



**ESTUDIO DEL EFECTO DE LA GLUCOSAMINA SOBRE LA SUPERVIVENCIA
NEURONAL EN CORTEZA CEREBRAL DE RATA CON ISQUEMIA CEREBRAL
FOCAL**

Juan Pablo Castiblanco Salgado

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
CALI
2017

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LA GLUCOSAMINA SOBRE LA SUPERVIVENCIA
NEURONAL EN CORTEZA CEREBRAL DE RATA CON ISQUEMIA CEREBRAL
FOCAL**

Juan Pablo Castiblanco Salgado

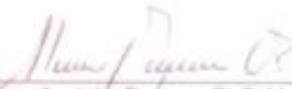
Trabajo de Grado para optar por el título de Químico Farmacéutico

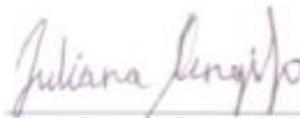
Tutora: Juliana Rengifo Gómez PhD, M Sc.
Co-Tutor: Carlos Fernando Cardozo Hernández

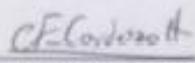
UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
CALI
2017



APROBADO POR:


Álvaro Andrés Bafreza PhD M Sc.
Evaluador


Juliana Rengifo Gómez PhD M Sc.
Tutor del Proyecto.


Carlos Cardozo Hernández Aspirante a PhD
Co-Tutor del Proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi madre, a mi padre, a mi tía Dora, a Andrés, a mi familia en general y a todos mis amigos (Tatiana, Holly y Steven) por su apoyo afectivo en la realización de este proyecto. A mi tutora y co-tutor por su apoyo metodológico, paciencia y por todo el conocimiento transmitido. A la Universidad Icesi y sus docentes por darme las bases para realizar este proyecto y a la fundación gases de occidente por el apoyo económico en la carrera.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUCCIÓN	10
2 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	11
2.1 Planteamiento y justificación del problema	11
2.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	13
2.2.1 Isquemia cerebral	13
2.2.2 Tratamiento de la isquemia cerebral.....	14
2.2.3 Glucosamina.....	15
2.2.4 Modificación postraducciona O-GlcNAc.....	17
2.2.5 Anticuerpos e Inmunohistoquímica.....	18
2.2.6 Software ImageJ.....	19
2.3 OBJETIVOS.....	20
2.3.1 Objetivo General.....	20
2.3.2 Objetivos Específicos	20
2.4 METODOLOGÍA	21
2.4.1 Permisos éticos.	21
2.4.2 Biomodelos y Grupos experimentales	21
2.4.3 Proceso experimental realizado previamente por el laboratorio de fisiología animal.	22
2.4.4 Análisis de imágenes.....	23
2.4.5 Análisis estadístico	23
2.5 RESULTADOS.....	24
2.5.1 Determinación de la supervivencia neuronal.	24
2.5.2 Determinación de la intensidad de O-GlcNAcilación celular.....	25
2.5.3 Análisis de superposición de marcadores anti NeuN y anti O-GlcNAcilación clon RL2.....	26
2.6 Discusión.....	29
2.7 Conclusiones.....	35

2.8	Recomendaciones.....	35
2.9	BIBLIOGRAFÍA	36
3	ANEXOS	39

Lista de figuras

Figura 1.	Mecanismos de muerte celular. Secuencia de eventos celulares causados por la isquemia.....	14
Figura 2.	Representación esquemática de la acción de los activadores fibrinoespecíficos del plasminógeno.....	15
Figura 3.	Estructura de la glucosamina.....	16
Figura 4.	Vía de biosíntesis de las hexosaminas. (GFAT = glutamina:fructosa-6-fosfato aminotransferasa,	16
Figura 5.	Tamaño del infarto evaluado con TTC, reactivo que 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).....	17
Figura 6.	Supervivencia neuronal en un modelo animal de ratas Wistar con isquemia cerebral focal MCAO (Middle cerebral artery occlusion).....	24
Figura 7.	O-GlcNAcilación celular en un modelo animal de ratas Wistar con isquemia cerebral focal MCAO (Middle cerebral artery occlusion).....	25
Figura 8.	O-GlcNAcilación Neuronal en un modelo animal de ratas Wistar con isquemia cerebral focal MCAO (Middle cerebral artery occlusion).....	27

Lista de tablas

Tabla 1. Grupos experimentales.	22
Tabla 2. Resultados de medición de la Supervivencia Neuronal.....	55
Tabla 3. Resultado de la medición de la Densidad óptica de O-GlcNAcilación Celular (Normalizada)	55
Tabla 4. Resultado del conteo de Numero de neuronas vivas con O-GlcNAcilación	55
Tabla 5. Resultado de Porcentaje de Neuronas vivas con O-GlcNAcilación.....	55
Tabla 6. Resultado de la medición de la Densidad óptica de O-GlcNAcilación Neuronal (Normalizada).	56
Tabla 7. Resultado de la medición de la Densidad óptica de O-GlcNAcilación en células no neuronales (Normalizada).	56

RESUMEN

Los accidentes cerebrovasculares (ACV) son la tercera causa de muerte en Colombia y una de las primeras en el mundo, estos accidentes se dan por una obstrucción, ya sea por un trombo o embolo, o por una hemorragia. Su tratamiento farmacológico actual se basa en el uso de un agente trombolítico llamado activador tisular del plasminógeno el cual busca generar la reperfusión de la zona obstruida y así reestablecer el flujo de oxígeno y glucosa, este tratamiento solo actúa entre las 3 o 4 horas posteriores al ictus isquémico y por ello algunas investigaciones buscan tratamientos que busquen otro mecanismo, la neuroprotección. La investigación de tratamientos neuroprotectores se basa en el área de penumbra pues después del ictus isquémico esta área tiene un proceso de muerte más lento que el del foco isquémico. Basados en lo anterior, este estudio evaluó el efecto del tratamiento con glucosamina previo a inducción de isquemia mediante el análisis imágenes de inmunohistoquímica de fluorescencia de microscopía con focal obtenidas de la corteza cerebral de un modelo animal de rata Wistar con isquemia cerebral focal MCAO (Middle cerebral artery occlusion). Los resultados obtenidos indican que al administrar un tratamiento con glucosamina (200mg/Kg) previo a inducción de isquemia existe un aumento en la supervivencia neuronal post-isquemia tanto en los grupos con isquemia permanente como en los grupos con isquemia transitoria, siendo en este último más cercana al control fisiológico. Además, los resultados muestran que este aumento en la supervivencia neuronal puede estar asociado a una menor tasa de disminución de la O-GlcNAcilación (en los grupos con tratamiento con glucosamina con respecto a los que no tuvieron este tratamiento) de algunas proteínas en los grupos tratados con glucosamina.

Palabras clave: Isquemia, reperfusión, supervivencia neuronal, O-GlcNAcilación, inmunohistoquímica de fluorescencia.

ABSTRACT

Strokes are the third cause of death in Colombia and one of the first in the world, these accidents are due to an obstruction, either thrombotic or embolic, or by a hemorrhage. Its current pharmacological treatment is based on the use of a thrombolytic agent called tissue plasminogen activator which seeks to generate the reperfusion of the obstructed zone and thus reestablish the flow of oxygen and glucose, this treatment only acts between 3 or 4 hours after Ischemic stroke and therefore some research looks for treatments that seek another mechanism, neuroprotection. The investigation of neuroprotective treatments is based on the penumbra area because after the ischemic stroke this area has a slower death process than that of the ischemic focus. Based on the above, this study evaluated the effect of glucosamine treatment prior to induction of ischemia by analyzing fluorescence immunohistochemistry images of focal microscopy obtained from the cerebral cortex of a Wistar rat animal model with focal cerebral ischemia MCAO (Middle Cerebral artery occlusion). The results obtained indicate that the administration of a treatment with glucosamine (200 mg / kg) prior to induction of ischemia, there is an increase in post-ischemia neuronal survival in the groups with permanent ischemia and in the groups with transient ischemia, closer to physiological control. In addition, the results show that this increase in neuronal survival may be associated with a lower decrease rate in O-GlcNAcylation (in glucosamine treated groups relative to those who did not have this treatment) of some proteins in the glucosamine-treated groups.

Key words: Ischemia, reperfusion, neuronal survival, O-GlcNAcylation, immunohistochemistry of fluorescence.

1 INTRODUCCIÓN

La enfermedad cerebrovascular es una de las principales causas de muerte en Colombia y en el mundo y tiene una incidencia amplia en poblaciones adultas que poseen factores de riesgo cerebrovasculares previos como hipertensión, diabetes y niveles bajos de HDL (lipoproteína de alta densidad por sus siglas en inglés). Se caracteriza por afectar en mayor medida a los hombres y a las personas afroamericanas.(Observatorio Nacional de Salud, 2015)

La fisiopatología de esta enfermedad se desencadena de una falta de suministro de azúcar y oxígeno a una zona determinada del cerebro y por tanto se genera un ictus isquémico que posteriormente puede generar o no alguna discapacidad o la muerte dependiendo de su gravedad. Las vías de señalización involucradas en este proceso son bien conocidas al igual que los mediadores del proceso, pero a pesar de esto las investigaciones que buscan tratamientos que sean efectivos para este tipo de accidentes cerebrovasculares no han dado fructuosos resultados dejando como única opción el limitado tratamiento con un agente trombolítico (Montaner, 2007)(Shi et al., 2015).

Dado que en el lugar ictus isquémico se reconocen dos principales zonas de afectación, el área de penumbra y el foco isquémico, y que en la primera de estas la muerte neuronal no es inmediata, sino que deriva de la falta de oxígeno y la subsiguiente activación de vías apoptóticas por la obstrucción en el foco isquémico, hoy las investigaciones van dirigidas al área de penumbra y buscan aumentar la supervivencia neuronal en ella (Shi et al., 2015).

De acuerdo a lo anterior, algunas investigaciones en cardiomiocitos sugieren que el tratamiento con glucosamina ejerce un efecto citoprotector ante una lesión Isquemia-Reperusión y que esto se debe, en parte, al aumento de la O-GlcNacilación en algunas proteínas y al aumento de Bcl-2 mitocondrial entre otros mecanismos (Champattanachai, Marchase, & Chatham, 2008). Adicionalmente, se han reportado efectos positivos de la Glucosamina sobre la supervivencia neuronal ante estrés isquémico.(Hwang et al., 2010)

Por lo anterior el grupo Natura se ha involucrado en una investigación que busca la recuperación de las células de la penumbra y para ello ha realizado estudios con glucosamina. En este contexto, este proyecto busca involucrarse en esta investigación macro a través de la búsqueda de una relación entre el tratamiento con glucosamina con los niveles de glicosilación tipo O-GlcNAc y la supervivencia neuronal postisquémica en un modelo animal de ratas Wistar con oclusión de la arteria cerebral media.

2 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1 Planteamiento y justificación del problema

La enfermedad cerebrovascular es uno de los fenómenos cerebrales que acosan en mayor medida a la población mundial y de los que cobran más vidas en países tanto del tercer como primer mundo. Esta se caracteriza por la muerte de una zona del cerebro conocida como foco isquémico que genera, dependiendo de su tamaño, una gran probabilidad de muerte o de aparición de alguna discapacidad.

En el 2014 el Instituto Nacional de Salud (INS) informó que en Colombia la Enfermedad cerebrovascular tiene una prevalencia que oscila entre 0,18% y 0,24% y además que existe una mortalidad de aproximadamente 19.7 por cada 100.000 habitantes, es decir que esta enfermedad se posiciona en el país como una de las primeras causas de muerte después de la violencia y la cardiopatía (Observatorio Nacional de Salud, 2015).

Por lo anterior se podría decir que este tipo de enfermedad es un problema de salud pública y por esto, las investigaciones en torno a ella han tomado gran importancia. Además de lo anterior, el tratamiento que se tiene para esta no es preventivo y solo funciona en las primeras 3 horas después del ictus isquémico. Lo anterior genera la necesidad de buscar diferentes moléculas que puedan actuar en un mayor tiempo y, además, de manera preventiva en las poblaciones de riesgo, actuando a nivel molecular y disminuyendo la muerte neuronal post-isquémica en el área de penumbra; contribuyendo de esta manera a la disminución de las tasas de mortalidad e incapacidad en los pacientes que presenten este tipo de eventos isquémicos. (Lorenzo Fernández, 2008)

En este contexto, de acuerdo a autores como Hwang, Champattanachai y Wu, la glucosamina (2-amino-2-desoxi-d-glucosa, GlcN) está involucrada en las vías moleculares que intervienen en los momentos de estrés celular en el proceso de la isquemia y por tanto realizar análisis que la involucren, representa una gran importancia para el desarrollo investigativo de Colombia y claramente de la Universidad Icesi (Hwang et al., 2010)(Wu et al., 2009)(Champattanachai et al., 2008). A partir de esto, en el grupo de investigación de Fisiología Animal adscrito al grupo Natura de la Universidad Icesi, se ha desarrollado durante los últimos años una investigación encabezada por Juliana Rengifo que profundiza en diferentes proteínas, las modificaciones postraduccionales que ellas sufren durante la isquemia y el papel que la glucosamina puede desempeñar en cada una de estas vías, para con esto elucidar algún mecanismo de neuroprotección útil que permita actuar ante la isquemia cerebral.

De acuerdo a lo anterior y con el propósito de aportar al entendimiento del efecto del tratamiento preventivo con glucosamina en la supervivencia neuronal post-

isquémica, este proyecto busca determinar si el tratamiento preventivo con glucosamina ejerce un efecto neuroprotector mediado por la glicosilación tipo O-GlcNAc en la corteza cerebral ante ataques isquémicos y por tanto sí este tiene la posibilidad de ser un tratamiento preventivo.

2.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

2.2.1 Isquemia cerebral

La isquemia cerebral es una condición que ocurre cuando hay un flujo sanguíneo insuficiente al cerebro que no satisface su demanda metabólica, lo que conduce a un suministro de oxígeno pobre y a menudo, a infarto cerebral o accidente cerebrovascular isquémico (Arango-Davila, Escobar-Betancourt, Cardona-Gómez, & Pimienta-Jiménez, 2004). Esta disminución del flujo sanguíneo se da debido a la obstrucción aguda de una de las mayores arterias cerebrales (como la arteria cerebral media (ACM)); no es uniforme en el área afectada y puede variar en poco tiempo y más aún cuando se instaura la reperfusión. (Shi et al., 2015)

Este tipo de accidente cerebrovascular se caracteriza por tener dos áreas de afectación, el foco isquémico y el área de penumbra. La diferencia entre estas dos zonas es que la isquemia se torna grave en el denominado foco isquémico, mientras que en la periferia (área de penumbra), la disminución del flujo es menos grave, gracias a los aportes sanguíneos de las colaterales arteriales del tejido adyacente no isquémico.(Shi et al., 2015). Esta última área puede comprender hasta la mitad del volumen total de la lesión durante las etapas iniciales de la isquemia y representa la región en la que existe la oportunidad de salvamento mediante la terapia post-isquemia. Algunas investigaciones han revelado que muchas neuronas en la penumbra isquémica o zona periinfarto pueden sufrir apoptosis después de varias horas o días, y por lo tanto son potencialmente recuperables durante algún tiempo después de la aparición de un accidente cerebrovascular. (Broughton, Reutens, & Sobey, 2009)

Al cesar la obstrucción se da un proceso de incremento del flujo sanguíneo ocasionado por metabolitos vasoactivos, disminución de la viscosidad de la sangre y mecanismos vasodilatadores neurogénicos. Este proceso anterior es conocido como hiperemia postisquémica y va seguida por una hipoperfusión postisquémica que genera las áreas necróticas y que es causada por la obstrucción microvascular y por vasoparálisis, a las cuales contribuyen factores como la coagulación intravascular, la obstrucción microvascular por edema de podocitos, el edema endotelial y obstrucción venosa. (Arango-Davila et al., 2004)

Durante la isquemia se da la muerte celular ya sea por necrosis o por apoptosis. La necrosis es fruto del fracaso energético agudo y genera pérdida de la morfología celular y lisis con desencadenamiento de procesos inflamatorios. La apoptosis, por su parte, se da por activación de mecanismos celulares dependientes de energía que llevan a una degradación regulada de la célula que posteriormente es digerida por fagocitos, en este caso no se desencadena reacción inflamatoria.(Arango-Davila et al., 2004) (**Figura 1**).

