b>Anticuerpo secundario</b>	Alexafluor 555
<b>Reacciona con</b>	Anti mouse
<b>Absorbancia</b>	553 nm
<b>Emisión</b>	568 nm
<b>Concentración</b>	5 $\mu/mL$
<b>Color</b>	Rojo

### **Toma de fotografías**

Las imágenes de Fluorescencia fueron tomadas en un microscopio Nikon Eclipse 55i bajo una longitud de 568 nm para GFAP, evaluando cantidad de astrocitos reactivos en los diferentes tejidos provenientes de los grupos previamente mencionados con los objetivos 10X y 40X.

### **Tratamiento fotográfico**

Las imágenes provenientes de las diferentes cortezas cerebrales (sensitiva y motora) se modificaron con la entrada de luz y el tiempo de exposición del microscopio a través del programa Nis-elements F 3,2 con el objetivo de mejorar su resolución. Finalmente las imágenes fueron tratadas mediante power point realizando superposiciones para crear una imagen panorámica.

### **Manejo de resultados**

Se realizó un conteo manual de astrocitos reactivos (células gliales), a cada una de las fotografías tomadas tanto en las láminas supra granular como infra granular y en la sustancia blanca, tanto de las cortezas sensitivas como motoras. Dicho conteo fue rectificado por la Maestra en Ciencias biomédicas Lina Vanesa Becerra.

### **Tratamiento estadístico**

La prueba de elección fue ANOVA. Esto se hará para las diferentes regiones del cerebro: Infragranular, supra granular y sustancia blanca, tanto de la corteza motora como de la sensitiva. No obstante para poder aplicar dicha prueba a los resultados obtenidos, se deben cumplir dos supuestos:

**Supuesto 1: Homogeneidad de varianzas**

Se plantea, **Ho:** Las varianzas son iguales; **Ha:** Las varianzas no son iguales

**Supuesto 2: Datos con distribución normal**

**Ho:** Los datos tienen distribución normal; **Ha:** Los datos no tienen distribución normal.

**Se rechaza Ho si:** Valor  $p < 0,05$

En tal caso de que cumpliera ambos supuestos se procedió a realizar ANOVA seguido de la Prueba de Tukey. El ANOVA sirve para comparar varios grupos en cuanto a una variable cuantitativa y establecer si alguno de los grupos es diferente del resto. La prueba de Tukey por su parte realiza comparaciones entre todos los grupos estableciendo cual o cuales son diferentes de los demás (Girden, 1992).

Por otro lado, si no se cumple uno de los supuestos o ambos, se realizó Kruskal-Wallis. Kruskal-Wallis es una prueba no paramétrica, es decir que no asume normalidad en los datos.

Hipótesis a probar:

**Ho:** La mediana de los conteos de astrocitos con o sin tratamientos o con o sin isquemia son iguales

**Ha:** La mediana de los conteos de astrocitos con o sin tratamientos o con o sin isquemia no son iguales.

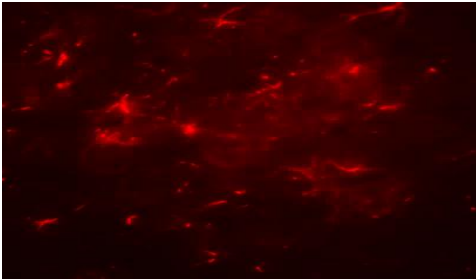
**Se rechaza Ho si:**  $H > X_1^2$  donde  $X_1^2(0,05, 1) = 3,8415$ .

## 2.5 Resultados

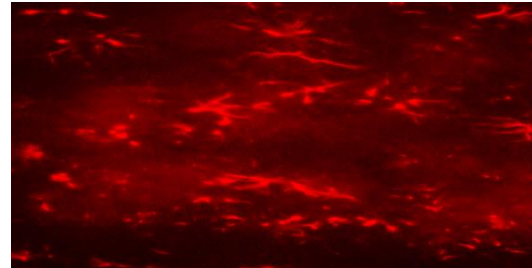
Se tomaron (empleando objetivo de 40X) y evaluaron un total de 216 fotografías pertenecientes a 12 individuos de los grupos B (isquémico, sin tratamiento con glucosamina), D (isquémico, con tratamiento), E (sin isquemia, con tratamiento) y F (sin isquemia, sin tratamiento) para las cortezas motora y sensitiva. Los sujetos tuvieron una sobrevida de seis horas a partir de la cirugía. En los gráficos presentados a continuación se muestra las medias de los conteos de astrocitos para cada uno de los grupos en las distintas regiones del cerebro (infra granular, supra granular y sustancia blanca) para las cortezas tanto motora como sensitiva y los asteriscos indican si hay diferencias significativas entre los grupos.

### 2.5.1 Corteza motora

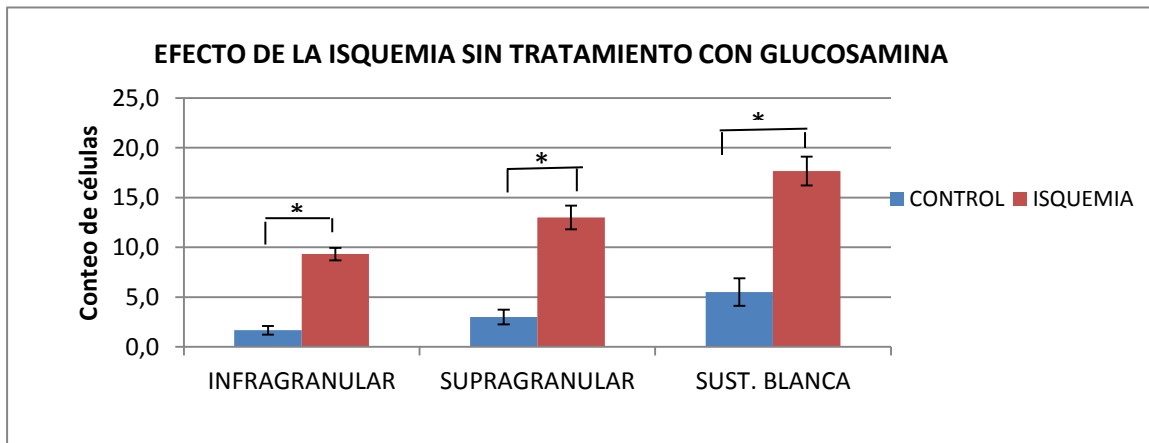
- Efecto de la isquemia cuando no hay tratamiento con glucosamina



**Figura 1.** Astrocitos pertenecientes al grupo F (control). Fotografía tomada en la sustancia blanca



**Figura 2.** Astrocitos pertenecientes al grupo B (con isquemia). Fotografía tomada en la sustancia blanca.

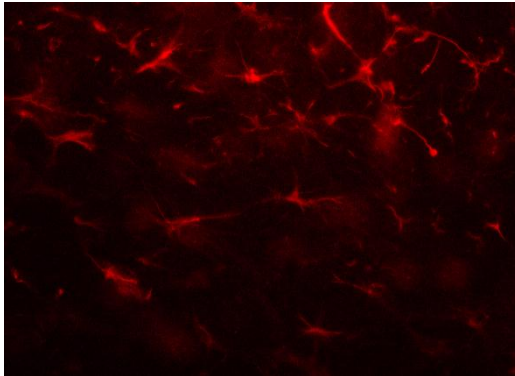


**Grafico 1.** Número de astrocitos detectados con el anticuerpo GFAP por medio de inmunohistoquímica de fluorescencia por zonas de la corteza cerebral de ratas Wistar a las que se les ha inducido una isquemia por medio de la cirugía experimental MCAO (Middle cerebral artery occlusion). Comparación del grupo sin isquemia y con isquemia (media  $\pm$ EEM, n=9, \*,  $p < 0.05$  para la región infra granular empleando prueba de Kruskal Wallis y  $p < 0.05$  para la región supra granular y sustancia blanca empleando prueba Tukey).

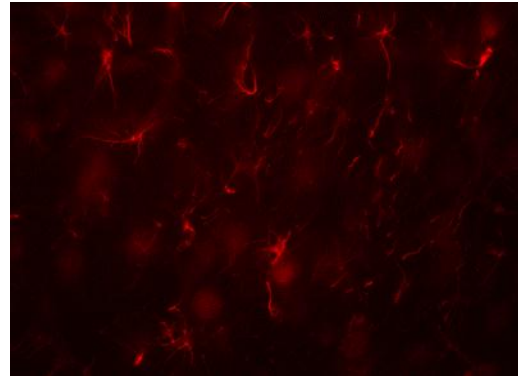


De acuerdo con la prueba de kruskal wallis para la región infra granular y con la prueba de Tukey para las regiones supra granular y sustancia blanca, se estableció que existen diferencias significativas con un nivel de confianza de 95% en los conteos de astrocitos para el grupo F (control) y el grupo B (con isquemia), siendo superior el conteo para el grupo el grupo isquémico (ver anexo 4).

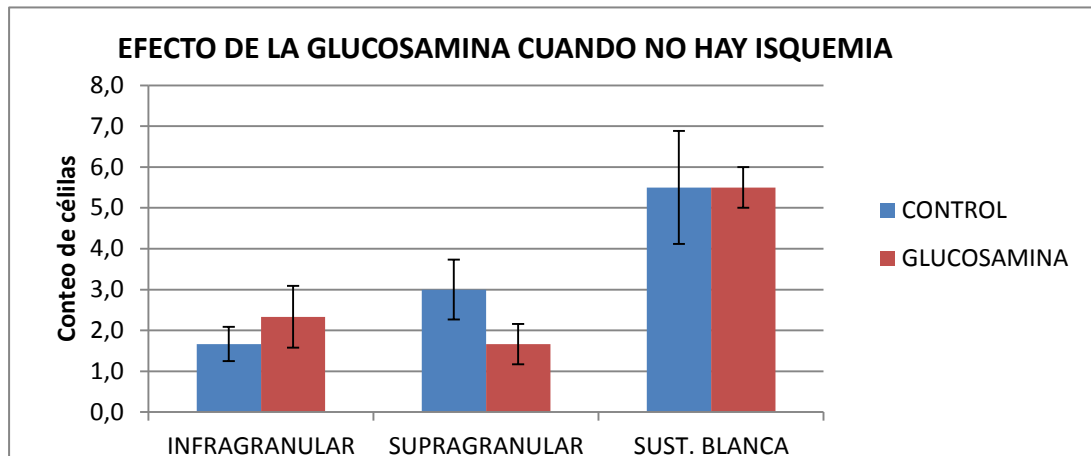
- **Efecto de la glucosamina cuando no hay isquemia**



**Figura 3.** Astrocitos pertenecientes al grupo F (sin glucosamina). Fotografía tomada en la sustancia blanca.



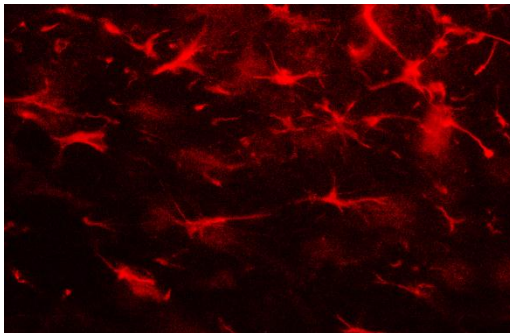
**Figura 4.** Astrocitos pertenecientes al grupo E (con glucosamina). Fotografía tomada en la sustancia blanca.



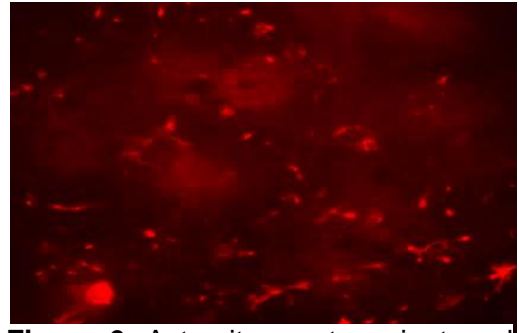
**Grafico 2.** Número de astrocitos detectados con el anticuerpo GFAP por medio de inmunohistoquímica de fluorescencia por zonas de la corteza cerebral de ratas Wistar a las que se les ha inducido una isquemia por medio de la cirugía experimental MCAO (Middle cerebral artery occlusion). Comparación de los controles, uno con tratamiento y el otro sin tratamiento (media  $\pm$ EEM, n=9).

De acuerdo con la prueba de Kruskal Wallis para la región infra granular y con la prueba de Tukey para la región supra granular y sustancia blanca se establece con un nivel de confianza de 95% que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los conteos de astrocitos de los grupos E y F, los cuales carecen de isquemia.