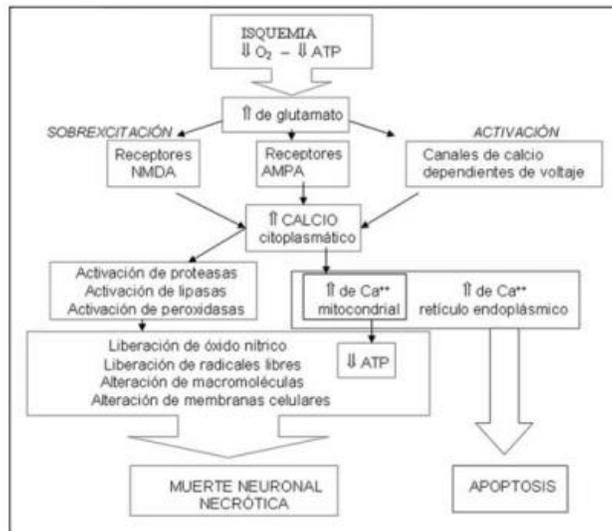


Figura 1. Mecanismos de muerte celular. Secuencia de eventos celulares causados por la isquemia. Se destaca el incremento de calcio intracelular en ambos mecanismos de muerte y el aumento de glutamato como activador de los mecanismos.(Arango-Davila et al., 2004)

2.2.2 Tratamiento de la isquemia cerebral

A pesar de la importancia del accidente cerebrovascular isquémico, hoy solo se cuenta con un tratamiento para esta, un agente trombolítico, el activador tisular del plasminógeno (**Figura 2**)(Lorenzo Fernández, 2008)(Montaner, 2007). Este tratamiento es limitado pues solo actúa hasta cuatro horas después del ictus isquémico y a pesar de esto y los avances tecnológicos y las múltiples moléculas con posible habilidad para actuar en este problema, los ensayos clínicos han fracasado (Montaner, 2007).

El objetivo de este tratamiento es la restauración de la perfusión, pero a pesar de que este proceso es necesario para reestablecer el flujo de oxígeno y nutrientes en el área afectada, algunas investigaciones sugieren que este puede exacerbar los daños causados por la isquemia *per se* y generar daños tisulares en órganos lejanos. En este contexto y a pesar de ser un proceso complejo, se ha sugerido que algunos de los mecanismos por los cuales se puede dar este daño implican lo siguiente (Kalogeris, Baines, Krenz, & Korthuis, 2012):

- Generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) que se alimenta por la reintroducción del oxígeno molecular cuando se restablece el flujo sanguíneo
- Sobrecarga de calcio
- Apertura del poro de Transición de Permeabilidad Mitocondrial (MPT)
- Disfunción endotelial

- Aparición de un fenotipo protrombogénico,
- Respuestas inflamatorias pronunciadas por la liberación de neutrófilos pro-inflamatorios al torrente sanguíneo.

Por lo anterior es ideal acelerar cada vez más la investigación en nuevos tratamientos y buscar otra opción de tratamiento podría ser una que cumpliera una función neuroprotectora, cuya función sería prevenir el desarrollo de complicaciones y la limitación de la lesión cerebral generada por la isquemia. Este tratamiento podría actuar en el área de penumbra pues a pesar de que sus células están funcionalmente inactivas, aún son viables; cabe resaltar que si no actúa, estas células pueden perder viabilidad en cuestión de minutos u horas (dependiendo el tamaño y gravedad de la lesión) debido a diferentes cascadas apoptóticas activadas por la isquemia. (Lorenzo Fernández, 2008)

Los tratamientos neuroprotectores aún no tienen éxito investigativo, pero actualmente se realizan diferentes investigaciones académicas enfocadas en proteínas, modificaciones postraduccionales y cascadas de señalización que puedan estar involucradas en la enfermedad cerebrovascular.

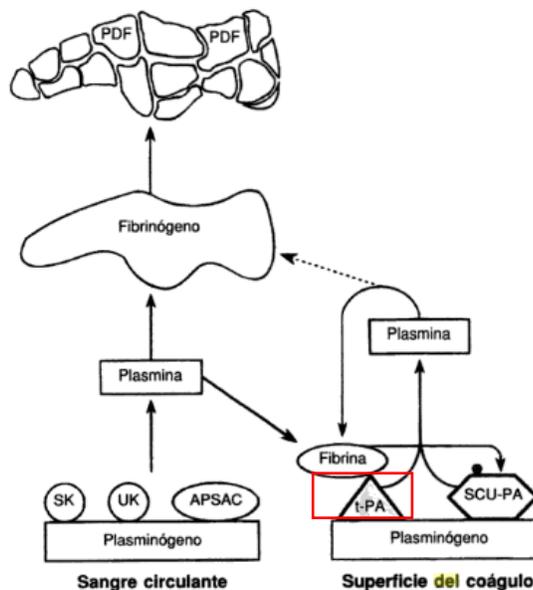


Figura 2. Representación esquemática de la acción de los activadores fibrinoespecíficos del plasminógeno.

2.2.3 Glucosamina

La glucosamina (2-amino-2-desoxy-D-glucosa; GlcN) (**Figura 3**) es un azúcar natural sintetizado a partir de la glucosa por prácticamente todas las células, es un componente esencial de glicoproteínas y proteoglicanos y además, es un

componente importante de la vía de la biosíntesis de las hexosaminas (**Figura 4**), en la cual se da la síntesis de los precursores de glicoproteína UDP-N-acetil-GlcN (UDP-GlcNAc) y UDPN-acetil-galactosamina (UDP-GalNAc)(Hwang et al., 2010).

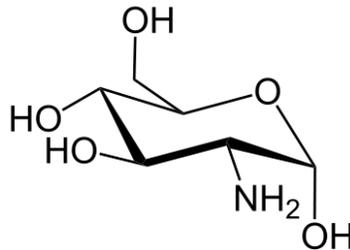


Figura 3. Estructura de la glucosamina.

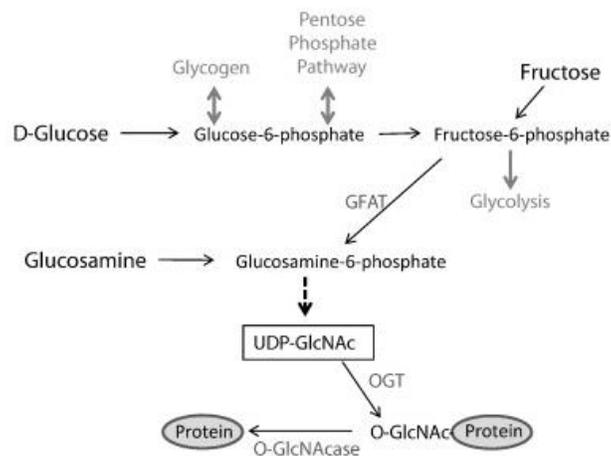


Figura 4. Vía de biosíntesis de las hexosaminas. (GFAT = glutamina:fructosa-6-fosfato aminotransferasa, La enzima que controla el flujo de glucosa en la HBP. OGT = O-linked N-acetilglucosamina transferasa, la enzima que transfiere una única N-acetilglucosamina por enlace O-glicosídico (O-GlcNAc) a residuos de serina o treonina de proteínas. O-GlcNAcase = la enzima que invierte la modificación de la proteína O-GlcNAc). (Harris & Apolzan, 2015)

En términos de su uso como medicamento, el sulfato de glucosamina es utilizado en una dosis oral de 1500mg para la disminución del dolor y retrasar la progresión estructural de la artritis reumatoide.(Reginster, Bruyere, Fraikin, & Henrotin, 2005).

Hace algunos años la administración de glucosamina a cardiomiocitos aislados y sometidos a isquemia y reperfusión se asoció con citoprotección, ya que se evidenció un aumento en el producto final de la vía de las hexosaminas, el UDP-GlcNAc, un sustrato obligatorio para la transferencia de O-GlcNAc a proteínas por la O-GlcNAc transferasa. (Liu et al., 2006) (Love & Hanover, 2005). Otros estudios

han demostrado que la glucosamina también actúa como neuroprotector en isquemia cerebral en ratas al ser administrado de forma intraperitoneal. Adicionalmente, se relaciona con la disminución de la inflamación ya que modula el factor nuclear KappaB (NF- κ B) inducido por la interleuquina (IL) -1b y también inhibe la producción de óxido nítrico (NO) inducida por lipopolisacárido (LPS) en macrófagos RAW264.7 y microglía. (Hwang et al., 2010).

Adicionalmente el laboratorio de Fisiología Animal ha realizado algunas investigaciones con respecto a la glucosamina y su efecto en isquemia, los resultados obtenidos evidenciaron una disminución en el tamaño del infarto de un 50% (**Figura 5**), generando así un amplio campo de investigación para conocer las diferentes vías celulares implicadas en proceso de aumento de la supervivencia celular ante isquemia (Vera González, 2016).

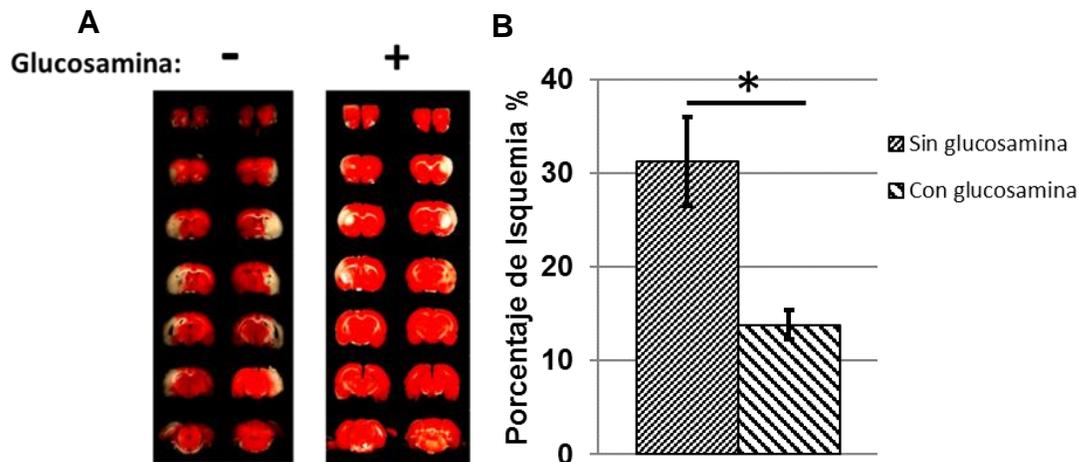


Figura 5. Tamaño del infarto evaluado con TTC, reactivo que destaca en blanco el tejido muerto que no se tiñe de rojo, a las 24 horas de inducida la isquemia en el modelo de isquemia cerebral focal en ratas Wistar MCAO (Middle cerebral artery occlusion). (A) Cortes coronales de cerebro de ratas a las que se les indujo isquemia con reperfundición, sin tratamiento de glucosamina (izquierda) y con una dosis única intraperitoneal de 200 mg/Kg de glucosamina media hora antes de inducida la isquemia (derecha). (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) (Vera González, 2016).

2.2.4 Modificación postraduccional O-GlcNAc

La modificación de proteínas con N-acetilglucosamina ligada a O (O-GlcNAc) se reporta como una importante modificación postraduccional que modula la función celular ya que algunos estudios recientes sugieren que el aumento de los niveles

de O-GlcNAc aumenta la supervivencia celular después del estrés (Wu et al., 2009). En este contexto es importante mencionar que las diferentes isoformas de las enzimas del metabolismo de O-GlcNAc permiten la participación de O-GlcNAc en diversas funciones intracelulares. (Love & Hanover, 2005)

La adición y eliminación de N-acetilglucosamina (O-GlcNAc) ligada a O en los residuos de serina y treonina está emergiendo como un regulador clave de la actividad proteica, tanto en proteínas nucleares como citoplasmáticas, pues al igual que la fosforilación, la glicosilación tipo O-GlcNAc altera dramáticamente el destino postraduccional y la función de las proteínas diana. Adicionalmente se conoce que la transferencia de O-GlcNAc es el paso terminal en la "vía de señalización de hexosamina" (HSP) donde los niveles de uridina 5'-difosfato (UDP)-GlcNAc responden al exceso de nutrientes para activar O-GlcNAcificación, y donde la eliminación de O-GlcNAc también puede estar bajo regulación metabólica similar. (Love & Hanover, 2005)

Adicionalmente, como se mencionó en la sección anterior, se ha reportado que la glucosamina está asociada a neuroprotección y citoprotección al integrarse en la vía de las hexosaminas y aumentar la obtención de su producto mayoritario que es sustrato para la encima OGT que adiciona el monómero de N-Acetil Glucosamina a las proteínas. Este proceso de O-GlcNAcificación está asociado con neuro y citoprotección debido a que aumenta la producción de proteínas antiapoptóticas Bcl-2, aumenta la expresión de las proteínas de choque térmico y además atenúa las respuestas a estrés mediadas por calcio. (Champattanachai et al., 2008)

2.2.5 Anticuerpos e Inmunohistoquímica

2.2.5.1 Anticuerpos anti NeuN

La proteína NeuN (Neural Nuclear protein) está localizada en el núcleo y en el citoplasma perinuclear en la mayoría de neuronas en el sistema nervioso central de los mamíferos, esta proteína no ha sido detectada en células gliales y por eso desde hace algunos años se establece como un importante objetivo de anticuerpos monoclonales para evaluar el estado de las neuronas en estados normales o de patología (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015)(Wolf et al., 1996).

Es importante tener en cuenta que las células de Cajal-Retzius en el neocórtex, algunas células cerebelosas (incluyendo células de Purkinje), neuronas de olivo inferior, células de la capa nuclear interna de la retina, las neuronas motoras y en la médula espinal y las células ganglionares de la cadena simpática no son inmunohistoquímicamente teñidos con anticuerpos contra NeuN (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015).

Además de lo anterior, es de especial importancia tener en cuenta que las diferencias en la intensidad de la reacción del anticuerpo con la proteína NeuN reflejan las diferencias en la expresión de esta proteína en una célula, que están asociados tanto con las características constitutivas de la neurona como con su estado funcional, específicamente en este último ámbito se dice que cuando una célula no presenta marcaje con este anticuerpo se debe a estados de estrés o muerte celular (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015).

2.2.5.2 Anticuerpos anti O-GlcNAcilación clon RL2

El anticuerpo RL2 es un anticuerpo monoclonal que proviene del ratón, este identifica el monosacárido Glc unido en conformación O a la serina y treonina de algunas glicoproteínas, es así como detecta una gran variedad de proteínas O-GlcNAciladas, entre estas 8 glicoproteínas del complejo del poro nuclear de aproximadamente 210, 180, 145, 100, 63, 58, 54 y 45 kDa. Se ha utilizado con éxito en una amplia variedad de células de mamífero (humano, rata y ratón) y en proteína de virus O-GlcNAciladas. El marcaje se produce en el NPC (Complejo nuclear del poro sus siglas en ingles), con la mayor parte del etiquetado en los márgenes citoplasmáticos y/o nucleoplasmáticos, así como dentro del núcleo pues es allí donde se encuentran los monosacáridos GlcNAc (Thermofisher, 2016).

2.2.6 Software ImageJ

ImageJ es un software de análisis digital de imágenes desarrollado por el NIH (National Institutes of Health). Es de dominio público y, además, una de las herramientas sin costo más utilizadas en la investigación biomédica y en la práctica clínica. Esta es de especial uso en el análisis de intensidades de señales pues cuenta con herramientas de sustracción de fondo y conteo de partículas y también es de gran utilidad en los análisis de doble marcaje, pues permite realizar superposiciones cualitativas utilizando amplias gamas de color. Sin embargo, al igual que con todas las herramientas de análisis, esta puede ser mal utilizada, por ello es importante que los investigadores comprendan los diferentes plugins antes de seleccionarlos y usarlos (Collins, 2007).

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 Objetivo General

Determinar, para junio de 2017, el efecto del tratamiento con glucosamina sobre la supervivencia neuronal en corteza cerebral en un modelo animal de ratas Wistar a través de inmunohistoquímica de fluorescencia.

2.3.2 Objetivos Específicos

1. Establecer un protocolo a través del software ImageJ para medir intensidades de una señal, número de células y para hacer análisis de superposición.
2. Cuantificar tanto la intensidad de fluorescencia de RL2, que da información de la glicosilación tipo O-GlcNAc, como la supervivencia neuronal por medio de la señal de NeuN utilizando el software de análisis de imágenes de fluorescencia ImageJ entre los diferentes grupos estudiados.
3. Determinar si existe asociación entre el tratamiento con glucosamina, el nivel de fluorescencia de RL2 y el número de neuronas detectadas por NeuN en corteza cerebral después de la inducción de isquemia.

2.4 METODOLOGÍA

En este proyecto se analizaron imágenes de inmunohistoquímica de fluorescencia de corteza cerebral de rata Wistar obtenidas mediante microscopio confocal. Para la obtención de las imágenes el laboratorio de Fisiología Animal de la Universidad Icesi realizó una serie de procedimientos con el fin de conocer el efecto del tratamiento previo a inducción de isquemia con glucosamina. (Cardozo Hernández, 2013).

2.4.1 Permisos éticos.

Para lo anterior el grupo de investigación contó con la aprobación del comité de ética de investigación en animales experimentales. Esta aprobación se dio para realizar tres estudios, entre ellos para la “*Evaluación de los fenómenos de glicosilación y sus implicaciones terapéuticas en un modelo experimental de excitotoxicidad, isquemia y reperfusión cerebral*”, del cual se obtienen las imágenes estudiadas. **Ver Anexo 4. Carta de aprobación del comité de ética.**

2.4.2 Biomodelos y Grupos experimentales

Los biomodelos fueron ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) de 12±2 meses de edad y peso de 325±45 gramos. Estos fueron mantenidos en el bioterio de la Universidad Icesi y su asignación a cada grupo experimental fue aleatoria.

Para definir el papel de la glicosilación de proteínas tipo O-GlcNAc en los mecanismos de supervivencia o muerte celular, se planteó la asignación de grupos experimentales con n=3 (tres individuos de cada grupo y tres imágenes de cada individuo) y con sobrevida a 6 horas como sigue (**Tabla 1**):

- (A) Isquemia sin reperfusión.
- (B) Isquemia con reperfusión a los 90 minutos.
- (C) Isquemia sin reperfusión y tratamiento con glucosamina.
- (D) Isquemia con reperfusión a los 90 minutos y tratamiento con glucosamina.

Los grupos control fueron sometidos a todo el procedimiento quirúrgico, pero no se insertó el monofilamento:

- (E) Control sin isquemia con glucosamina.
- (F) Control sin isquemia y sin glucosamina.

Tabla 1. Grupos experimentales.

Glucosamina	-			+		
Isquemia	-	+		-	+	
Reperfusión	-	-	+	-	-	+
Grupo	F	A	B	E	C	D

2.4.3 Proceso experimental realizado previamente por el laboratorio de fisiología animal.

Se indujo anestesia con isoflurano hasta observar ausencia de reflejos de dolor. Posteriormente se realizó el procedimiento quirúrgico bajo el modelo de Oclusión de la arteria cerebral media (de acuerdo al procedimiento descrito por Belayev et al. (1999)) con mejoras implementadas en el laboratorio de Fisiología Celular Animal de la Universidad Icesi. Durante el proceso se monitorizaron los biomodelos en cuanto a temperatura, presión arterial, frecuencia cardíaca y actividad respiratoria. Después de la recuperación de anestesia se realizó una evaluación de las funciones sensomotoras del biomodelo (test desarrollado por Garcia et al. (1995)), el puntaje obtenido en esta evaluación debía estar entre 6 y 16 y se utilizó como criterio de inclusión o exclusión pues permitía verificar si la isquemia fue adecuada o no.

A los biomodelos de los grupos con tratamiento con glucosamina (C, D y E) se les aplicó una dosis única vía intraperitoneal de 200 mg/Kg y a los grupos control (A, B y F) solución salina al 0,9 % (placebo) 60 minutos antes de realizar la isquemia.

La perfusión se realizó tras 6 horas del inicio de la isquemia se perfundió con 180 ml de solución salina al 0,9 % seguido de 180 ml de paraformaldehído-lisina-peryodato (PLP), posteriormente se realizó la extracción de cerebros y se realizaron cortes coronales en vibratomo (Leica VT1000) cada 50 μ m.

Los cortes se guardaron en solución anticongelante (PBS-Sacarosa-etilenglicol 40:30:30) a -20°C . Se realizaron lavados de cada corte con solución salina tamponada (PBS) (3 veces por 5 minutos), posteriormente se permeabilizaron por 30 minutos en solución PBST (PBS-Tween20 0,5 %). Luego se lavó para posteriormente realizar bloqueo con albumina de suero bovino al 1% en PBTS (60 minutos, agitación constante). La albumina se retiró y sin lavar se agregó 400 μ L de solución de los dos anticuerpos primarios, el Anticuerpo monoclonal anti-NeuN de conejo (1:100; Clon A60; Millipore, No. de catálogo ABN78) para marcaje neuronal y Anticuerpo monoclonal RL2 (1:100; Thermo Scientific, No de catálogo MA1-072) para O-GlcNAcilación; se realizó el lavado de estos anticuerpos y posteriormente se adicionaron los anticuerpos secundarios AlexaFluor488 anti-conejo y

alexafluor555 anti-ratón (ambos de Molecular probes) en PBST por 60 min a temperatura ambiente y en la oscuridad.

2.4.4 Análisis de imágenes

Con el fin de obtener la información de interés se analizaron mediante el software ImageJ las imágenes recibidas de microscopía con focal (aumento de 10X) de los anticuerpos anti -NeuN y Anti O-GlcNAcilación clon RL2. Para esto primero se realizó una limpieza del fondo de la imagen con el fin de eliminar el ruido de fondo y las partículas que generan interferencia al software y, además, se realizó la separación de las células que se encontraban pegadas entre sí con el fin de realizar un análisis más exacto. Posteriormente se realizó un conteo de neuronas vivas (Marcador Anti NeuN) y se determinó el promedio de intensidad de O-GlcNAcilación (Marcador Anti O-GlcNAcilación clon RL2). Para finalizar se realizó la superposición de las máscaras de color obtenidas en los puntos anteriores, determinando el número de neuronas y células no neuronales O-GlcNAcizadas y posteriormente la intensidad promedio de esta modificación postraduccional para cada ambos tipos de células.

NOTA: La metodología de análisis de imágenes será descrita a profundidad en los protocolos de uso de software en los **Anexos 1 y 2**.

2.4.5 Análisis estadístico

Las comparaciones de interés a analizar fueron FvsE, BvsD, AvsC, FvsD y FvsC. El tratamiento estadístico de los datos se realizó bajo la suposición de no distribución normal de los datos debido al número de individuos en el estudio ($n=3$), por esto se realizó la prueba estadística Kruskal-Wallis para determinar si existe diferencia en las medianas de los grupos analizados y posteriormente la prueba de Mann Whitney para realizar las comparaciones en los pares de interés, para determinar si existían diferencias significativas en ambas pruebas se asumió como criterio un valor $p<0,05$. **Ver Anexos 3 (Tablas de Resumen de Resultados) y 4 (Análisis estadístico).**

Ver Anexo 5. Matriz de marco lógico.

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Determinación de la supervivencia neuronal.

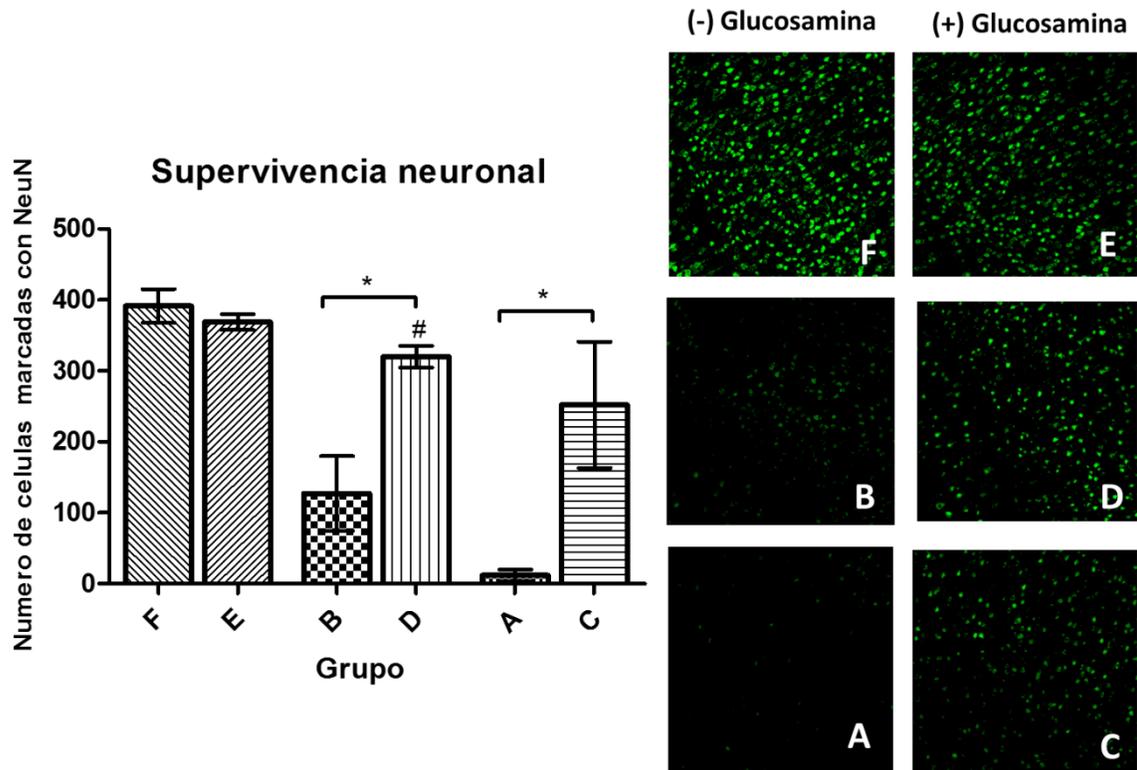


Figura 6. Supervivencia neuronal en un modelo animal de ratas Wistar con isquemia cerebral focal MCAO (Middle cerebral artery occlusion). Grafica con el número de Neuronas identificadas con NeuN en 6 grupos de tratamiento; Control fisiológico (F), Control fisiológico + Glucosamina (E), Isquemia transitoria (B), Isquemia transitoria + Glucosamina (D), Isquemia permanente (A), Isquemia permanente + Glucosamina (C). Los datos son presentados como promedio \pm SEM (Error estándar de la media por sus siglas en inglés) con un $n=3$ ratas por grupo. * $p<0,05$ y # $p<0,05$ vs F. Imágenes representativas de los grupos experimentales, aumento 10X.

En la figura 6 se encuentra una diferencia en el promedio de neuronas al comparar todos grupos de tratamiento (Kruskal-Wallis $p<0.05$). Por otra parte, al realizar la comparación de los grupos de interés se observa que en los grupos control, que simulan la condición fisiológica (F y E), no existe una diferencia en el promedio del número de neuronas vivas ($p=0,3500$, Mann Whitney y $p<0.05$), mientras que en los grupos con isquemia transitoria (B y D) e isquemia permanente (A y C) si se observan diferencias entre los grupos con tratamiento y los que no lo tienen. Estas diferencias se caracterizan por un número mayor de neuronas vivas en los grupos

con tratamiento con glucosamina en ambos casos ($p=0,0500$ tanto para BvsD como para AvsC, Mann Whitney y $p<0.05$). Adicionalmente se observa una diferencia entre el grupo control fisiológico con respecto al grupo con isquemia transitoria con tratamiento (F y D) ($p=0,0500$, Mann Whitney y $p<0.05$), mientras que no existe entre este mismo control y el grupo con isquemia permanente con glucosamina (F y C) ($p=0,2000$, Mann Whitney y $p<0.05$)