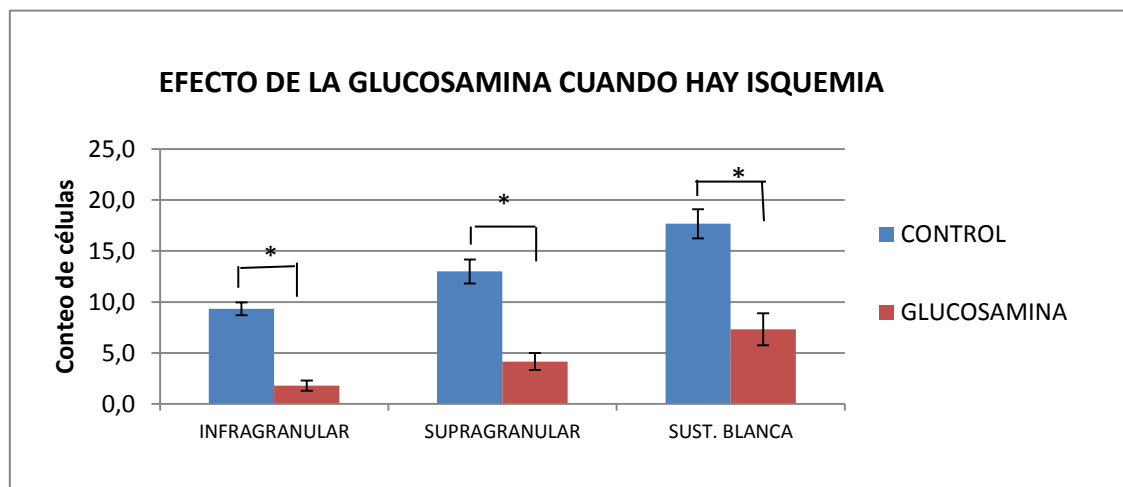
- **Efecto de la glucosamina cuando hay isquemia**



**Figura 5.** Astrocitos pertenecientes al grupo B (control). Fotografía tomada en la sustancia blanca



**Figura 6.** Astrocitos pertenecientes al grupo D (con glucosamina). Fotografía tomada en la sustancia blanca

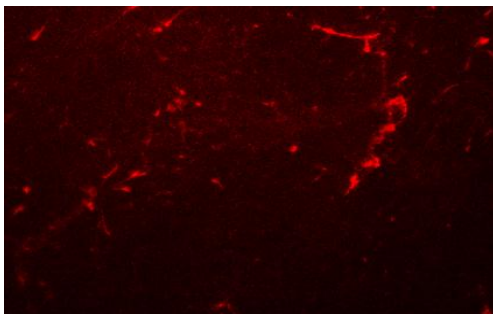


**Grafico 3.** Número de astrocitos detectados con el anticuerpo GFAP por medio de inmunohistoquímica de fluorescencia por zonas de la corteza cerebral de ratas Wistar a las que se les ha inducido una isquemia por medio de la cirugía experimental MCAO (Middle cerebral artery occlusion). Comparación del grupo sin tratamiento con glucosamina y con tratamiento. (Media ±EEM, n=9, \*,  $p < 0.05$  para la región infra granular empleando prueba de Kruskal Wallis y  $p < 0.05$  para la región supra granular y sustancia blanca empleando prueba Tukey).

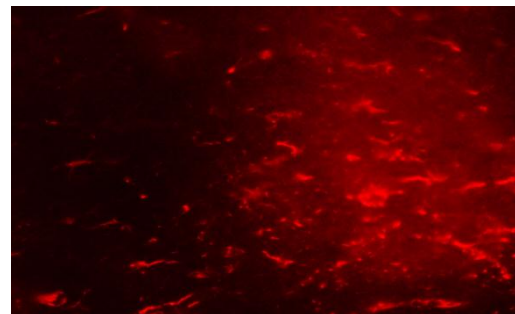
De acuerdo con la prueba de Tukey se puede afirmar con un nivel de confianza del 95% que el grupo experimental D (isquemia con tratamiento con glucosamina) no presentó diferencias significativas en cuanto a los conteos de astrocitos con respecto a los controles (grupos E y F), mientras que estos 3 grupos si son estadísticamente diferentes al grupo B el cual no recibió tratamiento.

### 2.5.2 Corteza sensitiva

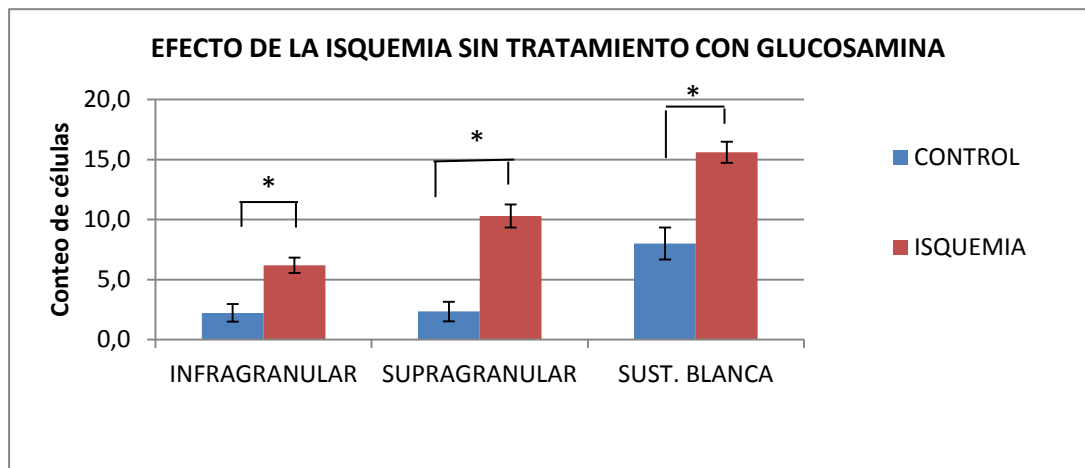
- Efecto de la isquemia sin tratamiento con glucosamina



**Figura 7.** Astrocitos pertenecientes al grupo F (control). Fotografía tomada en la sustancia blanca.



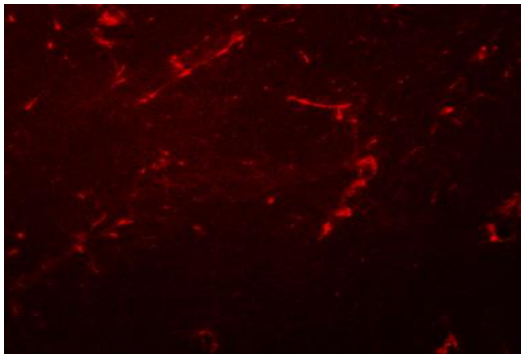
**Figura 8.** Astrocitos pertenecientes al grupo B (con isquemia). Fotografía tomada en la sustancia blanca.



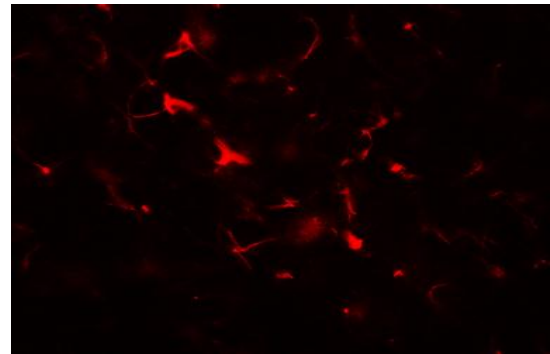
**Grafico 4.** Número de astrocitos detectados con el anticuerpo GFAP por medio de inmunohistoquímica de fluorescencia por zonas de la corteza cerebral de ratas Wistar a las que se les ha inducido una isquemia por medio de la cirugía experimental MCAO (Middle cerebral artery occlusion). Comparación del grupo sin isquemia y con isquemia (media  $\pm$ EEM, n=9, \*,  $p < 0.05$  para la región infra granular empleando prueba de Kruskal Wallis y  $p < 0.05$  para la región supra granular y sustancia blanca empleando prueba Tukey).

De acuerdo con la prueba de kruskal wallis para la región infra granular y con la prueba de Tukey para las regiones supra granular y sustancia blanca, se estableció que existen diferencias significativas con un nivel de confianza de 95% en los conteos de astrocitos para el grupo F (control) y el grupo B (con isquemia), siendo superior el conteo para el grupo el grupo isquémico (ver anexo 4).

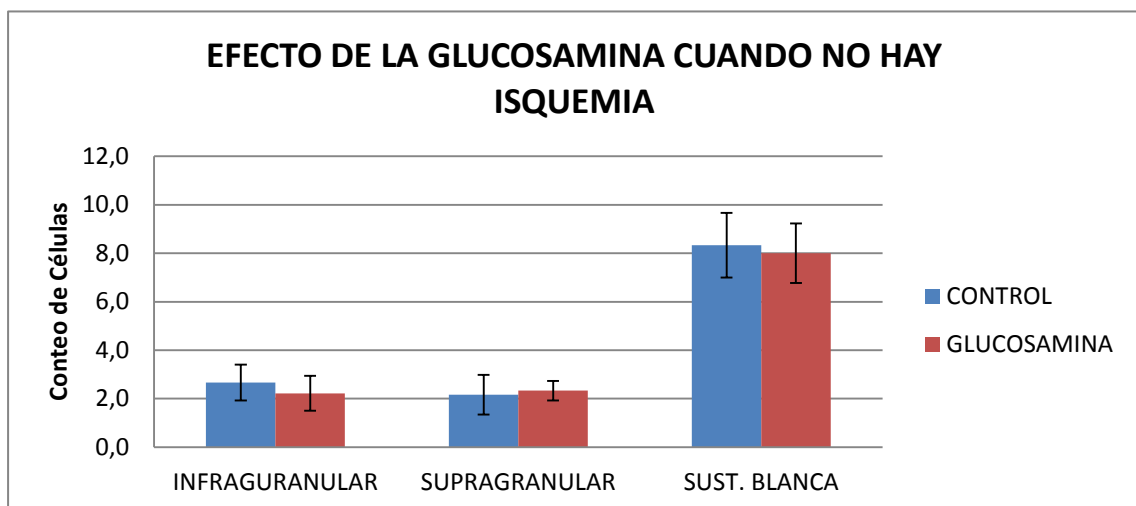
- **Efecto de la glucosamina cuando no hay isquemia**



**Figura 9.** Astrocitos pertenecientes al grupo F (sin glucosamina). Fotografía tomada en la sustancia blanca



**Figura 10.** Astrocitos pertenecientes al grupo E (con glucosamina). Fotografía tomada en la sustancia blanca.

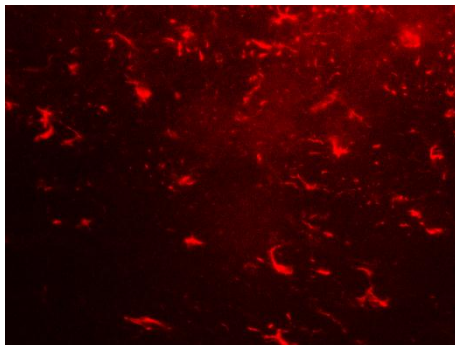


**Grafico 5.** Número de astrocitos detectados con el anticuerpo GFAP por medio de inmunohistoquímica de fluorescencia por zonas de la corteza cerebral de ratas Wistar a las que se les ha inducido una isquemia por medio de la cirugía experimental MCAO (Middle cerebral artery occlusion).

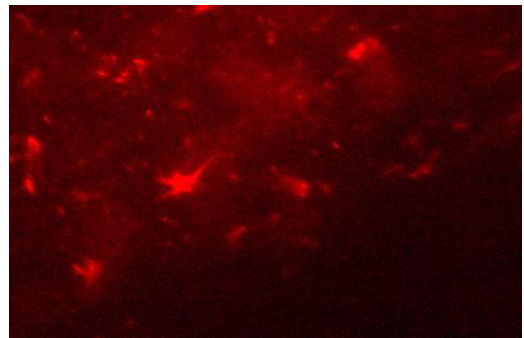
Comparación de los controles, uno con tratamiento y el otro sin tratamiento (media  $\pm$ EEM, n=9).

De acuerdo con la prueba de Kruskal Wallis para la región infra granular y con la prueba de Tukey para la región supra granular y sustancia blanca se establece con un nivel de confianza de 95% que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los conteos de astrocitos de los grupos E y F, los cuales carecen de isquemia.

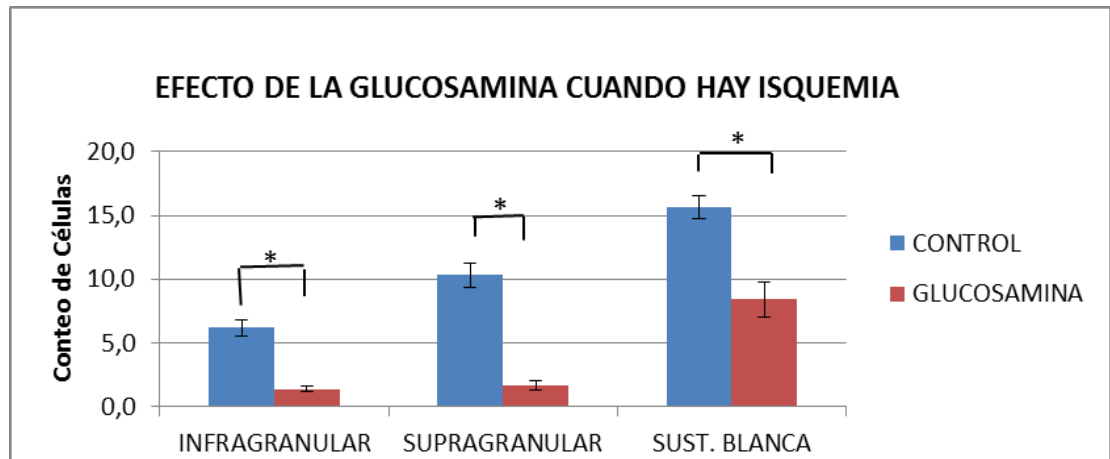
- **Efecto de la glucosamina cuando hay isquemia**



**Figura 11.** Astrocitos pertenecientes al grupo B (control). Fotografía tomada en la sustancia blanca



**Figura 12.** Astrocitos pertenecientes al grupo D (con glucosamina). Fotografía tomada en la sustancia blanca



**Grafico 6.** Número de astrocitos detectados con el anticuerpo GFAP por medio de inmunohistoquímica de fluorescencia por zonas de la corteza cerebral de ratas Wistar a las que se les ha inducido una isquemia por medio de la cirugía experimental MCAO (Middle cerebral artery occlusion). Comparación del grupo sin tratamiento con glucosamina y con tratamiento (media  $\pm$ EEM, n=9, \*,  $p < 0.05$  para la región infra granular empleando

prueba de Kruskal Wallis y  $p < 0.05$  para la región supra granular y sustancia blanca empleando prueba Tukey).