2.5.2 Determinación de la intensidad de O-GlcNAcilación celular.

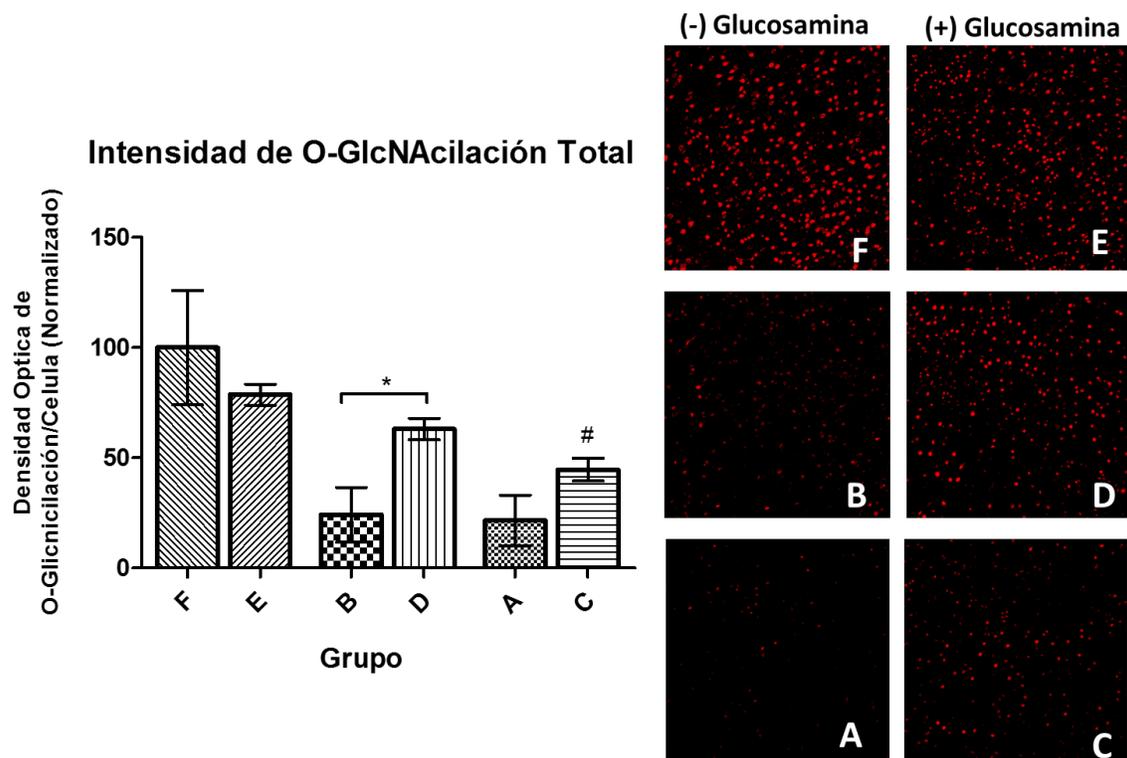


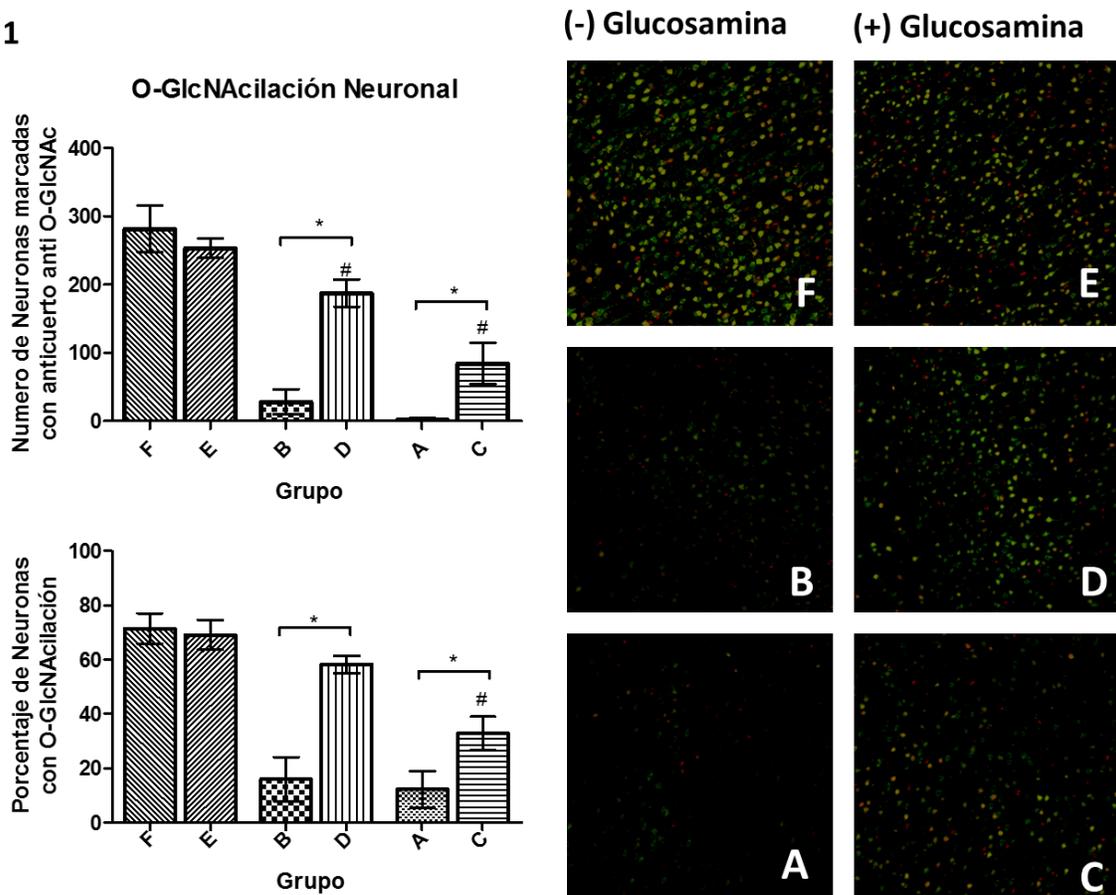
Figura 7. O-GlcNAcilación celular en un modelo animal de ratas Wistar con isquemia cerebral focal MCAO (Middle cerebral artery occlusion). Intensidad de O-GlcNAcilación celular en 6 grupos de tratamiento; condición fisiológica (F), condición fisiológica + Glucosamina (E), Isquemia transitoria (B), Isquemia transitoria + Glucosamina (D), Isquemia permanente (A), Isquemia permanente + Glucosamina (C). Los datos son presentados como promedio \pm SEM (Error estándar de la media por sus siglas en inglés) con un $n=3$ ratas por grupo. * $p<0,05$ y # $p<0,05$ vs F. Imágenes representativas de los grupos experimentales, aumento 10X.

En la figura 7 se encuentra que hay una diferencia en el promedio de la densidad óptica de la O-GlcNAcilación por célula al comparar todos los grupos de tratamiento (Kruskal-Wallis $p<0.05$). Por otra parte, al realizar las comparaciones

en los pares de interés se observa que hay diferencia entre el grupo con isquemia transitoria y su homólogo con tratamiento con glucosamina (B y D) ($p=0,0500$, Mann Whitney y $p<0.05$), mientras que para los grupos con isquemia permanente y grupos control que simulan la condición fisiológica y sus homólogos con tratamiento, no se obtuvo diferencias (AvsC $p=0,1000$ y FvsE $p=0,5000$; Mann Whitney y $p<0.05$). Adicionalmente se observa que existe una diferencia entre el grupo control fisiológico con el grupo con isquemia permanente con glucosamina (F y C) ($p=0,0500$, Mann Whitney y $p<0.05$) mientras que no existe diferencia entre el grupo con isquemia transitoria y este mismo control (F yD) ($p=0,2000$, Mann Whitney y $p<0.05$).

2.5.3 Análisis de superposición de marcadores anti NeuN y anti O-GlcNAcilación clon RL2.

1



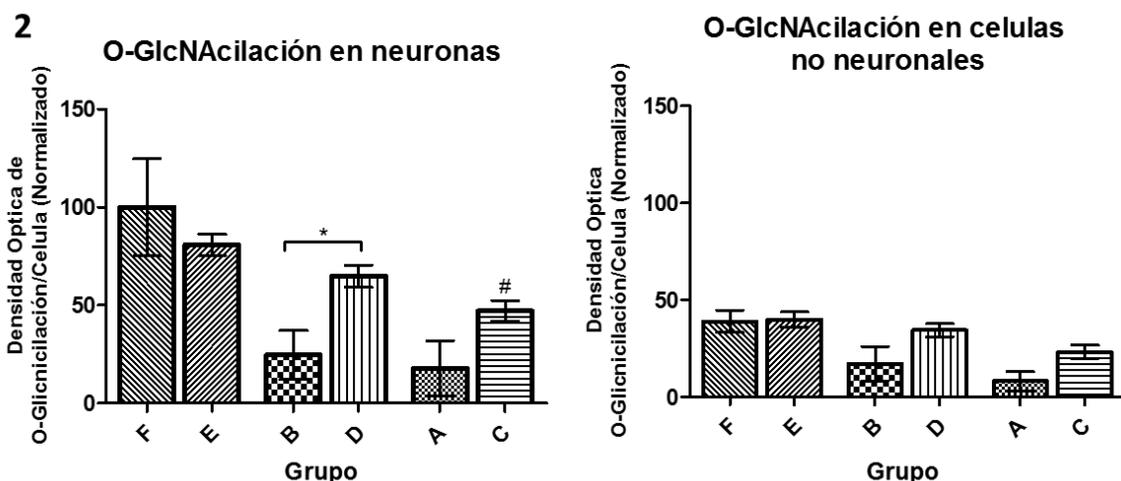


Figura 8. O-GlcNAcilación celular en un modelo animal de ratas Wistar con isquemia cerebral focal MCAO (Middle cerebral artery occlusion). 1. Análisis de superposición de anticuerpos anti NeuN y anti O-GlcNAcilación en 6 grupos de tratamiento. 2. Análisis de intensidad de O-GlcNAcilación en células neuronales y no neuronales. Grupos: Condición fisiológica (F), condición fisiológica + Glucosamina (E), Isquemia transitoria (B), Isquemia transitoria + Glucosamina (D), Isquemia permanente (A), Isquemia permanente + Glucosamina (C). Los datos son presentados como promedio \pm SEM (Error estándar de la media por sus siglas en inglés) con un $n=3$ ratas por grupo. * $p<0,05$ y # $p<0,05$ vs F. Imágenes representativas de los grupos experimentales, aumento 10X.

En la **Figura 8.1** se muestra una diferencia en el número promedio de neuronas con O-GlcNAcilación al comparar todos los grupos de tratamiento y de igual manera para el porcentaje promedio de neuronas con O-GlcNAcilación (Kruskal-Wallis $p<0.05$). Por otra parte, al realizar las comparaciones entre los pares de interés se obtuvo diferencia significativa entre el grupo con isquemia transitoria y su homólogo con tratamiento con glucosamina en ambas gráficas ($p=0,0500$, Mann Whitney y $p<0.05$), igualmente para el grupo con isquemia permanente y su homólogo con tratamiento se obtuvo una diferencia significativa en ambas graficas ($p=0,0500$ y $p=0,0383$ para el número de células con O-GlcNAcilación y porcentaje de neuronas con O-GlcNAcilación respectivamente, Mann Whitney y $p<0.05$), mientras que para los grupos control que simulan la condición fisiológica no se obtuvo una diferencia significativa ($p=0,3500$ y $p=0,5000$ para el número de células con O-GlcNAcilación y porcentaje de neuronas con O-GlcNAcilación respectivamente, Mann Whitney y $p<0.05$). Adicionalmente, se observa que existe una diferencia entre el control fisiológico y el grupo con isquemia permanente con tratamiento con glucosamina (F y C) para ambas gráficas ($p=0,0500$ para ambas, Mann Whitney y $p<0.05$) y entre el control fisiológico y el grupo con isquemia

transitoria con glucosamina (F y D) para el número de células con O-GlcNAcilación ($p=0,0500$, Mann Whitney y $p<0.05$), mientras que para el porcentaje de neuronas con O-GlcNAcilación no existe la diferencia entre este control y el grupo con isquemia transitoria con glucosamina (F y D) ($p=0,1000$, Mann Whitney y $p<0.05$).

En la **Figura 8.2** se observa que hay una diferencia en el promedio de la densidad en O-GlcNAcilación por célula (tanto neuronas como no neuronas) al comparar todos los grupos de tratamiento (Kruskal-Wallis $p<0.05$). Por otra parte, al realizar las comparaciones en los pares de interés se obtuvo diferencia entre el grupo con isquemia transitoria y su homólogo con tratamiento con glucosamina en ambas gráficas ($p=0,0500$), mientras que para el grupo con isquemia permanente y su homólogo con tratamiento no se obtuvo una diferencia significativa ($p=0,2000$ y $p=0,1768$ para O-GlcNAcilación en neuronas y no neuronas respectivamente), por otro lado, para los grupos control que simulan la condición fisiológica no se observa una diferencia ($p=0,3500$ y $p=0,5000$ para O-GlcNAcilación en neuronas y no neuronas respectivamente). Adicionalmente, se muestra una diferencia entre el grupo control fisiológico con el grupo con isquemia permanente con tratamiento con glucosamina (F y C) para las neuronas ($p=0,0500$, Mann Whitney y $p<0.05$), mientras que esta diferencia no existe para las células no neuronales ($p=0,1000$, Mann Whitney y $p<0.05$).

2.6 Discusión

Los accidentes cerebrovasculares son una de las principales causas de muerte tanto en Colombia como en el mundo y están caracterizados por la obstrucción de una de las arterias o vasos sanguíneos cerebrales por un trombo, un embolo o por un accidente hemorrágico. En el transcurso de este proceso se generan dos áreas bien diferenciadas, el foco isquémico y el área de penumbra; la primera presenta un alto nivel de necrosis y el daño es directo debido a la obstrucción, mientras que en la segunda el daño es progresivo y dependiente de la liberación de mensajeros de inflamación y/o apoptosis de la zona directamente obstruida. Por tal razón, se dice que esta área tiene una mayor tendencia a la recuperación bajo algún tratamiento farmacológico.

Actualmente el tratamiento farmacológico se basa en el uso de un agente trombolítico que busca restablecer el flujo sanguíneo en el área afectada, generando así una reentrada de glucosa y oxígeno. Este método de tratamiento solo funciona en las 4 horas siguientes al ictus isquémico y por eso hoy por hoy se investiga en nuevas estrategias que tengan un mecanismo direccionado a la neuroprotección de la zona de penumbra y que se pueda aplicar en grupos de personas con un riesgo de accidente cerebrovascular previo.

En el laboratorio de fisiología animal de la Universidad Icesi se han realizado diferentes investigaciones basadas en información que sugiere que la glucosamina podría ser uno de esos tratamientos y es por eso que esta investigación buscaba determinar si el tratamiento con glucosamina generaba un aumento en la supervivencia neuronal en la corteza cerebral de rata mediado por O-GlcNAcilación. Para esto se realizó un análisis de inmunohistoquímica de fluorescencia de los anticuerpos anti NeuN y anti O-GlcNAcilación clon RL2 mediante el software Image J de las imágenes obtenidas de un modelo animal con isquemia cerebral focal inducida mediante oclusión de la arteria cerebral media.

2.6.1 Determinación de la cantidad de neuronas vivas

En el proceso de esta investigación, primero se realizó la determinación de la cantidad de neuronas vivas en los seis grupos analizados (*Control fisiológico (F)*, *Control fisiológico + Glucosamina (E)*, *Isquemia transitoria (B)*, *Isquemia transitoria + Glucosamina (D)*, *Isquemia permanente (A)*, *Isquemia permanente + Glucosamina (C)*). Los resultados (Figura 6) indican que existe un aumento significativo en el número de células vivas en los grupos con isquemia transitoria e isquemia permanente con un tratamiento previo con glucosamina y que no existe ningún efecto del tratamiento con glucosamina si no se aplica previamente estrés celular. Cabe resaltar que los grupos correspondientes a la isquemia transitoria (B

y D), es decir a los que se les retiró el filamento inductor de isquemia a los 90 minutos, experimentaron una mayor supervivencia que los individuos expuestos a isquemia permanente (A y C), esto puede estar ligado a la restitución de la disponibilidad de oxígeno y glucosa en el proceso de reperfusión (Lorenzo Fernández, 2008). A pesar de la existencia de la diferencia significativa entre el grupo control fisiológico (F) y el grupo con isquemia transitoria tratado con glucosamina (D), se puede ver que los valores de densidad óptica de O-GlcNAcilación en el grupo D son cercanos al F, apoyando de esta manera la hipótesis anterior. Igualmente se debe tener en cuenta que la inexistencia de diferencia significativa entre el grupo control fisiológico y el grupo con isquemia permanente con tratamiento (F y C) se debe al alto error estándar de la media del grupo C y no a que este último se acerque al estado fisiológico por el tratamiento (Gómez, Vivó, & Soria, 2001).

2.6.2 Determinación de la O-GlcNAcilación celular general

Como segunda medida se realizó un análisis de la O-GlcNAcilación celular y se comparó la diferencia de la intensidad promedio de esta modificación postraduccional (normalizada con respecto al promedio de densidad óptica del grupo control, F) en los 6 grupos, los resultados (Figura 7) sugieren que existe un aumento significativo solo en el grupo con isquemia transitoria y a pesar de que el grupo con isquemia permanente no presenta una diferencia significativa, se evidencia una tendencia de aumento en la intensidad de esta modificación. Esto último se presenta debido al tamaño de muestra utilizado para cada análisis ($n=3$), una alternativa para saber si esta tendencia se convierte en una diferencia estadística significativa es aumentar el número de individuos, pues a medida que el n aumenta se disminuye la variabilidad de datos y se acerca a la distribución normal (Gómez et al., 2001). En este análisis se evidenció mayor O-GlcNAcilación en el grupo con isquemia transitoria, comprobando una vez más el papel clave de la reperfusión en la recuperación neuronal.

2.6.3 Determinación de la O-GlcNAcilación Neuronal

Para finalizar, se realizó un análisis de superposición de los anticuerpos anti NeuN y anti O-GlcNAcilación clon RL2. Los resultados (Figura 8.1) indican que existe una diferencia significativa en la supervivencia neuronal al aplicar el tratamiento con glucosamina tanto en isquemia transitoria como permanente. Esto se evidencia en los porcentajes de neuronas vivas que están O-GlcNAciladas, principalmente en el grupo con isquemia transitoria (B) pues allí el porcentaje es de aproximadamente 60% un valor muy similar al del control fisiológico (F) que es de 70% aproximadamente.

Para analizar mejor el comportamiento de los grupos con isquemia transitoria, se debe tener en cuenta que esta investigación se basa en cortes del área de penumbra, por lo cual se podría sugerir que las neuronas de esta área, al tener aún una posibilidad de salvamento después de la isquemia, utilizan tanto la reperfusión como la O-GlcNAcilación como mecanismos para recuperar o acercarse a su estado fisiológico. Lo anterior se evidencia además en la inexistencia de una diferencia significativa entre el grupo con isquemia transitoria tratado con glucosamina y el control fisiológico sin tratamiento tanto para O-GlcNAcilación total como para el porcentaje de neuronas vivas O-GlcNAciladas (Figura 7 y 8.1 inferior), pues permitiría decir que el tratamiento llevo esta área aun estado muy similar al fisiológico (sin estrés isquémico) (Montaner, 2007) (Lorenzo Fernández, 2008).

Teniendo en cuenta lo anterior, se podría sugerir entonces que el aumento en la supervivencia neuronal puede estar asociado a la menor tasa de disminución en la O-GlcNAcilación (Figura 8.2 izquierda) que se da en los grupos expuestos a tratamiento con glucosamina previo a estrés isquémico en comparación con los grupos que no lo han recibido. Este aumento en la supervivencia neuronal al aplicar un tratamiento con glucosamina previo a isquemia, ha sido reportado por varios investigadores y se atribuye a diferentes mecanismos que serán mencionados en adelante.

En este contexto, en 2007 Champattanachai y sus compañeros de investigación mostraron que el tratamiento con glucosamina protegía a los cardiomiocitos de la lesión causada por el proceso isquemia/reperfusión. En dicho estudio se presentó un aumento en la intensidad de O-GlcNAcilación al administrar el tratamiento con glucosamina en normoxia y al someter el cultivo a estrés I/R, mientras que en nuestra investigación se evidencio, en contraste a los grupos control, una menor disminución de la O-GlcNAcilación post estrés I/R al aplicar el tratamiento con glucosamina (Champattanachai et al., 2008). Esta diferencia puede deberse a la respuesta diferencial de las células neuronales y cardiomiocitos pues algunos estudios evidencian que la regulación mediada por O-GlcNAcilación de modificaciones postraduccionales citoprotectoras en algunas proteínas es dependiente del tipo específico de célula (Shi et al., 2015). Esta diferencia también se puede deber a la naturaleza de los modelos utilizados y en su respuesta al estrés celular por isquemia, pues esta investigación se basa en un modelo con organismo vivo en comparación con el cultivo celular utilizada por Champattanachai que, según los resultados, el estrés isquémico inducido en un organismo vivo por corto tiempo genera daños mayores que un cultivo con supresión de oxígeno y glucosa u otro método como el utilizado en dicha investigación.

En 2010 Hwang *et al* realizaron una investigación similar a la anterior, pero esta vez en un modelo animal y estudiando el efecto del tratamiento con glucosamina en infarto cerebral. Sus resultados sugieren que existe un aumento en la supervivencia neuronal asociado al tratamiento de glucosamina y esto lo evidencian en una reducción significativa del volumen del infarto de $14.3\% \pm 7.4\%$. (Hwang *et al.*, 2010) Un resultado similar a este se obtuvo previamente en el laboratorio de fisiología animal de la universidad Icesi al encontrar una disminución en el tamaño del infarto de un 50% en un modelo animal idéntico con un tratamiento de glucosamina intraperitoneal de 200mg, soportando de nuevo la hipótesis de aumento en la supervivencia neuronal asociada al tratamiento con glucosamina previo a isquemia (Vera González, 2016).

Según el reporte de Hwang *et al.* en 2010, este efecto neuroprotector podría estar asociado a la supresión de la inflamación dada principalmente por la capacidad de la glucosamina de inhibir la actividad del factor nuclear kappaB (NFκB) el cual media respuestas apoptóticas (Hwang *et al.*, 2010). Dicha inhibición de la actividad de NFκB ha sido asociada por otros autores a la O-GlcNAcilación (Baudoin & Issad, 2014). En un modelo de rata con trauma hemorrágico, el aumento de O-GlcNAcilación mejoró significativamente la función cardíaca y la perfusión de órganos periféricos y disminuyó los niveles circulantes de citocinas pro-inflamatorias TNFα e IL6. Estos investigadores reportaron que el aumento de la O-GlcNAcilación reduce la fosforilación de IκB y la señalización de NFκB en el tejido cardíaco de ratas tratadas con hemorragia traumática (Zou *et al.*, 2007) (Zou *et al.*, 2009). Otros investigadores reportaron que, en células de músculo liso aórtico de rata, la O-GlcNAcilación de NFκB p65 derivó en una reducción en la fosforilación inducida por TNFα en la serina 536, dando como resultado una asociación aumentada de NFκB con IκB y por tanto una disminución de la actividad de NFκB e inhibición de la producción de mediadores pro-inflamatorios por esta vía (Xing *et al.*, 2011).

Otro mecanismo por el cual los investigadores sugieren que se da el aumento en la supervivencia neuronal, es la mediación de la glucosamina, posiblemente asociada a O-GlcNAcilación, en la translocación de la proteína Bcl-2. Basados en la premisa de la importancia de la mitocondria en la regulación de la muerte celular, ellos estudiaron la variación en los niveles de la proteína Bcl-2 mitocondrial al someter a estrés isquémico el cultivo. Como resultado obtuvieron que al aplicar el tratamiento con glucosamina en cardiomiocitos con estrés isquémico se genera un aumento significativo en los niveles de Bcl-2 y, debido a que esta proteína es anti-apoptótica, se genera una mayor respuesta a la isquemia, es decir una menor pérdida celular (Champattanachai *et al.*, 2008).

También se ha sugerido que otro mecanismo de citoprotección de la glucosamina mediado por O-GlcNAcilación por una modulación en la formación de especies reactivas de oxígeno. Esto fue demostrado en un estudio *in vitro* en células ganglionares retinianas, en este estudio se observó una disminución en la producción de especies reactivas de oxígeno al administrar un tratamiento con glucosamina en diferentes dosis en un modelo con inducción de estrés oxidativo mediante H₂O₂. Esta disminución fue asociada por los investigadores a la O-GlcNAcilación pues se dio un aumento en esta modificación postraducciona en estas mismas condiciones (Chen et al., 2015).

En este contexto, Zachara et al reportaron en el 2004 que la citoprotección o tolerancia a niveles de estrés letales mediada por O-GlcNAcilación podría estar asociada a una alteración en los niveles de las proteínas de choque térmico (HSPs por sus siglas en inglés), principalmente en HSP70 y HSP40. Estas proteínas han sido reportadas como citoprotectoras y en dicho estudio muestran que la inducción de ellas ocurre más rápidamente cuando hay una mayor O-GlcNAcilación. Este artículo además reporta otros mecanismos como la disminución en la agregación proteína-proteína (Posiblemente a través de la actividad HSP70 lectin), estabilización de la estructura de algunas proteínas entre otros. Adicionalmente este estudio da información acerca de otras proteínas que son modificadas por a O-GlcNAcilación, por ejemplo, la proteína del citoesqueleto Tau, esta proteína está asociada a enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y según se reporta se ha mostrado que su hiperfosforilación está asociada a una disminución de la O-GlcNAcilación de la misma. Este estudio deja principalmente una evidencia de las múltiples vías celulares en las que está implicada la O-GlcNAcilación y por tanto los múltiples caminos por los cuales puede generar cito o neuroprotección u otro tipo de efecto dependiendo el tipo específico de célula en el que se dé (Zachara & Hart, 2004).

Asimismo, en el 2016 en el laboratorio de fisiología celular de la universidad Icesi, se realizaron investigaciones acerca la proteína Akt, una proteína involucrada en la supervivencia neuronal. En dichas investigaciones se sugiere que la neuroprotección de la glucosamina podría estar dada por una activación de Akt asociada a O-GlcNAcilación o incluso a la O-GlcNAcilación de la misma pues esta presenta residuos donde se da esta modificación postraducciona (Caicedo Idrobo, 2016).

En este contexto, al finalizar esta investigación se encontró que si existe un aumento en la supervivencia celular al administrar el tratamiento con glucosamina previo a la inducción de la isquemia tanto transitoria como permanente. Los resultados sugieren que este aumento en la supervivencia celular está relacionado con una menor disminución en los niveles de O-GlcNAcilación en los grupos

tratados con glucosamina, resultado que está de acuerdo con las investigaciones mencionadas anteriormente y que posiblemente este asociado a la mayoría de mecanismos y vías celulares mencionados. A pesar de esto, falta dilucidar certeramente cual es la relación entre la O-GlcNAcilación y el aumento de la supervivencia y cuales con las vías de señalización y mecanismos celulares que median en este evento.

Además de lo anterior, los datos obtenidos y expuestos en la Figura 7.2 evidencian que el aumento en la O-GlcNAcilación no es solamente en células neuronales, sino que también genera una tendencia al aumento en células no neuronales. Dichas células podrían ser células endoteliales o gliales, principalmente microglía pues se ha reportado que la glucosamina genera neuroprotección mediante la supresión de la inflamación en este tipo de células (Baudoin & Issad, 2014). Este resultado podría ser consistente, además, con diferentes investigaciones pues se ha reportado aumentos en la O-GlcNAcilación en diferentes tipos de células como, mamarias, retinales y cardiomiocitos (como se ha mostrado anteriormente). Cabe resaltar que para poder sugerir que efecto del tratamiento de glucosamina mediado por O-GlcNAcilación podría extenderse a células no neuronales en el Sistema Nervioso Central, se debe realizar un estudio similar al presente, pero en este se debe incluir un anticuerpo que permita identificar cuáles son específicamente las otras células O-GlcNAcizadas, un ejemplo es el anticuerpo anti GFAP (proteína fibrilar acídica de la glía por sus siglas en inglés) el cual permitiría identificar las células gliales.

Este proyecto aporta además como resultado dos protocolos de uso del software ImageJ que permitirán tener un avance más rápido en futuras investigaciones del laboratorio de fisiología animal que busquen realizar análisis de superposición similares a este. Estos protocolos serán dispuestos a mejora continua por cada investigador y se tiene como principal sugerencia para su correcta aplicación, tener siempre en cuenta la magnificación con la que fue observada la muestra para así seleccionar un tamaño de partícula a analizar óptimo. Además de lo anterior, se debe resaltar especialmente que este tipo de análisis de superposición de anticuerpos permiten establecer una relación directa del tratamiento y sus efectos sobre una modificación específica en tipo celular específico, tal como se evidencio con el tratamiento con glucosamina y con la modificación postraducciona O-GlcNAc en las neuronas, ya que permitió observar si una neurona viva específica tenía este tipo de glicosilación al aplicar o no el tratamiento (Figura 7.1).

2.7 Conclusiones

- Se encontraron diferencias significativas en la supervivencia neuronal y la O-GlcNacilación en los grupos con isquemia transitoria y permanente, ambas caracterizadas por aumento post-tratamiento con glucosamina.
- Se encontró que el efecto del tratamiento de glucosamina en la corteza cerebral en el modelo animal estudiado se constituye en un aumento en la supervivencia neuronal asociado a una menor disminución de los niveles de O-GlcNacilación en las proteínas presentes en las neuronas de los grupos tratados con glucosamina con respecto a los que no tuvieron el tratamiento.
- Se creó un protocolo de uso del software ImageJ para el análisis de intensidad de una señal, conteo de partículas y superposición de imágenes.

2.8 Recomendaciones

- Realizar un nuevo análisis bajo las mismas condiciones experimentales, pero aumentando un marcador que permita diferenciar los diferentes tipos de células no neuronales, por ejemplo, el anticuerpo anti GFAP (proteína fibrilar ácida de la glia por sus siglas en inglés), y así poder concluir específicamente el efecto del tratamiento con glucosamina en cada tipo específico de célula.
- Aumentar el número de individuos (n) por grupo con el fin de obtener datos estadístico más concluyentes y con menor error.
- Tener en cuenta a futuro una posible estandarización las coordenadas a las cuales se toma cada imagen con el fin de tener datos más precisos.
- Continuar con la investigación de las diferentes proteínas involucradas en el efecto de la glucosamina con el fin de elucidar un mecanismo de acción de este posible tratamiento.

2.9 BIBLIOGRAFÍA

- Arango-Davila, C., Escobar-Betancourt, M., Cardona-Gómez, G. P., & Pimienta-Jiménez, H. (2004). Pathophysiology of focal cerebral ischemia: fundamental aspects and its projection on clinical practice. *Revista de Neurología*, 39(2), 156–165.
- Baudoin, L., & Issad, T. (2014). O-GlcNAcylation and Inflammation: A Vast Territory to Explore. *Frontiers in Endocrinology*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00235>
- Broughton, B. R. S., Reutens, D. C., & Sobey, C. G. (2009). Apoptotic Mechanisms After Cerebral Ischemia. *Stroke*, 40(5), e331 LP-e339.
- Caicedo Idrobo, A. (2016). *Efecto Del Precondicionamiento Isquémico Cerebral Sobre La Expresión Y La Fosforilación De La Proteína Akt*. (Tesis) Universidad Icesi.
- Cardozo Hernández, C. F. (2013). *O-GlcNAcilación en excitotoxicidad no isquémica en ratas sometidas a isquemia cerebral focal*. (Tesis) Universidad del Valle.
- Champattanachai, V., Marchase, R. B., & Chatham, J. C. (2008). Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein O-GlcNAc and increased mitochondrial Bcl-2. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 294(6), C1509–C1520. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00456.2007>
- Chen, Y. J., Huang, Y. S., Chen, J. T., Chen, Y. H., Tai, M. C., Chen, C. L., & Liang, C. M. (2015). Protective effects of glucosamine on oxidative-stress and ischemia/reperfusion-induced retinal injury. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 56(3), 1506–1516. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-15726>
- Collins, T. . (2007). ImageJ for microscopy. *Biotechniques*, 43 (1), 25-30. *Biotechniques*, 43(1), 25–30. <https://doi.org/10.2144/000112505>
- Gómez, S., Vivó, M., & Soria, E. (2001). Pruebas de significación en Bioestadística. *Revista de Diagnóstico Biológico*, 50(4), 207–218. Retrieved from http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-79732001000400008&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Gusel'nikova, V. V., & Korzhevskiy, D. E. (2015). NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker. *Acta Naturae*, 7(2), 42–47.
- Harris, R. B. S., & Apolzan, J. W. (2015). Hexosamine biosynthetic pathway activity in leptin resistant sucrose-drinking rats. *Physiology & Behavior*, 138, 208–218. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.09.016>