De acuerdo con la prueba de Tukey se puede afirmar con un nivel de confianza del 95% que el grupo experimental D ( isquemia con tratamiento con glucosamina) no presento diferencias significativas en cuanto a los conteos de astrocitos con respecto a los controles (grupos E y F), mientras que estos 3 grupos si son estadísticamente diferentes al grupo B el cual no recibió tratamiento.

Ver imágenes representativas correspondientes a la corteza tanto motora como sensitiva para las regiones supra e infra granulares en anexo 4.

## 2.6 Discusión

La principal causa de los accidentes cerebrovasculares es el infarto de la corteza cerebral irrigada por la arteria cerebral media o alguna de sus ramificaciones. La oclusión aguda de dicha arteria suele generar un gran déficit tanto motor como sensitivo debido al territorio comprometido (Fitzgerald, Kaufer, & Malkani, 2004). En la presente investigación se indujo isquemia a los sujetos experimentales mediante la técnica MCAO (Middle cerebral artery occlusion) para simular dicha situación y poder estudiar el papel neuroprotector de la glucosamina y el su efecto sobre el fenómeno de astrogliosis reactiva.

Pocas horas, tras la ocurrencia de un episodio isquémico los astrocitos que logran sobrevivir al daño proliferan y se hipertrofian (Montaner, 2007). En la presente investigación como puede apreciarse en las figuras 2 y 8, se corroboró que para los sujetos experimentales durante la isquemia cerebral se genera una astrocitosis reactiva, la cual fue determinada seis horas tras la generación de la lesión.

Los astrocitos reactivos son los encargados de amortiguar las principales alteraciones del medio extracelular inducidas por la isquemia, las cuales son principalmente: la elevación del glutamato hasta niveles neurotóxicos lo cual desencadenaría la muerte neuronal; la elevación del ion potasio, que impide que se dé una adecuada transmisión de los potenciales de acción y la acidosis, que interfiere desfavorablemente en el metabolismo neuronal. Y es justamente la hiperactividad de estos mecanismos de compensación la que induce a la formación una cicatriz glial (Pascual, Gonzales, Carceller, & Roda, 2000). Debido a todos estos factores, cuando hay daño o lesión ocurre sobre expresión de los astrocitos y tanto su morfología como procesos son más marcados y fácilmente detectables (Guillamón & Gómez, 2012).

En la presente investigación fue posible verificar lo anteriormente planteado, encontrándose que el número de astrocitos reactivos detectados cuando hay isquemia es significativamente diferente al número de astrocitos reactivos detectados cuando no la hay, siendo mayor el conteo cuando hay isquemia. Esto se puede observar en los gráficos 1 y 4 de la sección resultados, donde se muestra que este fenómeno ocurre para cada una de las regiones cerebrales tanto de la corteza sensitiva como motora.

La detección de astrocitos para su conteo se realizó empleando GFAP como marcador molecular, esta pertenece a la familia de proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular, en particular de células gliales como los astrocitos. Por ende este es un

marcador fiable cuando hay daño estructural a nivel de sistema nervioso (Jiménez & Merchant, 2003).

Una vez demostrado que cuando hay lesión los astrocitos reactivos se sobre expresan, se puede hacer uso de este patrón para evaluar el efecto de un potencial fármaco neuroprotector. El tratamiento a estudiar es glucosamina intraperitoneal en una dosis única de 200mg/Kg, aplicada una hora antes de inducida la isquemia.

El efecto de la glucosamina fue evaluado tanto en grupos experimentales a los cuales se les indujo la isquemia como en grupos experimentales que carecían de esta, estableciéndose comparaciones que permitieron evidenciar que:

Cuando no hay isquemia (grupos E y F) se pudo observar que el tratamiento con glucosamina no ejerce ningún tipo de efecto visible sobre los astrocitos. De acuerdo con la prueba de Kruskal Wallis para la región infra granular y con la prueba de Tukey para la región supra granular y sustancia blanca se establece con un nivel de confianza de 95% que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los conteos de astrocitos de estos grupos ( ver anexo 5).

Dichos resultados se evidenciaron en cada una de las regiones del cerebro para ambas cortezas, lo cual se puede apreciar en los gráficos 2 y 5 de la sección de resultados. Con base en esto es posible pensar el tratamiento con glucosamina no ejerce ningún tipo de efecto visible sobre el número o la morfología de los astrocitos y que tampoco está implicada en la generación del fenómeno de astrogliosis reactiva.

Por otro lado, se realizó una comparación entre número de astrocitos detectados entre los grupos B (isquémico, sin tratamiento con glucosamina) y el grupo D (isquémico, con tratamiento con glucosamina), con el fin de evaluar el efecto de la glucosamina cuando hay daño.

Diversas hipótesis sugieren que la glucosamina reduce el tamaño de infarto en un modelo animal. Lo cual se evidencia en investigaciones donde los sujetos experimentales son sometidos a estrés y el hecho de que se incremente la modificación O-unión-N-acetil glucosamina (O-GlcNAc) permite que sus células puedan sobrevivir (Zachara, O'Donnell, Cheung, Mercer, Marth, & Hart, 2004). Por esto emplear la glucosamina como sustrato de dicha modificación, se piensa es de utilidad para disminuir el daño celular ocasionado por infarto cerebral.

Resultados obtenidos por parte del grupo de investigación de fisiología animal de la universidad ICESI ratifican dichos resultados, demostrando que la glucosamina disminuye el tamaño del infarto cerebral 36 horas después de generada la isquemia en la rata wistar adulta ( Ver anexo 3). Como



grupo de investigación suponemos con base en investigaciones previas hechas en modelo de corazón de rata sometido a isquemia (Laczy, y otros, 2008), que la protección que genera la glucosamina está relacionada con el aumento de la glicosilación tipo O-glcnac, a la cual denominamos O-glicosilación. Esta glicosilación al parecer compite con la fosforilación, modificación post-traducciona realizada por las cinasas, y esta competencia por ocupar serinas o treoninas en las proteínas diana durante momentos de estrés es uno de los mecanismos que se ha relacionado con la acción protectora.

Entonces, en astrocitos, podría ser que la glucosamina estuviera modulando de alguna manera su reactividad al competir con las vías que se activan durante la isquemia.

Adicionalmente, se conoce que la glucosamina puede suprimir la activación microglial y la acumulación de macrófagos, también puede suprimir la inducción de moléculas inflamatorias en el cerebro como lo son IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , iNOS y COX-2 en el cerebro post-isquémico. Generando entonces que la glucosamina retrase los procesos de daño en el cerebro tras la ocurrencia de isquemia (Hwang, Kim, Lee, & Han, 2010).

Las diferencias en los conteos de astrocitos reactivos de los grupos B y D pueden evidenciarse en los gráficos 3 y 6 de la sección de resultados para las cortezas motora y sensitiva respectivamente.

De acuerdo con la prueba de Tukey se obtuvo para ambas cortezas en cada una de sus regiones que el número de astrocitos detectados en el grupo D no es significativamente diferente al obtenido en los grupos E y F los cuales son controles ( ver anexo 5). Por lo cual se puede pensar que el efecto protector de la glucosamina se relaciona con una menor reactividad glial a las seis horas de generada la isquemia.

## 2.7 Conclusiones

1. Se encontró que cuando hay isquemia cerebral el número de astrocitos reactivos detectados es considerablemente superior a los detectados en un tejido sano.
2. Cuando no hay isquemia cerebral el tratamiento con glucosamina no ejerce ningún tipo de efecto visible sobre el número o la morfología de los astrocitos.
3. El tratamiento con glucosamina cuando hay isquemia cerebral disminuye el número de astrocitos reactivos en la zona de penumbra, lo que puede relacionarse con protección de esta zona.
4. La proteína gliofibrilar ácida es un marcador eficiente para la identificación de astrocitos.
5. La glucosamina es un prometedor tratamiento neuroprotector para la recuperación de las células de la zona de penumbra de la lesión isquémica.

## **2.8 Recomendaciones**

1. Ampliar la cantidad de sujetos experimentales para cada uno de los grupos objeto de estudio.
2. Comparar el efecto de la glucosamina en un modelo animal de isquemia cerebral en ratas suministrando el tratamiento a diversos tiempos tras la inducción de la isquemia.
3. Repetir el procedimiento con otro marcador molecular para astrocitos como por ejemplo la proteína S 100 para comparar los resultados obtenidos.

### 3. REFERENCIAS

- Aghazadeh, A., & Pasutto, F. y. (2002). Single Dose Pharmacokinetics and Bioavailability of Glucosamine in the Rat. *J Pharm Pharmaceut Science* , 181-184.
- Arango, J., Fernandez, S., & Ardila, A. (2003). Las demencias: aspectos clínicos, neuropsicológicos y tratamiento. Manual moderno.
- Arias, J., & Aller, M. A. (2000). En *Enfermería medico quirúrgica II* (pág. 306). TEBAR.
- Brosnan, C. (2013). Characteristics of a reactive astrogliosis. *Revista española de Esclerosis Múltiple* .
- Chatham, J. C. (2010). The role of protein O-linked -N-acetylglucosamine in mediating cardiac stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta, 1800.*, 57-66.
- Escobar, M., & Pimienta, H. (2008). Sistema nervioso. Cali, Colombia: Universidad del Valle.
- Fitzgerald, Kaufer, & Malkani. (2004). Corteza cerebral. En Fitzgerald, Kaufer, & Malkani, *Ortopedia* (pág. 87). Madrid, España: Editorial Medica Panamericana.
- Frohman, K. W. (2010). Methamphetamine acts on subpopulations of neurons regulating sexual behavior in male rats. . *Neuroscience.*, 166, 771-784.
- Gabriel Arteaga D., H. P. (2004). Neuronas inmunoreactivas a parvalbúmina y calbindina en la corteza prefrontal dorsolateral de sujetos humanos. *Centro de estudios cerebrales. Universidad del Valle. Cali*, 107,113 y 116.
- Girden, E. (1992). *ANOVA*. California: Sage Publications.
- Guillamón, T., & Gómez, U. (2012). Astrocitos en las enfermedades neurodegenerativas: Función y caracterización molecular. *ELSEVIER DOYMA*, 1-7.
- Gutierrez, C. (2004). Principios de anatomía, fisiología e higiene. En C. Gutierrez, *Principios de anatomía, fisiología e higiene* (pág. 127 y 128). Mexico: Limusa.
- Hwang, S. Y., Kim, J., Lee, J., & y Han, I. O. (2010). Glucosamine exerts a neuroprotective effect vía suppression of inflammation in rat brainischemia/reperfusion injury. *GLIA 58:1881–1892* , 1881-1892.

Jiménez, L., & Merchant, F. (2003). *Biología celular y molecular*. Mexico: Pearson .

Laczy, B., Hill, B., Wang, K., Paterson, A., withe, C., Xing, D., y otros. (2008). Protein O-GlcNAcylation: a new signaling paradigm. *Physiol Heart Circ Physiol*.

Lehninger, A. (1982). *Bioquímica*. Barcelona, España: Omega.

León, F. (2012). Estudio de la proliferación y de los astrocitos de la eminencia media, inducida por la hipofisectomía. España: Universidad Salamanca.

Montaner, J. (2007). *Fisiopatología de la isquemia*. Barcelona, España: MARGE MEDICA BOOKS.

Ortiz, A., & Uribe, P. y. (2004). Cellular injury study caused by cerebral ischemia in a rat model. Determination of apoptosis presence. *Scielo*, 1.

Pascual, J., Gonzales, F., Carceller, F., & Roda, J. (2000). *Fisiopatología de las células gliales en la isquemia cerebral* . *Neurocirugía*.

Pérez, K. (2006). *Tesis Doctoral: Respuesta de las células gliales al daño neuronal in vitro*. Universidad de Barcelona. Barcelona: Universidad de Barcelona .

Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., & Hall, W. (2008). *Neurociencia*. En D. Purves, G. Augustine, D. Fitzpatrick, & W. Hall, *Neurociencia* (pág. 849). Madrid: Editorial médica panamericana.

Rang, H. D. (2012). *Farmacología*. En H. D. Rang, *Farmacología*. Barcelona, España: ELSEVIER CHURCHILL LIVINGSTONE.

Snell, R. S. (2010). *Neuroanatomía Clínica*. En R. S. Snell, *Neuroanatomía Clínica* (págs. 296,297, 483). España: The Point.

Sofroniew, M., & Vinters, H. (2009). Astrocytes: biology and pathology. *Springer*, 1-12.