- Hwang, S. Y., Shin, J. H., Hwang, J. S., Kim, S. Y., Shin, J. A., Oh, E. S., ... Han, I. O. (2010). Glucosamine exerts a neuroprotective effect via suppression of inflammation in rat brain ischemia/reperfusion injury. *Glia*, *58*(15), 1881–1892. <https://doi.org/10.1002/glia.21058>
- Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., & Korthuis, R. J. (2012). Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *International Review of Cell and Molecular Biology*, *298*, 229–317. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7>
- Liu, J., Pang, Y., Chang, T., Bounelis, P., Chatham, J. C., & Marchase, R. B. (2006). Increased hexosamine biosynthesis and protein O-GlcNAc levels associated with myocardial protection against calcium paradox and ischemia. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *40*(2), 303–312. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2005.11.003>
- Lorenzo Fernández, P. (2008). *Farmacología Básica y Clínica* (18th ed.). Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Love, D. C., & Hanover, J. A. (2005). The hexosamine signaling pathway: deciphering the “O-GlcNAc code.” *Sci STKE*, *2005*(312), re13. <https://doi.org/stke.3122005re13> [pii]r10.1126/stke.3122005re13
- Montaner, J. (2007). *Fisiopatología de la isquemia cerebral*. Barcelona: Marge.
- Observatorio Nacional de Salud. (2015). *Quinto Informe ONS: Carga de enfermedad por Enfermedades Crónicas No Transmisibles y Discapacidad en Colombia*. Bogotá. <https://doi.org/http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/ons/SiteAssets/Paginas/publicaciones/5to%20Informe%20ONS%20v-f1.pdf>
- Reginster, J.-Y., Bruyere, O., Fraikin, G., & Henrotin, Y. (2005). Current concepts in the therapeutic management of osteoarthritis with glucosamine. *Bulletin (Hospital for Joint Diseases (New York, N.Y.))*, *63*(1–2), 31–36.
- Shi, J., Gu, J., Dai, C., Jin, X., Sun, J., Iqbal, K., ... Gong, C.-X. (2015). O-GlcNAcylation regulates ischemia-induced neuronal apoptosis through AKT signaling. *Scientific Reports*, *5*, 14500. <https://doi.org/10.1038/srep14500>
- Thermofisher. (2016). OGT Monoclonal Antibody (RL2). Retrieved November 12, 2016, from <https://www.thermofisher.com/antibody/product/OGT-Antibody-clone-RL2-Monoclonal/MA1-072>
- Vera González, A. (2016). *Evaluación del efecto neuroprotector de la glucosamina sobre la O-Glicosilación y otras vías de señalización intracelular en dos modelos de Isquemia Cerebral Focal en la rata Wistar adulta*. (Tesis doctoral) Universidad de Valle.
- Wolf, H. K., Buslei, R., Schmidt-Kastner, R., Schmidt-Kastner, P. K., Pietsch, T., Wiestler, O. D., & Blumcke, I. (1996). NeuN: a useful neuronal marker for

diagnostic histopathology. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 44(10), 1167–1171. <https://doi.org/10.1177/44.10.8813082>

- Wu, T., Zhou, H., Jin, Z., Bi, S., Yang, X., Yi, D., & Liu, W. (2009). Cardioprotection of salidroside from ischemia/reperfusion injury by increasing N-acetylglucosamine linkage to cellular proteins. *European Journal of Pharmacology*, 613(1), 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.04.012>
- Xing, D., Gong, K., Feng, W., Nozell, S. E., Chen, Y.-F., Chatham, J. C., & Oparil, S. (2011). O-GlcNAc Modification of NFκB p65 Inhibits TNF-α-Induced Inflammatory Mediator Expression in Rat Aortic Smooth Muscle Cells. *PLoS ONE*, 6(8), e24021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024021>
- Zachara, N. E., & Hart, G. W. (2004). O-GlcNAc a sensor of cellular state: The role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1673(1–2), 13–28. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.03.016>
- Zou, L., Yang, S., Champattanachai, V., Hu, S., Chaudry, I. H., Marchase, R. B., & Chatham, J. C. (2009). Glucosamine improves cardiac function following trauma-hemorrhage by increased protein O-GlcNAcylation and attenuation of NF-κB signaling. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 296(2), H515-23. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01025.2008>
- Zou, L., Yang, S., Hu, S., Chaudry, I. H., Marchase, R. B., & Chatham, J. C. (2007). The protective effects of PUGNAc on cardiac function after trauma-hemorrhage are mediated via increased protein O-GlcNAc levels. *Shock (Augusta, Ga.)*, 27(4), 402–408. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000245031.31859.29>

3 ANEXOS

Anexo 1. PROTOCOLO PARA EL ANÁLISIS DE INTENSIDAD DE UNA SEÑAL EN IMÁGENES DE INMUNOHISTOQUÍMICA EN EL PROGRAMA ImageJ

	<p style="text-align: center;">PROTOCOLO PARA EL ANÁLISIS DE INTENSIDAD DE UNA SEÑAL EN IMÁGENES DE INMUNOHISTOQUÍMICA EN EL PROGRAMA ImageJ</p>	<p>Protocolo N°: 01 Fecha: 22/06/2017 Versión: 1 Elaborado: Juan Pablo Castiblanco Salgado Revisión: Carlos Cardozo Hernández Juliana Rengifo Gómez</p>
Fisiología Animal – Grupo Natura, Universidad Icesi		

1. INTRODUCCIÓN

Software ImageJ

ImageJ es un software de análisis digital de imágenes desarrollado por el NIH (National Institutes of Health). Es de dominio público y, además, una de las herramientas sin costo más utilizadas en la investigación biomédica y en la práctica clínica. Esta es de especial uso en el análisis de intensidades de señales pues cuenta con herramientas de sustracción de fondo y conteo de partículas y también es de gran utilidad en los análisis de doble marcaje, pues permite realizar superposiciones cualitativas utilizando amplias gamas de color. Sin embargo, al igual que con todas las herramientas de análisis, esta puede ser mal utilizada, por ello es importante que los investigadores comprendan los diferentes plugins antes de seleccionarlos y usarlos. (Collins, 2007) (Link de descarga <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>)

Anticuerpos anti NeuN

La proteína NeuN (Neural Nuclear protein) está localizada en el núcleo y en el citoplasma perinuclear en la mayoría de neuronas en el sistema nervioso central de los mamíferos, esta proteína no ha sido detectada en células gliales y por eso desde hace algunos años se establece como un importante objetivo de anticuerpos monoclonales para evaluar el estado de las neuronas en estados normales o de patología (Gusel'nikova & Korzhhevskiy, 2015)(Wolf et al., 1996).

Es importante tener en cuenta que las células de Cajal-Retzius en el neocórtex, algunas células cerebelosas (incluyendo células de Purkinje), neuronas de olivo inferior, células de la capa nuclear interna de la retina, las neuronas motoras y en

la médula espinal y las células ganglionares de la cadena simpática no son inmunohistoquímicamente teñidos con anticuerpos contra NeuN (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015).

Además de lo anterior, es de especial importancia tener en cuenta que las diferencias en la intensidad de la reacción del anticuerpo con la proteína NeuN reflejan las diferencias en la expresión de esta proteína en una célula, que están asociados tanto con las características constitutivas de la neurona como con su estado funcional, específicamente en este último ámbito se dice que cuando una célula no presenta marcaje con este anticuerpo se debe a estados de estrés o muerte celular (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015).

Anticuerpos RL2

El anticuerpo RL2 es un anticuerpo monoclonal que proviene del ratón, este identifica el monosacárido Glc unido en conformación O a la serina y treonina de algunas glicoproteínas, es así como detecta una gran variedad de proteínas O-GlcNAcizadas, entre estas 8 glicoproteínas del complejo del poro nuclear de aproximadamente 210, 180, 145, 100, 63, 58, 54 y 45 kDa. Se ha utilizado con éxito en una amplia variedad de células de mamífero (humano, rata y ratón) y en proteína de virus O-GlcNAcizadas. El marcaje se produce en el NPC (Complejo nuclear del poro sus siglas en ingles), con la mayor parte del etiquetado en los márgenes citoplasmáticos y/o nucleoplasmáticos, así como dentro del núcleo pues es allí donde se encuentran los monosacáridos GlcNAc. (Thermofisher, 2016)

2. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

Materiales	Reactivos	Equipos
N.A.	N.A.	Imágenes de inmunohistoquímica
N.A.	N.A.	Computador
N.A.	N.A.	Programa ImageJ

3. PROTOCOLO

Limpieza de fondo

3.1. Abrir el programa ImageJ y ubicar el cursor en el icono “**file**”, dar click en este para desplegar una lista de opciones en la cual se debe elegir la opción “**open**”. Esto abrirá una ventana para buscar la carpeta donde previamente se han

guardado las imágenes obtenidas, una vez se ha encontrado la imagen, dar click dos veces para que esta se abra.

3.2. Luego dirigir el cursor en el icono “**Process**”, dar click en este para desplegar una lista de opciones, escoger la opción “**Substract Background**”. Nuevamente se desplegará una ventana en la cual se debe escribir el “**Rolling ball radius**” (se recomienda 50.0) y seleccionar la casilla “**Preview**” (esta permitirá prever como quedará la imagen al quitarle el ruido del fondo) (**Nota: Solo la casilla “Preview” debe tener el chulo o check, las demás deben estar vacías**), posteriormente presionar la opción “**Ok**”.

3.3. Una vez realizado lo anterior, presionar la opción “**Image**”, allí se desplegará una lista en la cual se debe seleccionar “**Adjust**” y posteriormente “**Color Threshold**”, lo cual abrirá una nueva ventana **Figura 1**.

3.4. Solo se modificará la sección “**Brightness**”, las demás se dejarán igual. En dicha sección, la barra superior deberá estar en “**0**” y la inferior debe estar en el punto de inflexión derecho de la curva, donde se observe que se eliminará el mayor número de impurezas del fondo (**Figura 1**) (para análisis con el marcador anti NeuN en corteza cerebral se recomienda “**35**” y para el caso de el anticuerpo Anti O-GlcNAcilación “**50**”)

3.5. Presionar en la misma ventana la opción “**Select**” y posteriormente la tecla “**Back Space**” o “**Delete**” (tecla de borrar a la izquierda “←”).

3.6. Guardar la imagen resultante así, presionar la opción “**File**”, en la lista desplegable seleccionar “**Save As**” y en la nueva lista seleccionar “**PNG**”, allí aparecerá una ventana en la que podrá seleccionar la ubicación deseada, se recomienda guardar en la misma ubicación del archivo original con un consecutivo al final del nombre (Ejemplo: “.1”) que permita llevar el seguimiento del proceso de análisis. Cerrar la imagen.

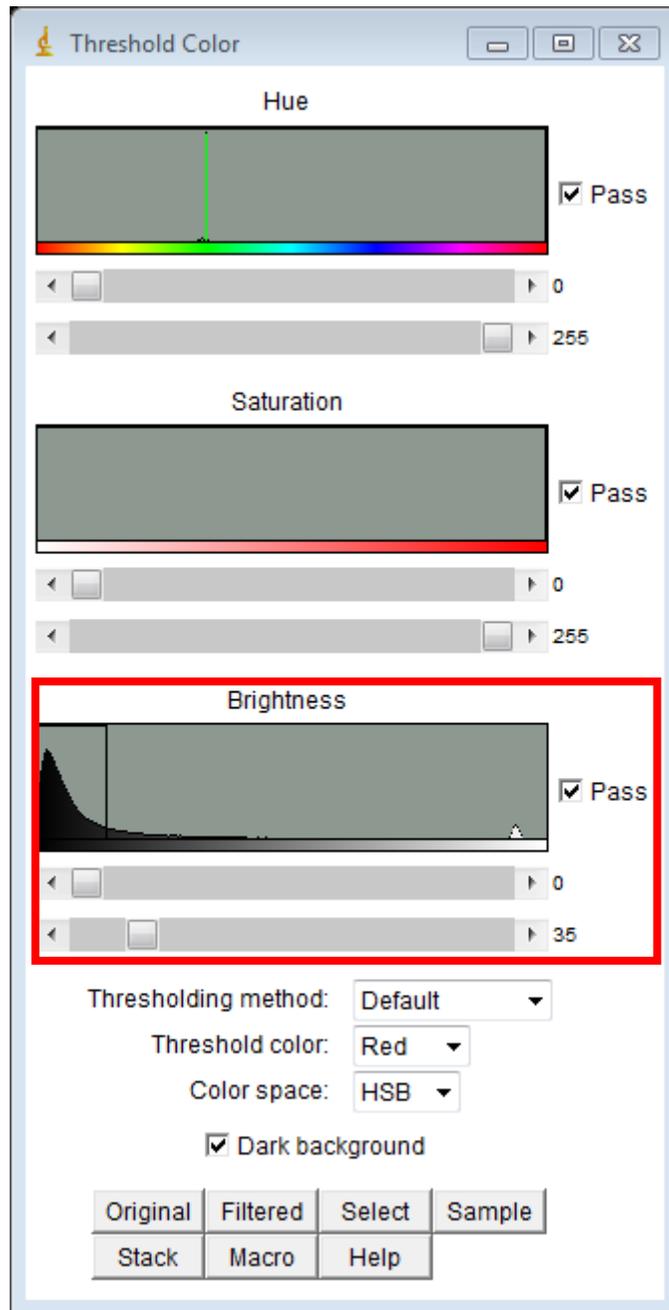


Figura 1. Ventana "Color Threshold"

Conteo de células y Medición de la intensidad de fluorescencia

3.7. Repita el paso 3.1 para abrir la imagen guardada en el paso 3.6.

3.8. Repita el paso 3.3 y 3.4 pero esta vez ubique la barra superior en “1” y la inferior en “255”.

3.9. Presione la opción “**Select**”.

3.10. Presione la opción “**Analyze**”, allí se desplegará una lista en la cual debe seleccionar la opción “**Set Measurements**”, allí señalar las casillas que se muestran en la **Figura 2**, incluyendo la casilla “**Decimal Places**”. Posteriormente presione “**Ok**”.

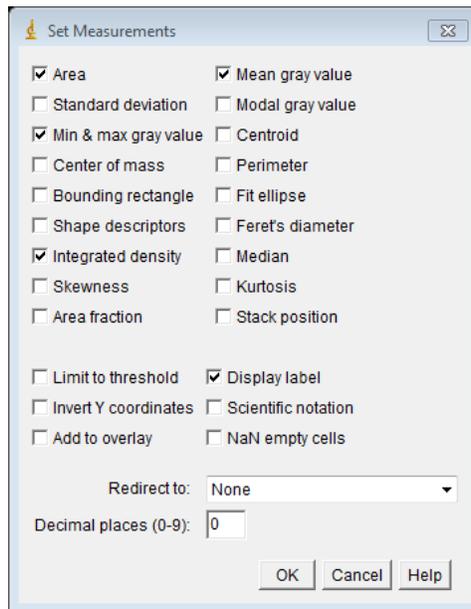


Figura 2. Ventana “**Set Measurements**”

3.11. Presione de nuevo la opción “**Analyze**” y en la lista desplegable seleccione “**Analyze Particles**”, se desplegará una ventana como la de la **Figura 3**. En esta ventana debe seleccionar el tamaño que de célula a analizar en la casilla “**Size**” (para análisis con el marcador anti NeuN en corteza cerebral se recomienda “**100-Infinity**” e igual para el caso de el anticuerpo Anti O-GlcNAcilación). Las demás casillas deben estar igual a las de la **Figura 3**. Posteriormente presionar “**Ok**”.

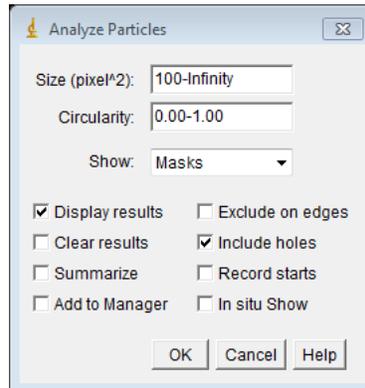


Figura 3. Ventana "Analyze Particles"

3.12. Al culminar el paso anterior le aparecerán dos ventanas, una con la máscara de las células analizadas y otra con la información del análisis. En la ventana de la información del análisis (**Figura 4**) se enumeran las células en la primera casilla y se da la intensidad de brillo en la asilla "IntDen".