Zachara, NE., O'Donnell, N., Cheung, WD., Mercer, JJ., Marth, JD., y Hart, GW. (2004). Dynamic O-GlcNAc Modification of Nucleocytoplasmic Proteins in Response to Stress. A survival response of mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(29), 30133-30142. doi: 10.1074/jbc.M403773200

## 4. ANEXOS

### Anexo 1. Carta de aprobación por parte del comité de ética



Santiago de Cali, 8 de Octubre de 2010

Doctores  
**Juliana Rengifo Gómez**  
**César Arango Dávila**  
Investigadores Universidad ICESI  
Ciudad

**Asunto:** Aprobación de proyectos de investigación. **Acta No. 01 del 8 de Octubre de 2010.**

Estimados Doctores,

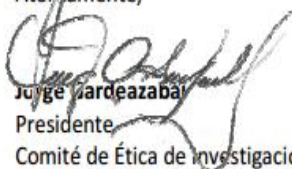
Respecto de la solicitud realizada al Comité de Ética de Investigaciones en Animales Experimentales para evaluar los siguientes estudios:

1. EVALUACIÓN DE LOS FENÓMENOS DE GLICOSILACIÓN Y SUS IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE EXCITOTOXICIDAD, ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN CEREBRAL.
2. EFECTOS DE LA NEUTRALIZACIÓN DEL TNF- $\alpha$  SOLUBLE vs. TNF- $\alpha$  SOLUBLE Y TISULAR EN EL TAMAÑO DE LA LESION CEREBRAL INDUCIDA POR ISQUEMIA EN UN MODELO EXPERIMENTAL.
3. USO DE LA SOLUCIÓN SALINA HIPERTÓNICA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA CEREBRAL EN RATAS: REDUCCIÓN DE LA PENUMBRA ISQUÉMICA Y DEL DAÑO SECUNDARIO.

Me permito comunicarles que el Comité, en su reunión del día 8 de Octubre de 2010, aprobó la ejecución de los tres estudios mencionados. La aprobación de las tres investigaciones queda consignada en el **Acta No. 01 del 8 de Octubre de 2010.**

Solicito su colaboración para que se informe al Comité, a través del formato de seguimiento de proyectos, los resultados de los estudios con el objetivo de realizar el seguimiento de los mismos.

Aterramente,

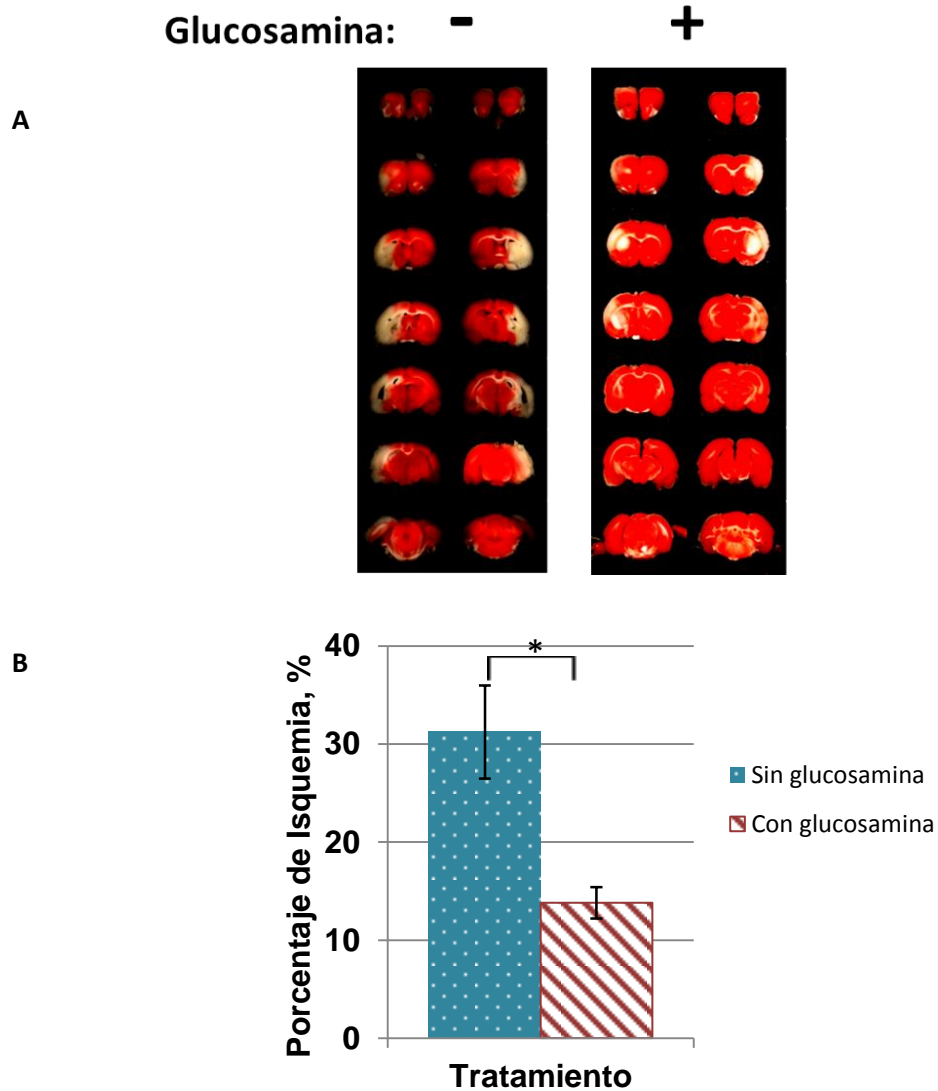
  
Jorge Pardeazabal  
Presidente  
Comité de Ética de Investigaciones en Animales Experimentales

## Anexo 2. Matriz de marco lógico.

<b>Objetivo General</b>			
Determinar el efecto del tratamiento con glucosamina (glicosilación tipo O-GlcNAc) sobre el fenómeno de astrogliosis reactiva en las células gliales de rata en condiciones isquémicas.			
	<b>Actividades</b>	<b>Supuestos</b>	<b>Indicador</b>
<p><b>Objetivo específico 1:</b></p> <p>Marcar las células gliales de los cortes obtenidos de los diferentes grupos de ratas (Con y sin isquemia) con GFAP (proteína gliofibrilar ácida).</p>	<p>-Obtener los cortes para el marcaje a partir de los diferentes grupos de ratas.</p> <p>-Lavar cada uno de los cortes pertenecientes a los diferentes grupos.</p> <p>-Marcar los cortes suministrados empleando GFAP.</p>	<p>El GFAP es capaz de marcar de forma específica las células gliales a evaluar.</p>	<p>Obtener células marcadas con GFAP</p>
<p><b>Objetivo específico 2:</b></p> <p>Identificar y comparar el fenómeno de astrogliosis reactiva en las células gliales de rata de un tejido sano con un tejido en condiciones de isquemia</p>	<p>Observar al microscopio las diferencias presentes en el tejido sano e isquémico.</p>	<p>-Contar con la disponibilidad del microscopio.</p> <p>-Se observaran diferencias en la cantidad de astrocitos en un tejido sano con un tejido isquémico</p>	<p>El tejido sano y el tejido al que se indujo isquemia presentan diferencias significativas en cuanto a cantidad de astrocitos reactivos.</p>
<p><b>Objetivo específico 3:</b></p> <p>Determinar el efecto que tiene la glucosamina sobre el fenómeno de astrogliosis reactiva en muestras de tejido cerebral, sometidos previamente a estrés isquémico.</p>	<p>Observar bajo microscopio las diferencias existentes dos tejidos isquémicos, uno tratado con glucosamina y otro sin tratamiento.</p>	<p>-Contar con la disponibilidad microscopio</p> <p>-Se apreciaran diferencias en los diferentes grupos experimentales</p>	<p>Diferencias en el marcaje de inmunohistoquímica en muestras de tejido con y sin tratamiento</p>

**Anexo 3.** Resultados obtenidos en el laboratorio de fisiología animal de la universidad Icesi.

**Figura I**



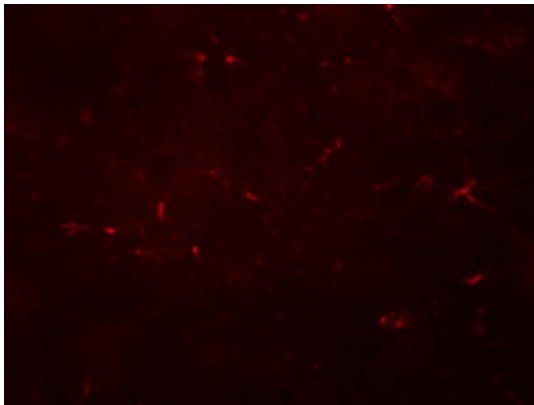
**Figura I.** Tamaño del infarto evaluado con TTC, reactivo con el que se destaca en blanco el tejido muerto que no se tiñe de rojo, a las 24 horas de inducida la isquemia en el modelo de isquemia cerebral focal en ratas Wistar MCAO (Middle cerebral artery occlusion). (A) Tinción con TTC de cortes coronales de cerebro de rata a la que se le induce una isquemia con reperusión, sin tratamiento de glucosamina y con aplicación intraperitoneal de glucosamina media hora después de inducida la isquemia. (B) Comparación del tamaño del infarto medido como porcentaje del volumen del cerebro en los grupos sin tratamiento y con glucosamina (media  $\pm$ EEM, n=4, \*,  $p < 0.05$  por la prueba de t-student).



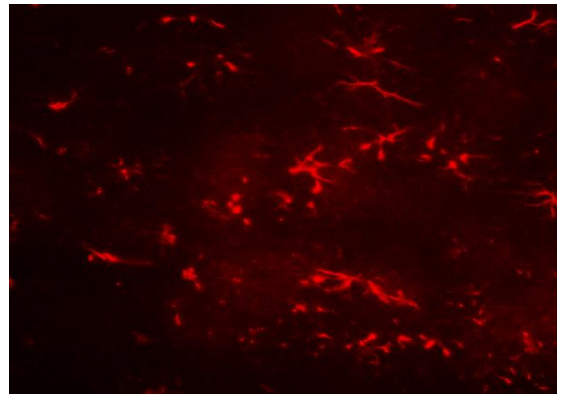
## Anexo 4. Imágenes Representativas

### CORTEZA MOTORA

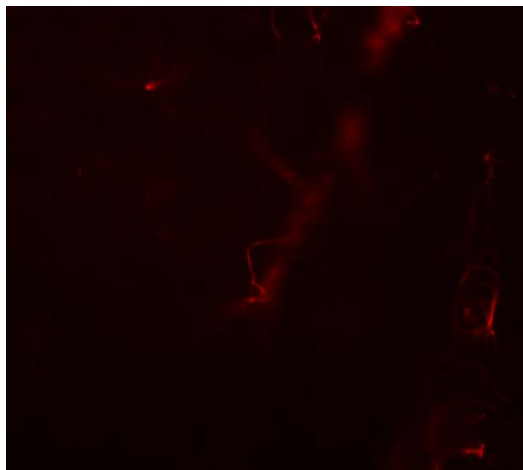
- Efecto de la isquemia. Comparación entre grupos F (control) y B (isquemia)



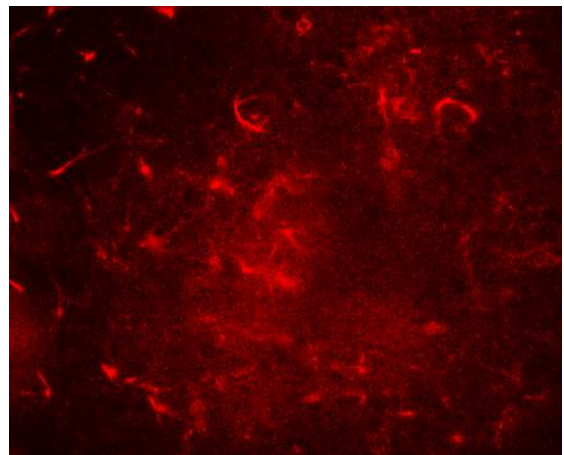
**Figura 13.** Astrocitos pertenecientes al grupo F (Control). Fotografía tomada en la región infra granular de la corteza motora.



**Figura 14.** . Astrocitos pertenecientes al grupo B (isquemia). Fotografía tomada en la región infra granular de la corteza motora.



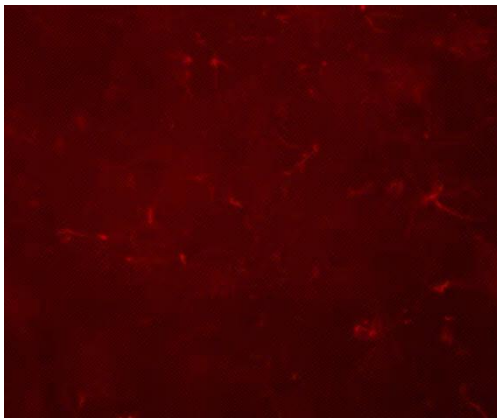
**Figura 15.** Astrocitos pertenecientes al grupo F (control). Fotografía tomada en la región supra granular de la corteza motora.



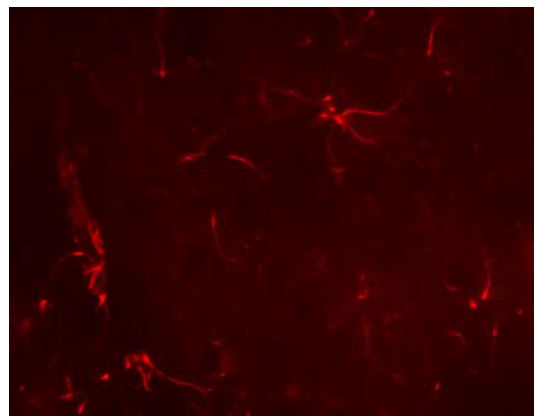
**Figura 16.** Astrocitos pertenecientes al grupo B (isquemia). Fotografía tomada en la región supra granular de la corteza motora.

- 
- 
- 
- 
- 

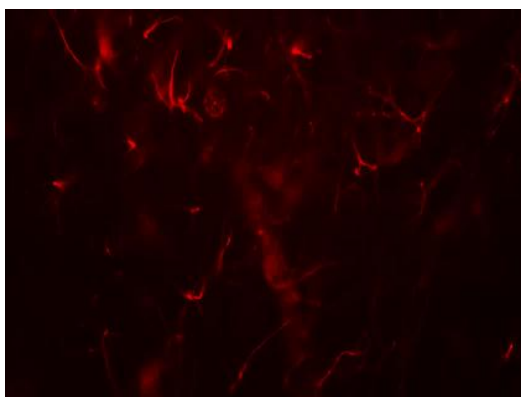
- **Efecto de la glucosamina cuando no hay isquemia. Comparación entre los grupos F (sin glucosamina) y E (con glucosamina).**



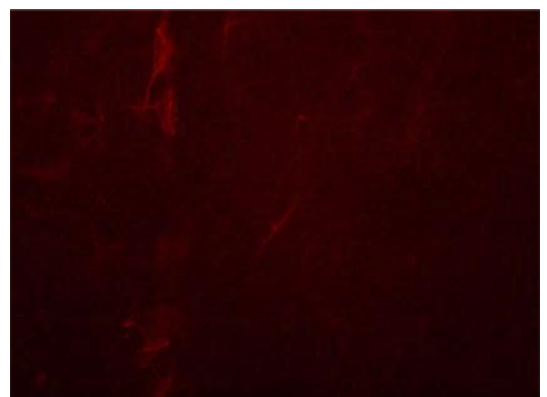
**Figura 17.** Astrocitos pertenecientes al grupo F (sin glucosamina). Fotografía tomada en la región infra granular de la corteza motora.



**Figura 18.** Astrocitos pertenecientes al grupo E (con glucosamina). Fotografía tomada en la región infra granular de la corteza motora.

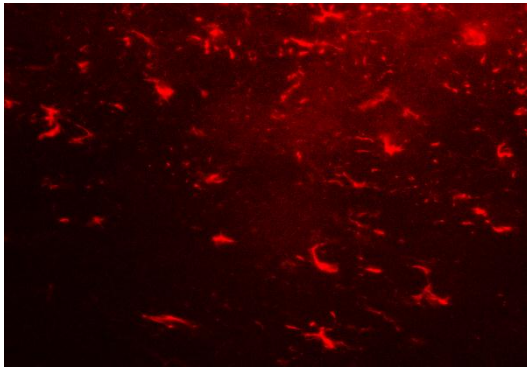


**Figura 19.** Astrocitos pertenecientes al grupo F (sin glucosamina). Fotografía tomada en la región supra granular de la corteza motora.

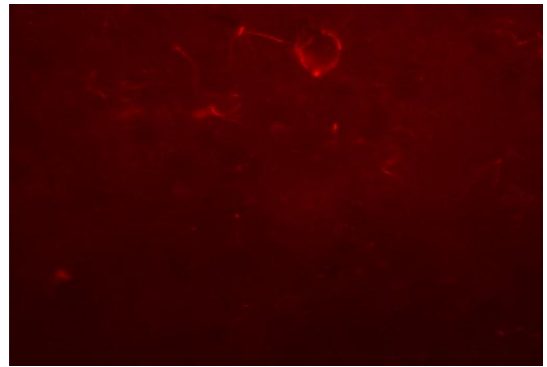


**Figura 20.** Astrocitos pertenecientes al grupo E (con glucosamina). Fotografía tomada en la región supra granular de la corteza motora.

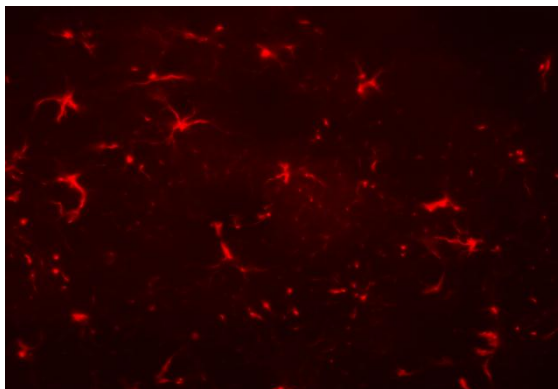
- Efecto de la glucosamina cuando hay isquemia .Comparación entre grupos B (sin glucosamina) y D (con glucosamina).



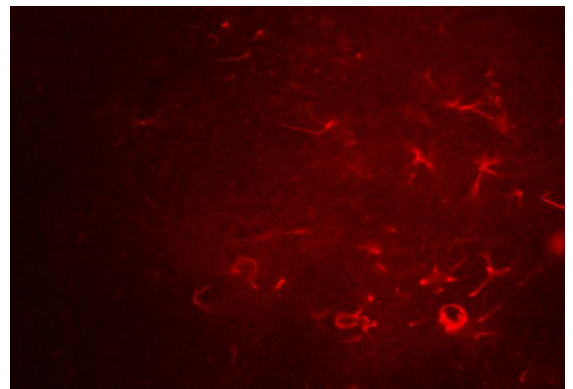
**Figura 21.** Astrocitos pertenecientes al grupo B (sin glucosamina). Fotografía tomada en la región infra granular de la corteza motora.



**Figura 22.** Astrocitos pertenecientes al grupo D. Fotografía tomada en la región infra granular de la corteza motora.



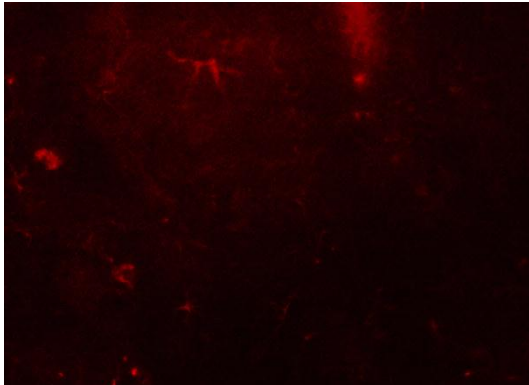
**Figura 23.** Astrocitos pertenecientes al grupo B (sin glucosamina). Fotografía tomada en la región supra granular de la corteza motora.



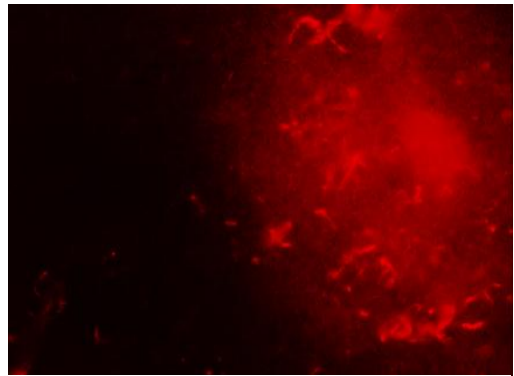
**Figura 24.** Astrocitos pertenecientes al grupo D (con glucosamina). Fotografía tomada en la región supra granular de la corteza motora.

## CORTEZA SENSITIVA

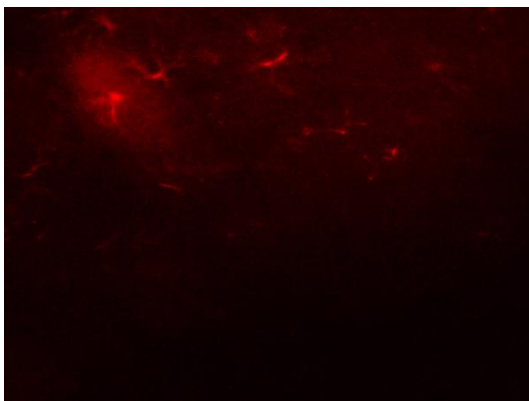
- Efecto de la isquemia. Comparación entre grupos F (control) y B (isquemia)



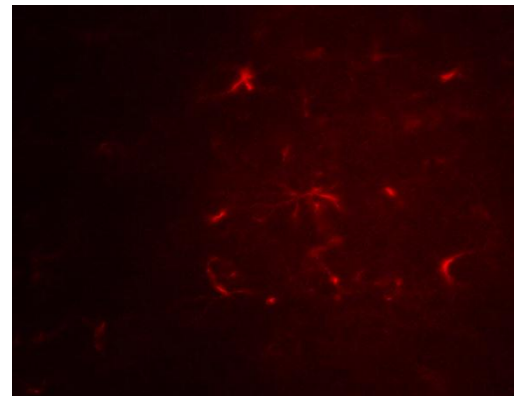
**Figura 25.** Astrocitos pertenecientes al grupo F (control). Fotografía tomada en la región infra granular de la corteza sensitiva.



**Figura 26.** Astrocitos pertenecientes al grupo B (isquemia). Fotografía tomada en la región infra granular de la corteza sensitiva.

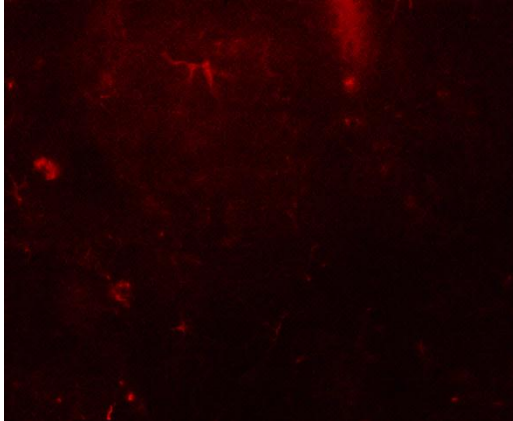


**Figura 27.** Astrocitos pertenecientes al grupo F (control). Fotografía tomada en la región supra granular de la corteza sensitiva.

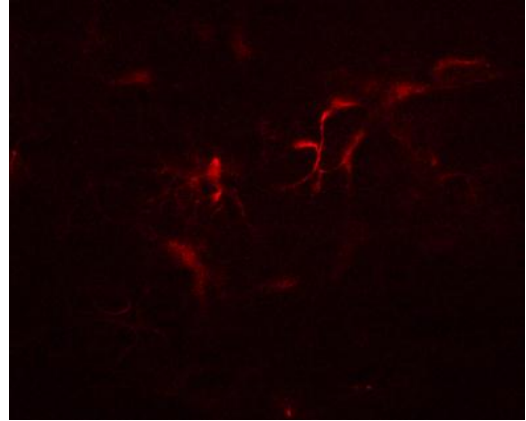


**Figura 28.** Astrocitos pertenecientes al grupo B (isquemia). Fotografía tomada en la región supra granular de la corteza sensitiva.

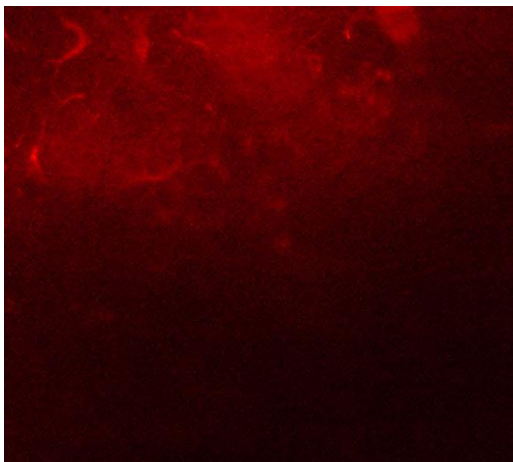
- Efecto de la glucosamina cuando no hay isquemia. Comparación entre los grupos F (sin glucosamina) y E (con glucosamina).



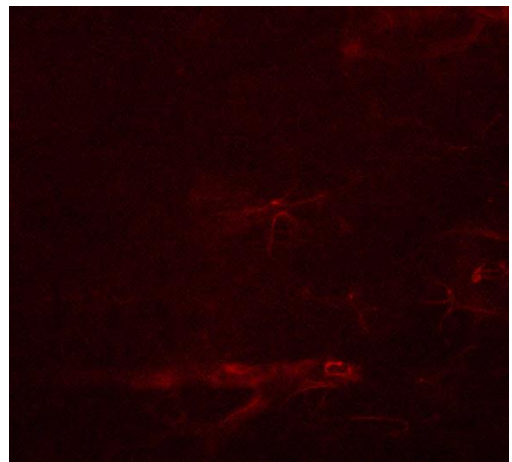
**Figura 28.** Astrocitos pertenecientes al grupo F (sin glucosamina). Fotografía tomada en la región infra granular de la corteza sensitiva.



**Figura 29.** Astrocitos pertenecientes al grupo E (con glucosamina). Fotografía tomada en la región infra granular de la corteza sensitiva.

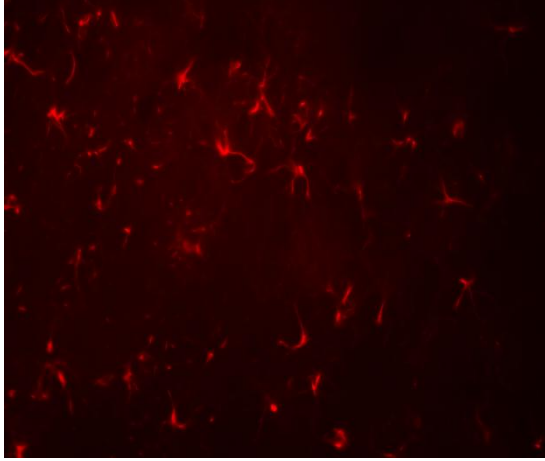


**Figura 30.** Astrocitos pertenecientes al grupo F (sin glucosamina). Fotografía tomada en la región supra granular de la corteza sensitiva.