	Label	Area	Mean	Min	Max	IntDen	RawIntDen
1	F 3676 10X C1 1 NEUN 1.png	303	28	0	81	8456	8456
2	F 3676 10X C1 1 NEUN 1.png	110	34	12	62	3692	3692
3	F 3676 10X C1 1 NEUN 1.png	514	38	12	79	19610	19610
4	F 3676 10X C1 1 NEUN 1.png	573	22	0	52	12878	12878
5	F 3676 10X C1 1 NEUN 1.png	503	40	0	82	20238	20238
6	F 3676 10X C1 1 NEUN 1.png	291	47	12	82	13614	13614
7	F 3676 10X C1 1 NEUN 1.png	189	29	12	71	5414	5414

Figura 4. Ventana "Results"

3.13. Los resultados de la **Figura 4** deben ser copiados a un archivo de Excel u otro software similar; para eso presione click sobre uno de los datos y seguidamente presione la combinación "Ctrl+A" (esto le permitirá seleccionar todos los datos). Posteriormente presione la combinación "Ctrl+C" o en la opción "Edit" seleccione "Copy" y luego con la combinación "Ctrl+V" pegue los datos en la hoja Excel.

3.14. Repita el paso 3.6, bajo la misma recomendación del consecutivo (Ejemplo: .2), para guardar la máscara del análisis. Cerrar la imagen.

Análisis de datos

3.15. Para los análisis realizados con anticuerpos Anti NeuN, es de interés determinar el número de neuronas marcadas y por eso se debe tener en cuenta el promedio de la cantidad de células marcadas en cada individuo para posteriormente realizar análisis estadísticos que permitan determinar si existe o no diferencias significativas entre diferentes grupos de tratamiento.

3.16. Para análisis realizados con anticuerpos Anti O-GlcNAcilación, es de interés determinar tanto la intensidad de esta modificación en cada célula como el número de células marcadas, por tanto, se deben realizar dos operaciones, primero los promedios de la casilla “**IntDen**” de cada individuo para determinar la intensidad promedio y segundo el promedio de la cantidad de células marcadas en cada individuo. Al tener estos promedios de podrán realizar análisis estadísticos que permitan determinar si existe o no diferencias significativas entre diferentes grupos de tratamiento.

5. SEGURIDAD

5.1. Conservar higiene postural y, de ser necesario, utilizar lentes que protejan de la luz durante largos periodos de análisis computacional de imágenes.

	Nombre	Firma	Fecha aprobación
Elaborado por:	Juan Pablo Castiblanco Salgado	J. Castiblanco	22.06.2017
Revisado por:	Carlos Cardozo Hernández	C. Cardozo	
Revisado por:	Juliana Rengifo Gómez	J. Rengifo	

Anexo 2. PROTOCOLO PARA EL ANÁLISIS DE SUPERPOSICIÓN DE IMÁGENES DE INMUNOHISTOQUÍMICA POR EL PROGRAMA ImageJ

	PROTOCOLO PARA EL ANÁLISIS DE SUPERPOSICIÓN DE IMÁGENES DE INMUNOHISTOQUÍMICA POR EL PROGRAMA ImageJ	Protocolo N°: 01 Fecha: 22/06/2017 Versión: 1 Elaborado: Juan Pablo Castiblanco Salgado Revisión: Carlos Cardozo Hernández Juliana Rengifo Gómez
Fisiología Animal – Grupo Natura, Universidad Icesi		

1. INTRODUCCIÓN

Software ImageJ

ImageJ es un software de análisis digital de imágenes desarrollado por el NIH (National Institutes of Health). Es de dominio público y, además, una de las herramientas sin costo más utilizadas en la investigación biomédica y en la práctica clínica. Esta es de especial uso en el análisis de intensidades de señales pues cuenta con herramientas de sustracción de fondo y conteo de partículas y también es de gran utilidad en los análisis de doble marcaje, pues permite realizar superposiciones cualitativas utilizando amplias gamas de color. Sin embargo, al igual que con todas las herramientas de análisis, esta puede ser mal utilizada, por ello es importante que los investigadores comprendan los diferentes plugins antes de seleccionarlos y usarlos. (Collins, 2007) (Link de descarga <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>).

Anticuerpos anti NeuN

La proteína NeuN (Neural Nuclear protein) está localizada en el núcleo y en el citoplasma perinuclear en la mayoría de neuronas en el sistema nervioso central de los mamíferos, esta proteína no ha sido detectada en células gliales y por eso desde hace algunos años se establece como un importante objetivo de anticuerpos monoclonales para evaluar el estado de las neuronas en estados normales o de patogenia (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015)(Wolf et al., 1996).

Es importante tener en cuenta que las células de Cajal-Retzius en el neocórtex, algunas células cerebelosas (incluyendo células de Purkinje), neuronas de olivo inferior, células de la capa nuclear interna de la retina, las neuronas motoras y en la médula espinal y las células ganglionares de la cadena simpática no son

inmunohistoquímicamente teñidos con anticuerpos contra NeuN (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015).

Además de lo anterior, es de especial importancia tener en cuenta que las diferencias en la intensidad de la reacción del anticuerpo con la proteína NeuN reflejan las diferencias en la expresión de esta proteína en una célula, que están asociados tanto con las características constitutivas de la neurona como con su estado funcional, específicamente en este último ámbito se dice que cuando una célula no presenta marcaje con este anticuerpo se debe a estados de estrés o muerte celular (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015).

Anticuerpos RL2

El anticuerpo RL2 es un anticuerpo monoclonal que proviene del ratón, este identifica el monosacárido Glc unido en conformación O a la serina y treonina de algunas glicoproteínas, es así como detecta una gran variedad de proteínas O-GlcNAcizadas, entre estas 8 glicoproteínas del complejo del poro nuclear de aproximadamente 210, 180, 145, 100, 63, 58, 54 y 45 kDa. Se ha utilizado con éxito en una amplia variedad de células de mamífero (humano, rata y ratón) y en proteína de virus O-GlcNAcizadas. El marcaje se produce en el NPC (Complejo nuclear del por sus siglas en ingles), con la mayor parte del etiquetado en los márgenes citoplasmáticos y/o nucleoplasmáticos, así como dentro del núcleo pues es allí donde se encuentran los monosacáridos GlcNAc (Thermofisher, 2016).

2. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

Materiales	Reactivos	Equipos
N.A.	N.A.	Imágenes de inmunohistoquímica de múltiple marcaje
N.A.	N.A.	Computador
N.A.	N.A.	Programa ImageJ

3. PROTOCOLO

Superposición de Imágenes

3.1. Abrir el programa ImageJ y ubicar el cursor en el icono “**file**”, dar click en este para desplegar una lista de opciones en la cual se debe elegir la opción “**open**”. Esto abrirá una ventana para buscar la carpeta donde previamente se han guardado las imágenes obtenidas, una vez se ha encontrado la imagen, dar click dos veces para que esta se abra. (Nota: Las imágenes abiertas debes haber

pasado previamente por limpieza de fondo, Ver: “**Protocolo para el análisis de intensidad de una señal en imágenes de inmunohistoquímica en el programa ImageJ**”)

3.2. Realizar el paso 3.1 con la segunda imagen de la misma área, pero con diferente marcador.

3.3. Una vez realizado lo anterior presionar la opción “**Image**”, allí se desplegará una lista en la cual se debe seleccionar “**Overlay**” y posteriormente “**Add Image**”, lo cual abrirá una nueva ventana **Figura 1**.

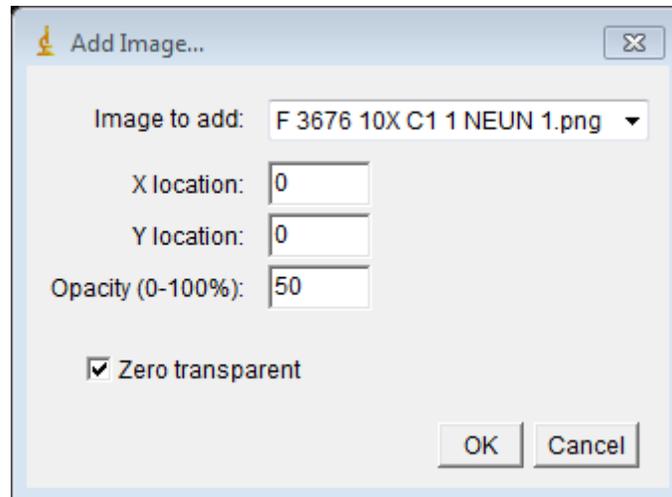


Figura 1. Ventana “Add Image”

3.4. En esta ventana deben seleccionar las casillas marcadas en la **Figura 1** y en la casilla “**Image to add**” seleccionar la imagen que será superpuesta sobre la otra (En el ejemplo de la **Figura 1** la imagen F3676 10X C1 1 NEUN 1 será puesta sobre otra imagen). Debe resultar algo similar al ejemplo en la **Figura 2**

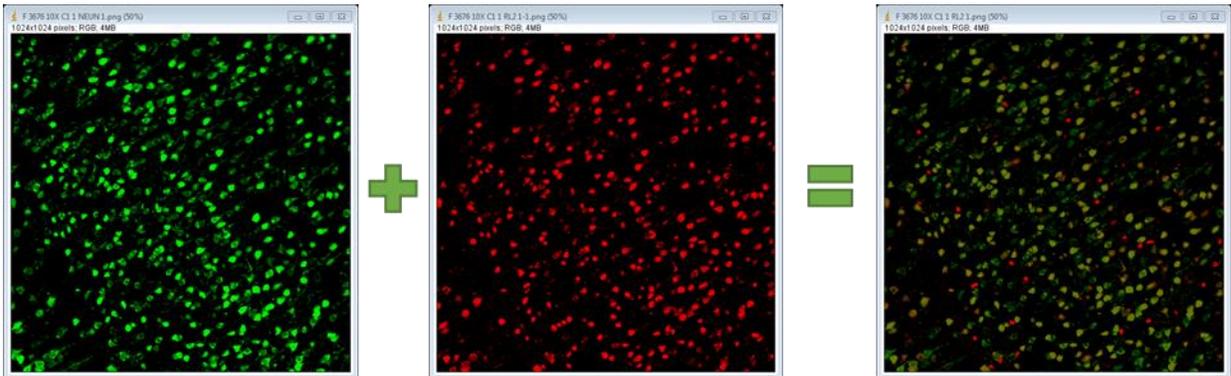


Figura 2. Ejemplo de Superposición de imágenes.

3.5. Guardar la imagen resultante así, presionar la opción **“File”**, en la lista desplegable seleccionar **“Save As”** y en la nueva lista seleccionar **“PNG”**, allí aparecerá una ventana en la que podrá seleccionar la ubicación deseada, se recomienda guarda en la misma ubicación del archivo original con un consecutivo al final del nombre (Ejemplo: .1) que permita llevar el seguimiento del proceso de análisis. Cerrar la imagen.

Conteo de células y Medición de la intensidad de fluorescencia

3.6. Abrir la imagen guardada en el paso anterior y presionar la opción **“Image”**, allí se desplegará una lista en la cual se debe seleccionar **“Adjust”** y posteriormente **“Color Threshold”**, lo cual abrirá una nueva ventana **Figura 3.**

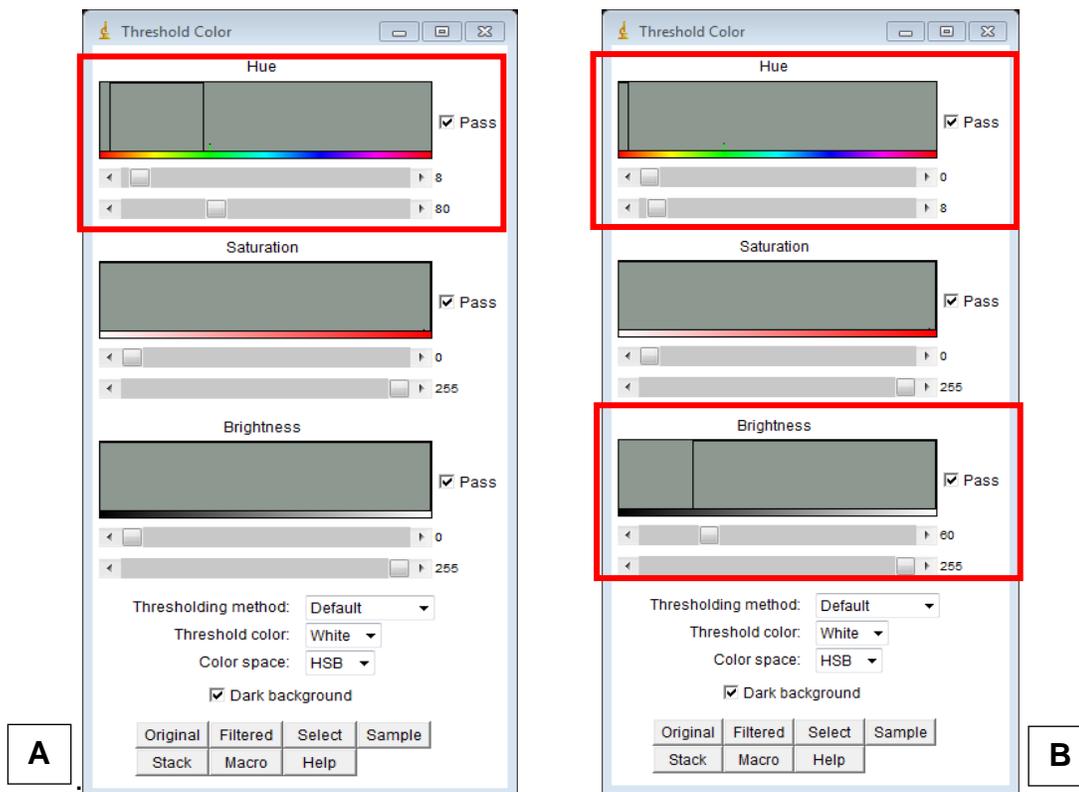


Figura 3. Ventana "Color Threshold". **A:** Selección para color amarillo. **B:** Selección para color rojo.

3.7. En la sección "Hue" se debe seleccionar el rango de color que se desea analizar. (En el ejemplo de la **Figura 2** -Análisis de superposición de imagen con el marcador anti NeuN en corteza cerebral y el anticuerpo Anti O-GlcNAcilación- la barra superior deberá estar en "8" y la inferior debe estar en "80" cuando se quiere seleccionar las células de color amarillo **Figura 3 A**, mientras que si se quiere seleccionar el color rojo la barra superior deberá estar en "0" y la inferior debe estar en "8" **Figura 3 B**).

3.8. Presione la opción "Select". (Nota: **Los pasos 3.8 a 3.13 se realizan independientemente para cada rango de color seleccionado**)

3.9. Presione la opción "Analyze", allí se desplegará una lista en la cual debe seleccionar la opción "Set Measurements", allí señalar las casillas que se muestran en la **Figura 4**, incluyendo la casilla "Decimal Places". Posteriormente presione "Ok".

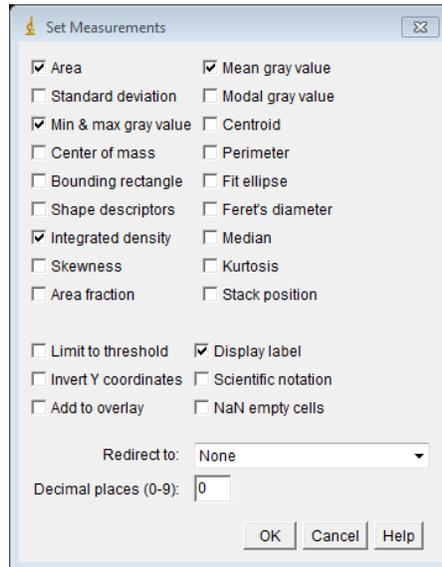


Figura 4. Ventana “Set Measurements”

3.10. Posteriormente presione la opción “**Analyze**” y en la lista desplegable seleccione “**Analyze Particles**”, se desplegará una ventana como la de la **Figura 5**. En esta ventana debe seleccionar el tamaño que de célula a analizar en la casilla “**Size**” (para análisis con el marcador anti NeuN en corteza cerebral se recomienda “**100-Infinity**” e igual para el caso de el anticuerpo Anti O-GlcNAcilación). Las demás casillas deben estar igual a las de la **Figura 5**. Posteriormente presionar “**Ok**”.