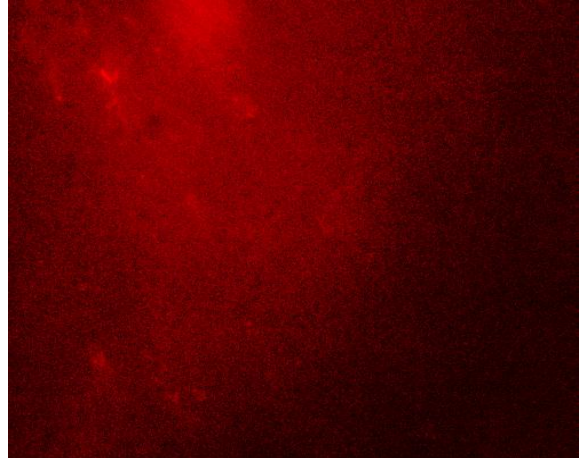


**Figura 31.** Astrocitos pertenecientes al grupo E (con glucosamina). Fotografía tomada en la región infra granular de la corteza sensitiva.

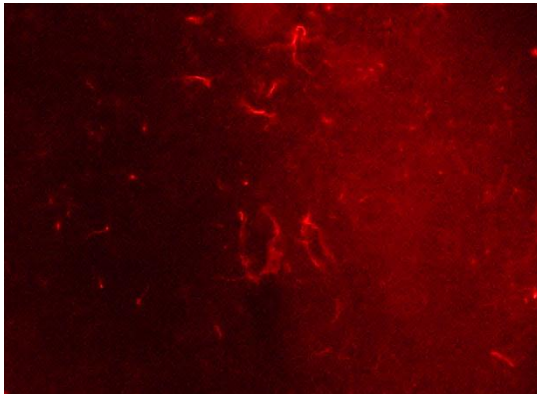
- Efecto de la glucosamina cuando hay isquemia. Comparación entre grupos B (sin tratamiento con glucosamina) y D (con tratamiento).



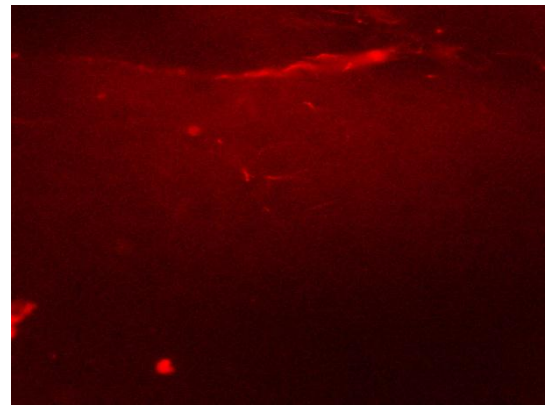
**Figura 33.** Astrocitos pertenecientes al grupo B (sin glucosamina). Fotografía tomada en la región infra granular de la corteza sensitiva.



**Figura 34.** Astrocitos pertenecientes al grupo D (con glucosamina). Fotografía tomada en la región infra granular de la corteza motora.



**Figura 35.** Astrocitos pertenecientes al grupo B (sin glucosamina). Fotografía tomada en la región supra granular de la corteza sensitiva.

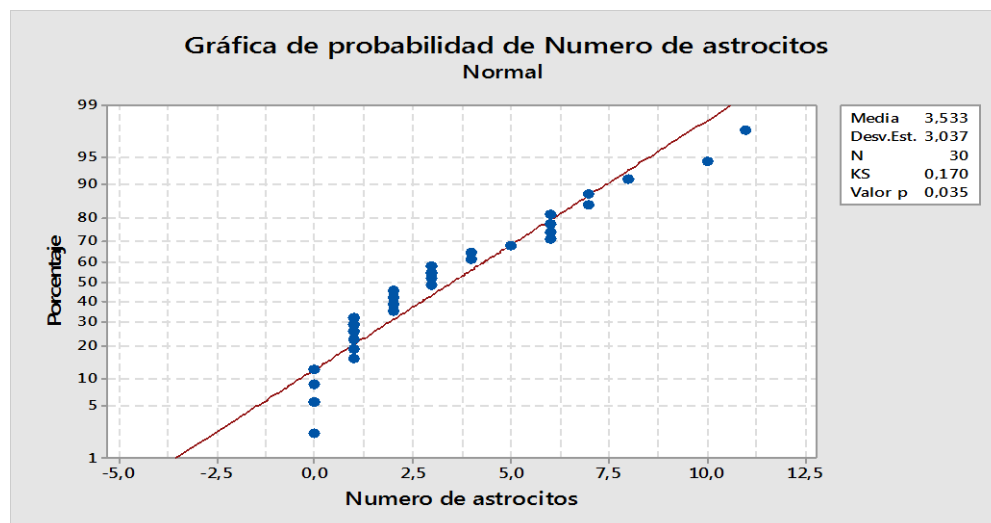


**Figura 36.** Astrocitos pertenecientes al grupo D (con glucosamina). Fotografía tomada en la región supra granular de la corteza sensitiva.

## Anexo 5. Análisis estadístico

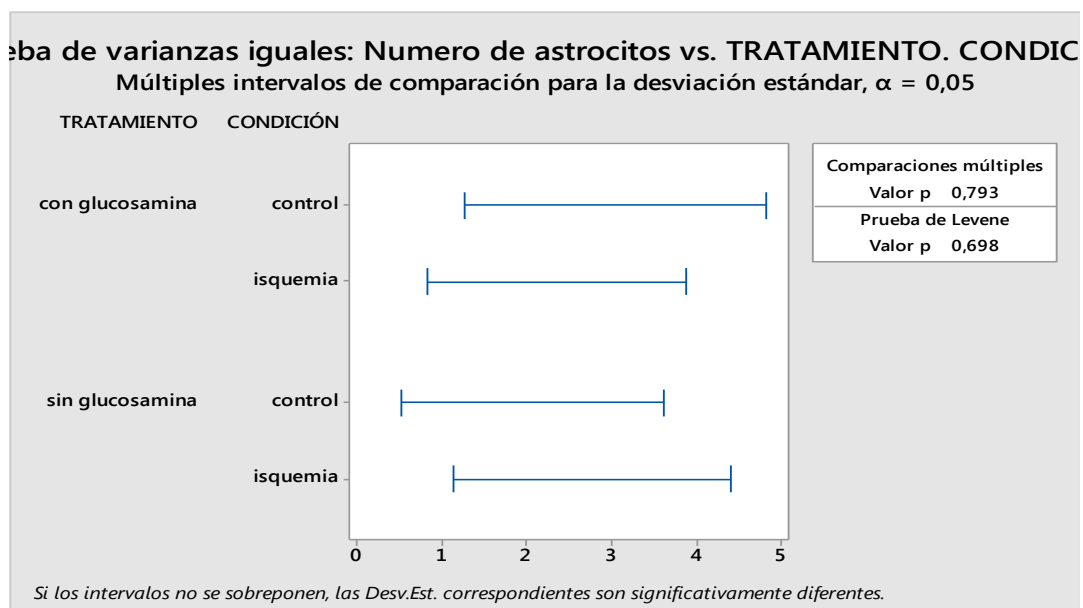
### Región Infra granular- Corteza motora

**Grafico 7.** Prueba de normalidad para el conteo de astrocitos en la región infra granular de la corteza motora.



Debido a que el valor  $p < 0,05$ , Se rechaza  $H_0$  y se puede afirmar que los conteos de astrocitos no tienen distribución normal.

**Grafico 8.** Prueba de varianzas iguales para el conteo de astrocitos en la región infra granular de la corteza motora.



Debido a que el valor  $p > 0,05$ , acepta  $H_0$  y se puede afirmar que las varianzas son iguales. No obstante como no se cumple el supuesto de normalidad, no se puede realizar un análisis empleando Anova y se realizara Kruskal Wallis como prueba no paramétrica.

## 2. Kruskal Wallis

- **Comparación entre los números de astrocitos de los grupos F y E (controles)**

Prueba de Kruskal-Wallis en Número de astrocitos

TRATAMIENTO	N	Mediana	Clasificación del promedio	Z
con glucosamina	6	3,000	7,5	0,96
sin glucosamina	6	2,000	5,5	-0,96
General	12		6,5	

$H = 0,92$  GL = 1 P = 0,337

$H = 0,97$  GL = 1 P = 0,325 (ajustados para los vínculos)

Debido a que H es menor que  $X_{\alpha}^2(0,05, 1) = 3,8415$ , se puede afirmar que los controles son iguales.

- **Comparación entre los números de astrocitos de los grupos B (sin glucosamina) y D (con glucosamina). Ambos grupos tienen isquemia.**

TRATAMIENTO	N	Mediana	Clasificación del promedio	Z
con glucosamina	9	1,000	5,0	-3,58
sin glucosamina	9	7,000	14,0	3,58
General	18		9,5	

$H = 12,79$  GL = 1 P = 0,000

$H = 13,21$  GL = 1 P = 0,000 (ajustados para los vínculos)

Debido a que H es mayor que  $X_{\alpha}^2(0,05, 1) = 3,8415$ , se puede afirmar que los conteos de los grupos B y D son estadísticamente diferentes.



- **Comparación entre los números de astrocitos de los grupos B (isquemia) y F (sin isquemia). Ninguno de estos dos grupos recibió tratamiento.**

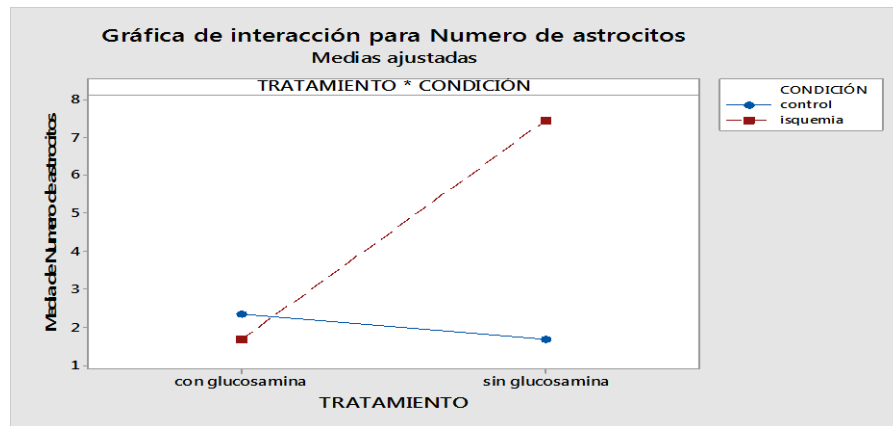
condicion	N	Mediana	Clasificación del promedio	Z
control	6	2,000	3,5	-3,18
isquemia	9	7,000	11,0	3,18
General	15		8,0	

H = 10,13 GL = 1 P = 0,001

H = 10,40 GL = 1 P = 0,001 (ajustados para los vínculos)

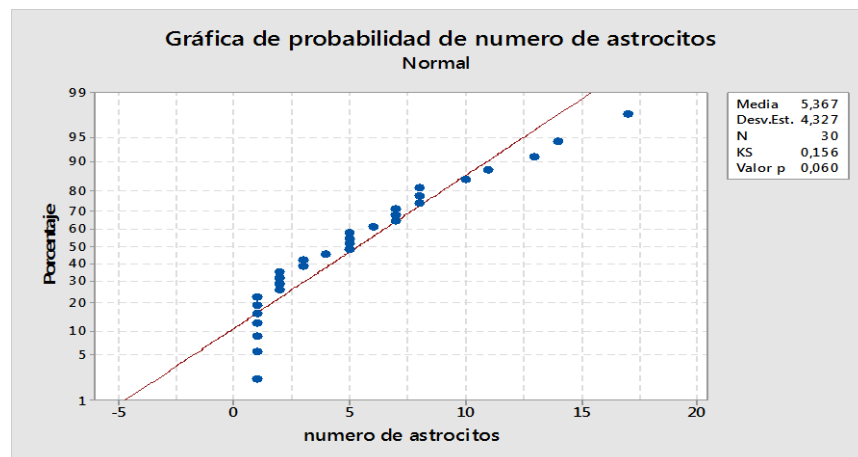
Debido a que H es mayor que  $\chi^2_{(0,05, 1)} = 3,8415$ , se puede afirmar que los conteos de los grupos B y F son estadísticamente diferentes.

**Grafico 9.** Interacción para el número de astrocitos en la región infra granular de la corteza motora.



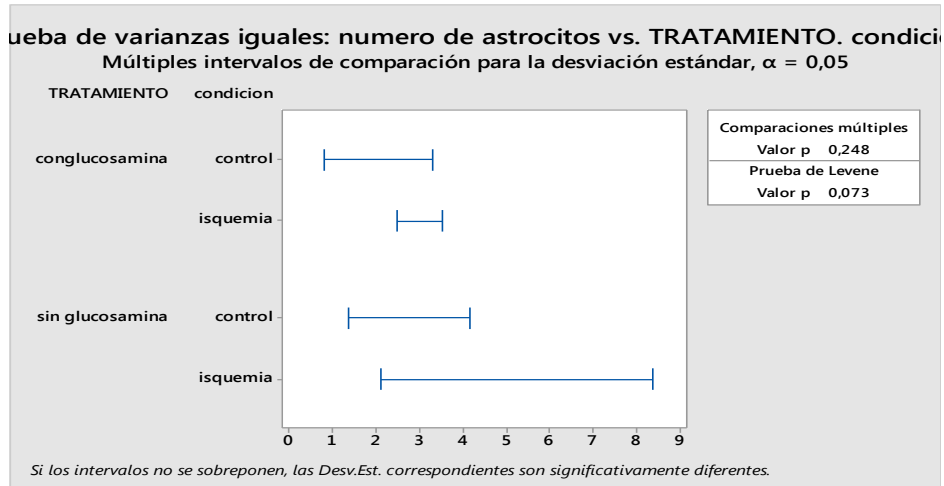
### Región Supra granular- Corteza motora

**Grafico 10.** Prueba de normalidad para el conteo de astrocitos en la región supra granular de la corteza motora.



Debido a que el valor  $p > 0,05$ , Se acepta  $H_0$  y se puede afirmar que los conteos de astrocitos tienen distribución normal

**Grafico 11.** Prueba de varianzas iguales para el conteo de astrocitos en la región supra granular de la corteza motora.



Debido a que el valor  $p > 0,05$ , Se acepta  $H_0$  y se puede afirmar que los conteos de astrocitos tienen varianzas iguales.

A continuación se realizara Tukey como prueba post- Anova.

## 2. Prueba de Tukey

- **Comparaciones por parejas de Tukey:**

**Respuesta = número de astrocitos**

**Término = TRATAMIENTO**

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

TRATAMIENTO	N	Media	Agrupación
sin glucosamina	15	6,77778	A
conglucosamina	15	2,94444	B

- **Comparaciones por parejas de Tukey:**

**Respuesta = número de astrocitos**

**Término = condición**

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

condicion	N	Media	Agrupación
isquemia	18	7,38889	A
control	12	2,33333	B

- **Comparaciones por parejas de Tukey:**

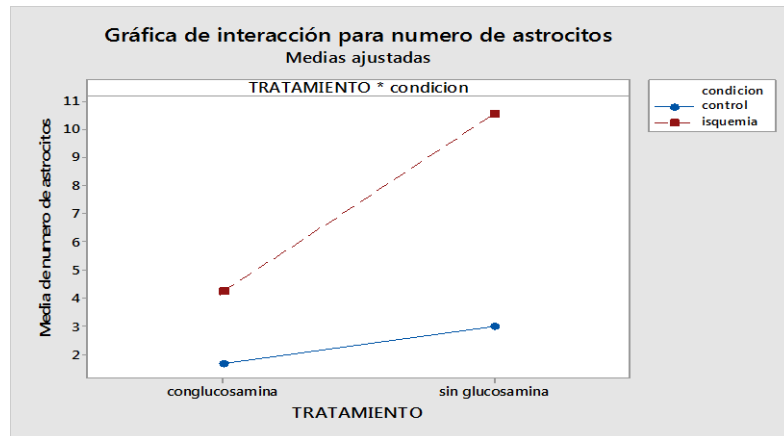
**Respuesta = número de astrocitos**

**Término = TRATAMIENTO\*c**

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

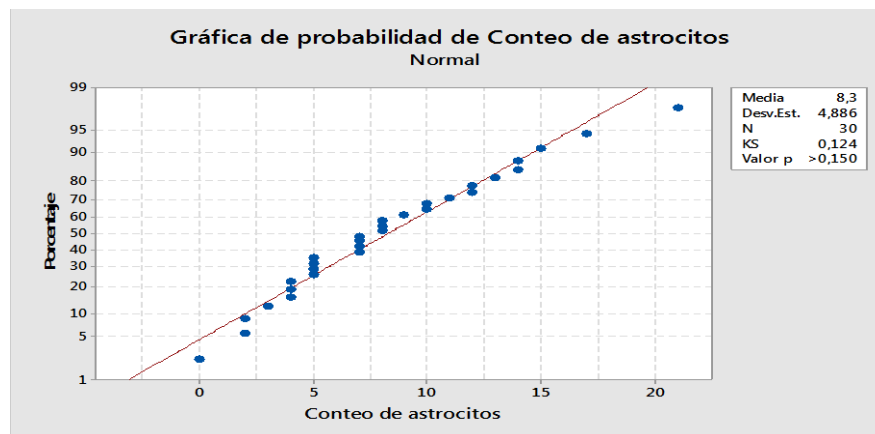
TRATAMIENTO*condicion	N	Media	Agrupación
sin glucosamina isquemia	9	10,5556	A
conglucosamina isquemia	9	4,2222	B
sin glucosamina control	6	3,0000	B
conglucosamina control	6	1,6667	B

**Gráfico 12.** Interacciones para Número de astrocitos en la región supra granular de la corteza motora.



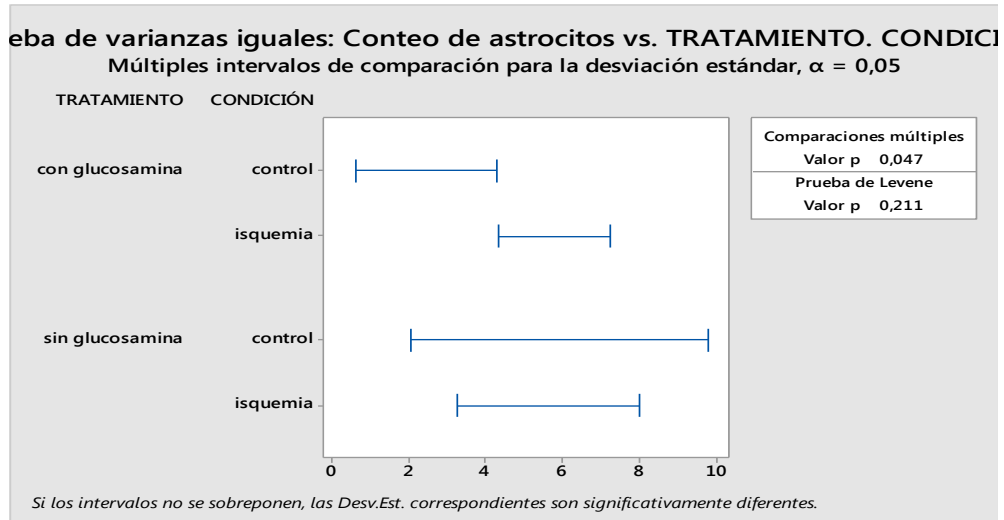
### Sustancia blanca- Corteza motora

**Gráfico 13.** Prueba de normalidad para el conteo de astrocitos en la región supra granular de la corteza motora



Debido a que el valor  $p > 0,05$ , Se acepta  $H_0$  y se puede afirmar que los conteos de astrocitos tienen distribución normal.

**Gráfico 14.** Prueba de varianzas iguales para el conteo de astrocitos en la sustancia blanca de la corteza motora.



Debido a que el valor  $p > 0,05$ , Se acepta  $H_0$  y se puede afirmar que las varianzas son iguales. Ya que se cumplen ambos supuestos del Anova se procederá a realizar la prueba de Tukey como post- Anova.

## 2. Prueba de Tukey

- **Comparaciones por parejas de Tukey:**

**Respuesta = Conteo de astrocitos**

**Término = TRATAMIENTO**

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

TRATAMIENTO	N	Media	Agrupación
sin glucosamina	15	9,25000	A
con glucosamina	15	6,41667	A

- **Comparaciones por parejas de Tukey:**

**Respuesta = Conteo de astrocitos**

**Término = CONDICIÓN**

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

CONDICIÓN	N	Media	Agrupación
isquemia	18	10,1667	A
control	12	5,5000	B

- **Comparaciones por parejas de Tukey:**

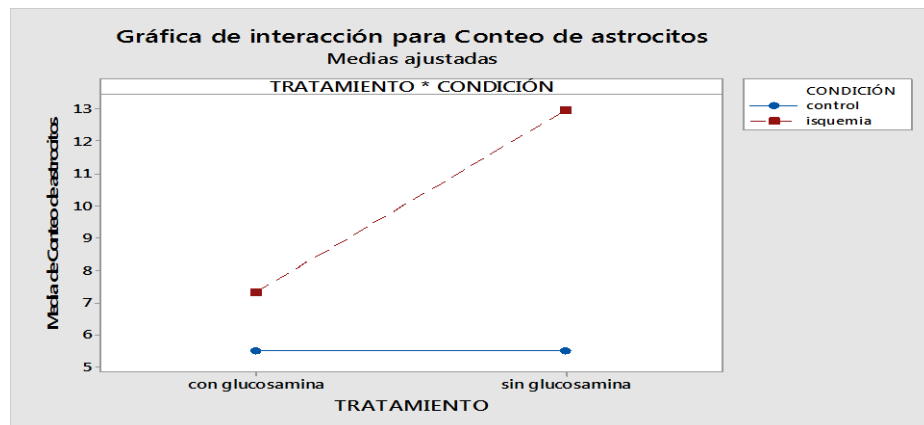
**Respuesta = Conteo de astrocitos**

**Término = TRATAMIENTO\*C**

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

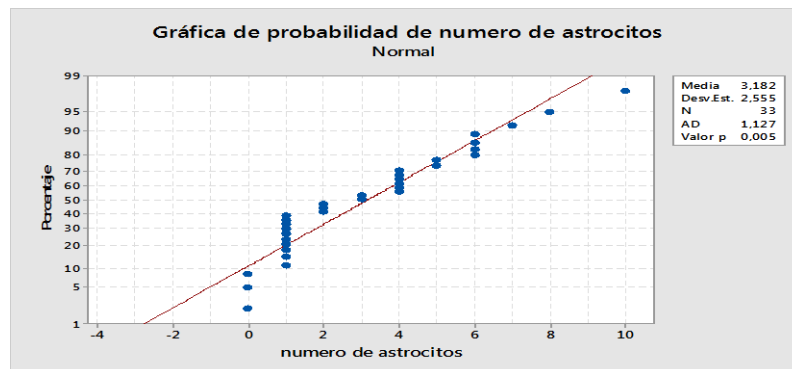
TRATAMIENTO*CONDICIÓN	N	Media	Agrupación
sin glucosamina isquemia	9	13,0000	A
con glucosamina isquemia	9	7,3333	B
con glucosamina control	6	5,5000	B
sin glucosamina control	6	5,5000	B

**Grafico 15.** Interacciones para Número de astrocitos en la sustancia blanca de la corteza motora.



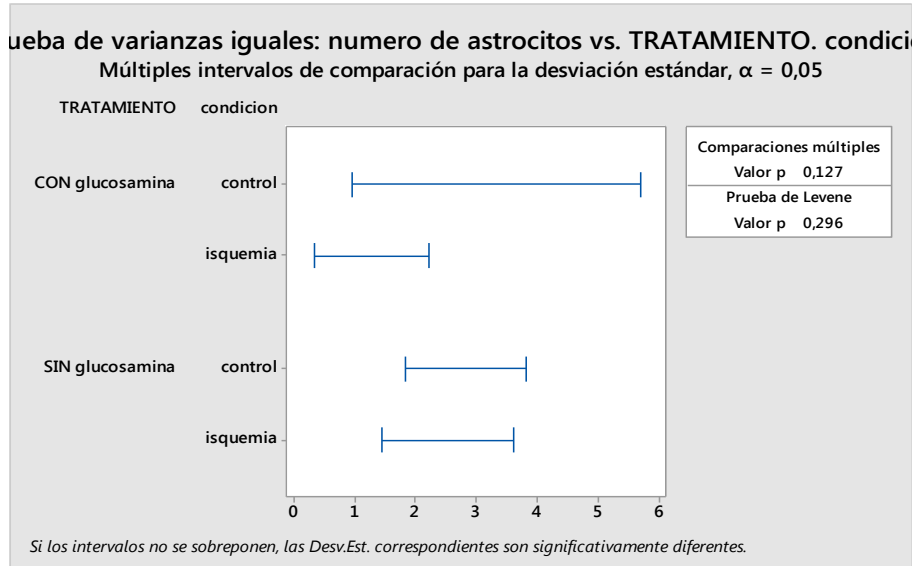
### Región Infra granular- Corteza sensitiva

**Grafico 16.** Prueba de normalidad para el conteo de astrocitos en la región infra granular de la corteza sensitiva.



Debido a que el valor  $p < 0,05$ , Se rechaza  $H_0$  y se puede afirmar que los conteos de astrocitos no tienen distribución normal.

**Grafico 17.** Prueba de varianzas iguales para el conteo de astrocitos en la región infra granular de la corteza sensitiva.



Debido a que el valor de  $p > 0,05$  se acepta  $H_0$  y es posible afirmar que las varianzas son iguales.

A pesar que se cumpla el supuesto 1 que es homogeneidad de varianzas no es posible realizar un ANOVA debido a que no se cumplen ambos supuestos. Por ende se procederá a realizar Kruskal-Wallis como prueba no paramétrica.

## 2. Prueba de Kruskal-Wallis: NUMERO DE ASTROCITOS vs. TRATAMIENTO

- Prueba de Kruskal-Wallis en NUMERO DE ASTROCITOS

TRATAMIENTO	N	Mediana	Clasificación del promedio	Z
CON glucosamina	6	3,500	13,5	0,40
SIN glucosamina	18	1,000	12,2	-0,40
General	24		12,5	

$$H = 0,16 \quad GL = 1 \quad P = 0,689$$

$$H = 0,17 \quad GL = 1 \quad P = 0,683 \quad (\text{ajustados para los vínculos})$$

Debido a que  $H$  es menor que  $\chi^2_{(0,05, 1)} = 3,8415$ , se puede afirmar que los controles son iguales.

• **Prueba de Kruskal-Wallis: NUMERO DE ASTROCITOS vs. TRATAMIENTO**

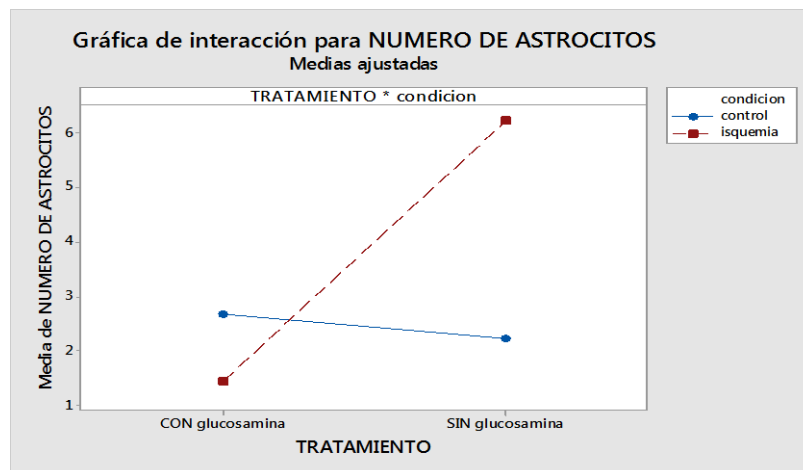
TRATAMIENTO	N	Mediana	Clasificación del promedio	Z
CON glucosamina	9	1,000	5,0	-3,58
SIN glucosamina	9	6,000	14,0	3,58
General	18		9,5	

H = 12,79 GL = 1 P = 0,000

H = 13,35 GL = 1 P = 0,000 (ajustados para los vínculos)

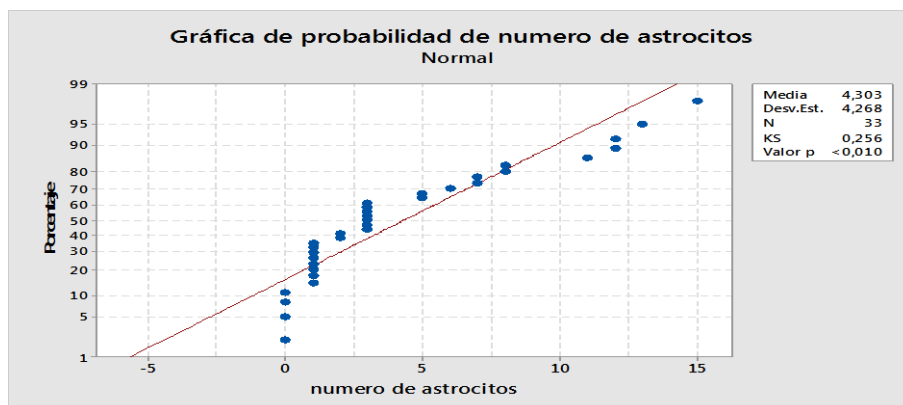
Debido a que H es mayor que  $\chi^2_i(0,05, 1) = 3,8415.$ , se puede afirmar que los grupos B y D son diferentes.

**Grafico 18.** Interacciones para Número de astrocitos en la región infra granular de la corteza sensitiva.



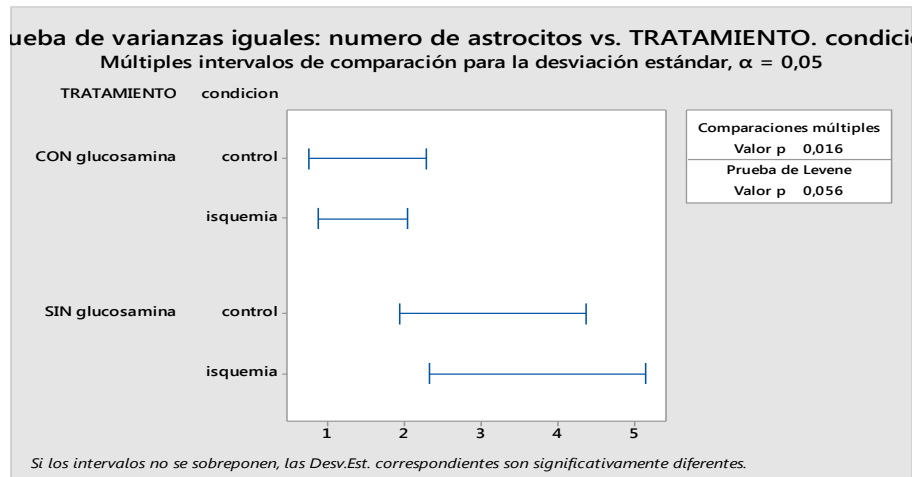
**Región Supra granular- Corteza sensitiva**

**Grafico 19.** Prueba de normalidad para el conteo de astrocitos en la región supra granular de la corteza sensitiva.



Debido a que el valor  $P > 0,05$ , Se acepta  $H_0$  y se puede afirmar que los conteos de astrocitos tienen distribución normal.

**Grafico 20.** Prueba de varianzas iguales para el conteo de astrocitos en la región supra granular de la corteza sensitiva.



Debido a que  $P > 0,05$  se acepta  $H_0$  y se puede afirmar que los resultados del conteo de astrocitos tienen varianzas iguales.

- Por ende se procederá a realizar una prueba post- ANOVA para evaluar las diferencias existentes.

## 2. Prueba de Tukey

- **Comparaciones por parejas, empleando la prueba de Tukey:**

**Respuesta = número de astrocitos**

**Término = TRATAMIENTO**

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

TRATAMIENTO	N	Media	Agrupación
SIN glucosamina	18	6,33333	A
CON glucosamina	15	1,91667	B

- **Comparaciones por parejas, empleando la prueba de Tukey:**

**Respuesta = número de astrocitos**

**Término = condición**



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

condicion	N	Media	Agrupación
isquemia	18	6,00	A
control	15	2,25	B

- **Comparaciones por parejas, empleando la prueba de Tukey:**

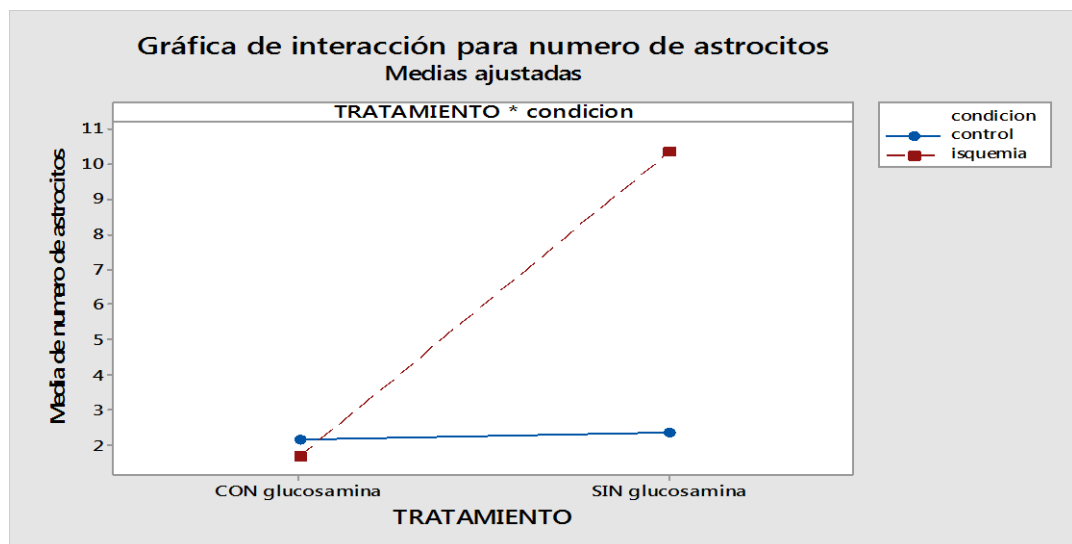
**Respuesta = número de astrocitos**

**Término = TRATAMIENTO\*c**

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

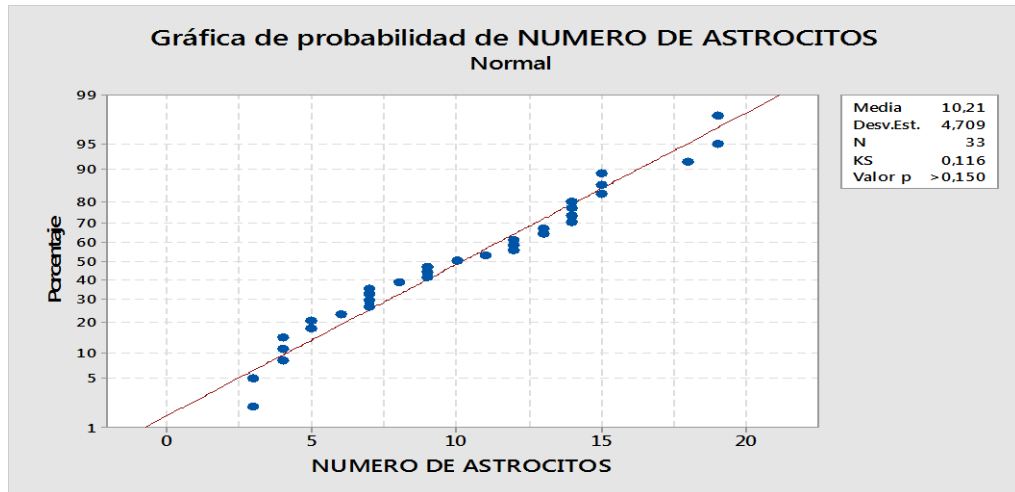
TRATAMIENTO*condicion	N	Media	Agrupación
SIN glucosamina isquemia	9	10,3333	A
SIN glucosamina control	9	2,3333	B
CON glucosamina control	6	2,1667	B
CON glucosamina isquemia	9	1,6667	B

**Gráfico 21.** Interacciones para Número de astrocitos en la región supra granular de la corteza sensitiva.



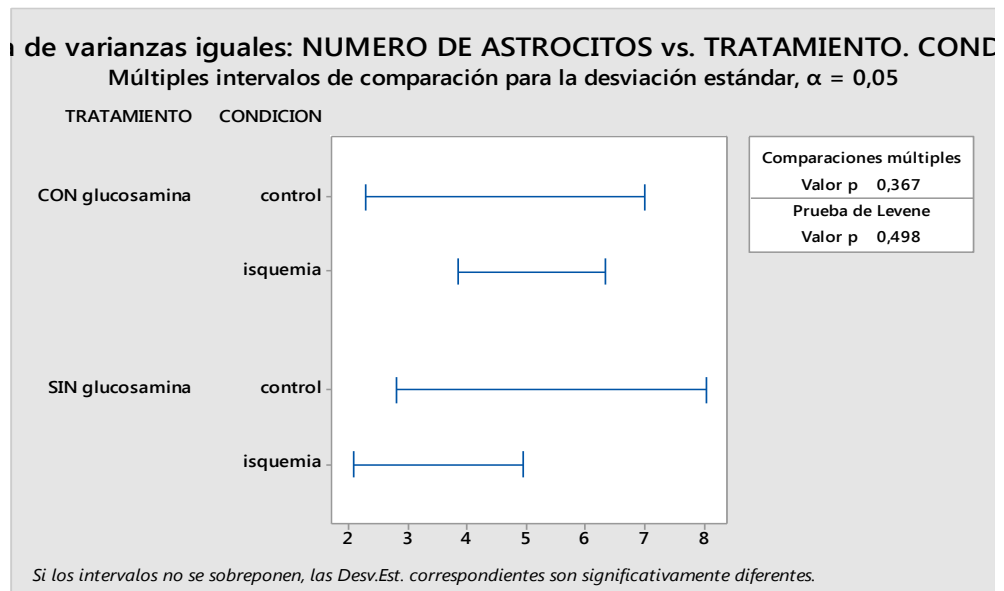
## Sustancia blanca - Corteza sensitiva

**Grafico 22.** Prueba de normalidad para el conteo de astrocitos en la sustancia blanca de la corteza sensitiva.



Debido a que el valor  $p > 0,05$ , Se acepta  $H_0$  y se puede afirmar que los conteos de astrocitos tienen distribución normal.

**Grafico 23.** Prueba de varianzas iguales para el conteo de astrocitos en la sustancia blanca de la corteza sensitiva.



Debido a que el valor  $p > 0,05$ , Se acepta  $H_0$  y se puede afirmar que las varianzas son iguales. Por lo cual se procederá a realizar una prueba post ANOVA.

## 2. Prueba de Tukey

- **Comparaciones por parejas de Tukey:**

**Respuesta = NUMERO DE ASTROCITOS**

**Término = TRATAMIENTO**

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

TRATAMIENTO	N	Media	Agrupación
SIN glucosamina	18	11,7222	A
CON glucosamina	15	8,3889	B

- **Comparaciones por parejas de Tukey:**

**Respuesta = NUMERO DE ASTROCITOS**

**Término = CONDICION**

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

CONDICION	N	Media	Agrupación
isquemia	18	11,9444	A
control	15	8,1667	B

- **Comparaciones por parejas de Tukey:**

**Respuesta = NUMERO DE ASTROCITOS**

**Término = TRATAMIENTO\*C**

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

TRATAMIENTO*CONDICION	N	Media	Agrupación
SIN glucosamina isquemia	9	15,4444	A
CON glucosamina isquemia	9	8,4444	B
CON glucosamina control	6	8,3333	B
SIN glucosamina control	9	8,0000	B

**Grafico 24.** Interacciones para Número de astrocitos en la región infra granular de la corteza sensitiva.