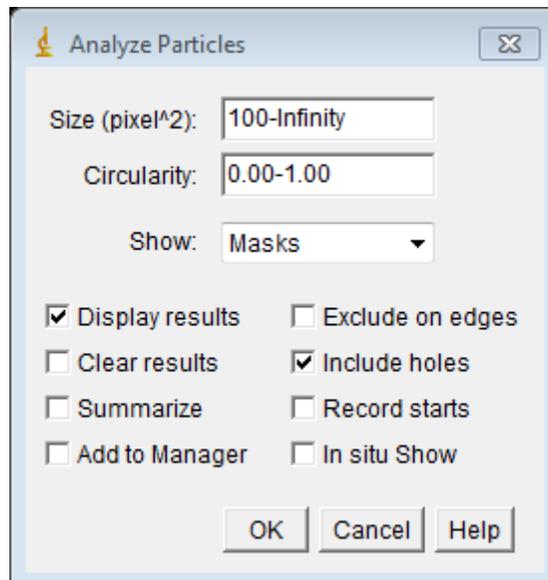
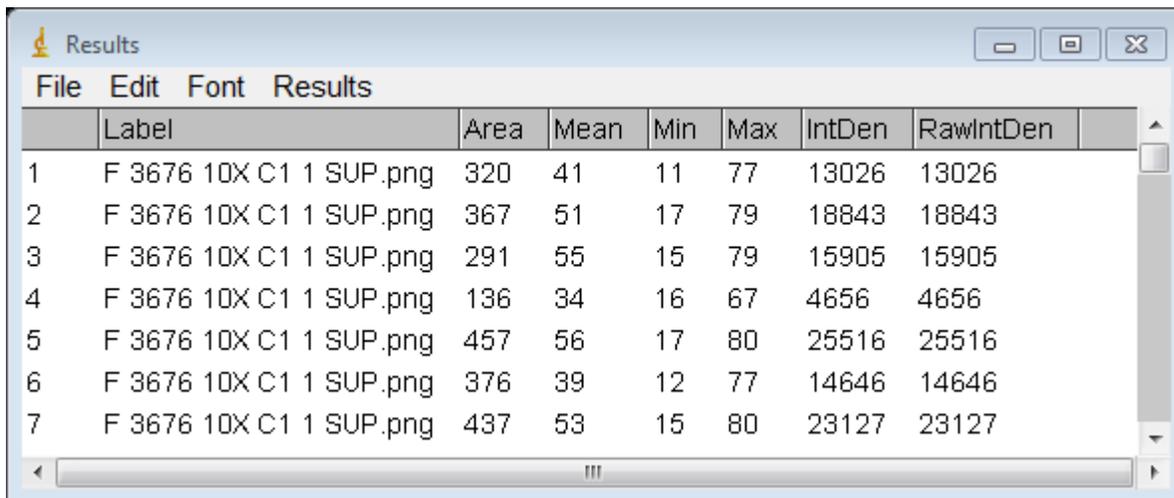


Figura 5. Ventana “Analyze Particles”

3.11. Al culminar el paso anterior le aparecerán dos ventanas, una con la máscara de las células analizadas y otra con la información del análisis. En la ventana de la información del análisis (**Figura 6**) se enumeran las células en la primera casilla y se da la intensidad de brillo en la casilla “IntDen”.



	Label	Area	Mean	Min	Max	IntDen	RawIntDen
1	F 3676 10X C1 1 SUP.png	320	41	11	77	13026	13026
2	F 3676 10X C1 1 SUP.png	367	51	17	79	18843	18843
3	F 3676 10X C1 1 SUP.png	291	55	15	79	15905	15905
4	F 3676 10X C1 1 SUP.png	136	34	16	67	4656	4656
5	F 3676 10X C1 1 SUP.png	457	56	17	80	25516	25516
6	F 3676 10X C1 1 SUP.png	376	39	12	77	14646	14646
7	F 3676 10X C1 1 SUP.png	437	53	15	80	23127	23127

Figura 6. Ventana "Results"

3.12. Los resultados de la **Figura 6** deben ser copiados a un archivo de Excel u otro software similar; para eso presione click sobre uno de los datos y posteriormente presione la combinación “**Ctrl+A**” (esto le permitirá seleccionar todos los datos). Posteriormente presione la combinación “**Ctrl+C**” o en la opción “**Edit**” seleccione “**Copy**” y luego con la combinación “**Ctrl+V**” pegue los datos en la hoja Excel.

3.13. Repita el paso 3.5, bajo la misma recomendación del consecutivo (Ejemplo: .2), para guardar la máscara del análisis.

Nota: La intensidad de la casilla “IntDen” cuando se realiza en análisis en las células doblemente marcadas no corresponde a la intensidad de la O-GlcNAcilación en dicha célula sino a la intensidad de la combinación de los colores. para determinar la intensidad en esas células se debe realizar lo siguiente.

3.14. Realizar el paso 3.1 para abrir la máscara creada al analizar el doble marcaje bajo la indicación de la **Figura 3 A**.

3.15. Presionar en la opción “**Image**” y en la ventana desplegable que se abrió, presionar “**Type**” y allí “**RGB Color**”.

3.16. Realizar el paso 3,6 pero esta vez siguiendo la **Figura 7**.



Figura 7. Ventana "Color Threshold"

3.16. Presionar **"Select"** y posteriormente el comando **"Ctrl+C"**.

3.17. Realizar paso 3.1 para abrir la imagen correspondiente al anticuerpo anti O-GlcNAc.

3.18. Al abrir la imagen presionar el comando **"Ctrl+V"** y posteriormente la tecla **"Back Space"** o **"Delete"**.

3.19. Guarde la imagen resultante siguiendo el paso 3.5.

3.20. Obtenga la intensidad deseada haciendo el análisis mostrado en el **"Protocolo para el análisis de intensidad de una señal en imágenes de inmunohistoquímica en el programa ImageJ"** en los pasos 3.7 a 3.14.

Análisis de datos

3.21. Para los análisis de superposición realizados, es de interés determinar el número de células que están marcadas con los dos anticuerpos y por eso se debe tener en cuenta el promedio de la cantidad de células marcadas en cada individuo

para posteriormente realizar análisis estadísticos que permitan determinar si existe o no diferencias significativas entre diferentes grupos de tratamiento.

3.22. También, si es de interés, se puede realizar los promedios del número e intensidad (casilla “**IntDen**”) de las células que solo están marcadas con un anticuerpo y de igual manera realizar análisis estadísticos que permitan determinar si existe o no diferencias significativas entre diferentes grupos de tratamiento.

5. SEGURIDAD

5.1. Conservar higiene postural y, de ser necesario, utilizar lentes que protejan de la luz durante largos periodos de análisis computacional de imágenes.

	Nombre	Firma	Fecha aprobación
Elaborado por:	Juan Pablo Castiblanco Salgado	J. Castiblanco	22.06.2017
Revisado por:	Carlos Cardozo Hernández	C. Cardozo	
Revisado por:	Juliana Rengifo Gómez	J. Rengifo	

Anexo 3. Tablas de resultados

Tabla 2. Resultados de medición de la Supervivencia Neuronal

A		B		C		D		E		F	
A377 0	8,3 3	B374 5	58,00	C368 5	92,67	D381 3	333,3 3	E368 4	391,0 0	F367 6	432,0 0
A374 4	27	B374 6	93,33	C377 7	263,0 0	D381 6	289,6 7	E404 0	358,3 3	F374 3	392,0 0
A369 4	8,3 3	B403 7	230,6 7	C381 5	400,6 7	D383 0	337,0 0	E404 1	357,0 0	F403 3	351,0 0

Tabla 3. Resultado de la medición de la Densidad óptica de O-GlcNAcilación Celular (Normalizada)

A		B		C		D		E		F	
A377 0	25,1 4	B374 5	0,00	C368 5	36,0 5	D381 3	67,1 5	E368 4	75,5 0	F367 6	149,8 8
A374 4	39,4 3	B374 6	31,2 8	C377 7	54,0 5	D381 6	53,4 1	E404 0	88,0 6	F374 3	87,09
A369 4	0,00	B403 7	41,1 1	C381 5	43,7 4	D383 0	68,6 3	E404 1	72,5 8	F403 3	63,03

Tabla 4. Resultado del conteo de Numero de neuronas vivas con O-GlcNAcilación

A		B		C		D		E		F	
A369 4	0,0 0	B374 5	0,00	C368 5	23,67	D381 3	210,6 7	E368 4	224,6 7	F367 6	319,3 3
A374 4	7	B374 6	22,0 0	C377 7	118,0 0	D381 6	147,6 7	E404 0	266,0 0	F374 3	312,0 0
A377 0	0,3 3	B403 7	62,6 7	C381 5	111,6 7	D383 0	204,0 0	E404 1	269,6 7	F403 3	213,6 7

Tabla 5. Resultado de Porcentaje de Neuronas vivas con O-GlcNAcilación.

A		B		C		D		E		F	
A3694	5,56	B3745	0,00	C3685	25,63	D3813	62,04	E3684	58,18	F3676	73,85
A3744	25,53	B3746	21,86	C3777	45,03	D3816	51,81	E4040	74,09	F3743	79,71
A3770	5,56	B4037	26,02	C3815	27,62	D3830	60,69	E4041	75,10	F4033	60,81

Tabla 6. Resultado de la medición de la Densidad óptica de O-GlcNAcilación Neuronal (Normalizada).

	A	B	C	D	E	F					
A369 4	0,00	B374 5	0,00	C368 5	38,9 9	D381 3	69,7 3	E368 4	77,7 3	F367 6	147,1 5
A374 4	45,4 8	B374 6	32,3 4	C377 7	57,2 3	D381 6	53,5 2	E404 0	91,3 1	F374 3	88,98
A377 0	8,09	B403 7	41,3 6	C381 5	45,1 2	D383 0	71,0 4	E404 1	73,3 2	F403 3	63,87

Tabla 7. Resultado de la medición de la Densidad óptica de O-GlcNAcilación en células no neuronales (Normalizada).

	A	B	C	D	E	F					
A369 4	0,00	B374 5	0,00	C368 5	3138, 62	D381 3	3694, 02	E368 4	4261, 27	F367 6	5831, 76
A374 4	2190, 51	B374 6	2877, 37	C377 7	3679, 48	D381 6	5192, 87	E404 0	6058, 73	F374 3	5670, 32
A377 0	990,5 0	B403 7	3770, 32	C381 5	2164, 98	D383 0	4414, 87	E404 1	5070, 54	F403 3	3577, 23

Anexo 4. Análisis estadístico

El tamaño de la muestra utilizado en esta investigación ($n=3$) hace necesario suponer que los datos no tienen una distribución normal y por tanto se deben utilizar pruebas estadísticas no paramétricas. Por lo anterior, para determinar si existen diferencias significativas en los diferentes grupos de estudio se utilizó inicialmente la prueba de comparación múltiple Kruskal-Wallis.

Hipótesis:

H_0 : todas las medianas de las poblaciones son iguales

H_a : todas las medianas de las poblaciones no son iguales

Criterio

Si el valor p es mayor a 0,05 se rechaza la hipótesis nula.

Posterior a la prueba Kruskal Wallis se realizó una prueba de Mann Withney con el fin de comparar los pares de interés:

Hipótesis:

H_0 : La mediana de la primera población es igual a la mediana de la segunda población.

H_a : La mediana de la primera población es menor que la mediana de la segunda población.

Nota: Las pruebas estadísticas anteriormente mencionadas se realizaron para todas las comparaciones expuestas en las Figuras 5 a 7 por lo tanto se seguirán los mismos supuestos y condiciones.

Supervivencia Neuronal

Kruskal-Wallis test	
P value	0,0213
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	6

Comparación Mann Whitney	P value	Exact or approximate P value?	P value summary	Are medians signif. different? (P < 0.05)	One- or two-tailed P value?
E vs F	0,3500	Exact	ns	No	One-tailed
A vs C	0,0500	Exact	*	Yes	One-tailed
B vs D	0,0500	Exact	*	Yes	One-tailed
F vs D	0,0500	Exact	*	Yes	One-tailed
F vs C	0,2000	Exact	ns	No	One-tailed

O-GlcNAcilación celular

Kruskal-Wallis test	
P value	0,0140
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	6

Comparación Mann Whitney	P value	Exact or approximate P value?	P value summary	Are medians signif. different? (P < 0.05)	One- or two-tailed P value?
E vs F	0,5000	Exact	ns	No	One-tailed
A vs C	0,1000	Exact	ns	No	One-tailed
B vs D	0,0500	Exact	*	Yes	One-tailed
F vs D	0,2000	Exact	ns	No	One-tailed
F vs C	0,0500	Exact	*	Yes	One-tailed

Análisis de superposición

Número de neuronas con O-GlcNAcilación

Kruskal-Wallis test	
P value	0,0083
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	**
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	6

Comparación Mann Whitney	P value	Exact or approximate P value?	P value summary	Are medians signif. different? (P < 0.05)	One- or two-tailed P value?
E vs F	0,3500	Exact	ns	No	One-tailed
A vs C	0,0500	Exact	*	Yes	One-tailed
B vs D	0,0500	Exact	*	Yes	One-tailed
F vs D	0,0500	Exact	*	Yes	One-tailed
F vs C	0,0500	Exact	*	Yes	One-tailed

% Neuronas con O-GlcNAcilación

Kruskal-Wallis test	
P value	0,0122
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	6
Kruskal-Wallis statistic	14,61

Comparación Mann Whitney	P value	Exact or approximate P value?	P value summary	Are medians signif. different? (P < 0.05)	One- or two-tailed P value?
E vs F	0,5000	Exact	ns	No	One-tailed
A vs C	0,0383	Exact	*	Yes	One-tailed
B vs D	0,0500	Exact	*	Yes	One-tailed
F vs D	0,1000	Exact	ns	No	One-tailed
F vs C	0,0500	Exact	*	Yes	One-tailed

Intensidad de O-GlcNAcilación Neuronal

Kruskal-Wallis test	
P value	0,0156
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	6

Comparación Mann Whitney	P value	Exact or approximate P value?	P value summary	Are medians signif. different? (P < 0.05)	One- or two-tailed P value?
E vs F	0,5000	Exact	ns	No	One-tailed
A vs C	0,2000	Exact	ns	No	One-tailed
B vs D	0,0500	Exact	*	Yes	One-tailed
F vs D	0,2000	Exact	ns	No	One-tailed
F vs C	0,0500	Exact	*	Yes	One-tailed

Intensidad de O-GlcNAcilación No Neuronal

Kruskal-Wallis test	
P value	0,0229
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	6

Comparación Mann Whitney	P value	Exact or approximate P value?	P value summary	Are medians signif. different? (P < 0.05)	One- or two-tailed P value?
E vs F	0,5000	Exact	ns	No	One-tailed
A vs C	0,2000	Exact	ns	No	One-tailed
B vs D	0,0500	Exact	*	Yes	One-tailed
F vs D	0,3500	Exact	ns	No	One-tailed
F vs C	0,1000	Exact	ns	No	One-tailed

Anexo 5. Carta de aprobación 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- α SOLUBLE vs. TNF- α SOLUBLE Y TISULAR EN EL TAMAÑO DE LA LESIÓN 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 Pardeazaba
Presidente
Comité de Ética de Investigaciones en Animales Experimentales

Anexo 6. Matriz de marco lógico

<p>Objetivo General: Determinar, para junio de 2017, el efecto del tratamiento con glucosamina previo a inducción de isquemia en corteza cerebral sobre la supervivencia neuronal en la zona de penumbra en un modelo animal de ratas Wistar a través de imágenes de inmunohistoquímica de fluorescencia con microscopía con focal.</p>			
Objetivo Especifico	Actividades	Supuesto	Indicador
<p>Establecer un protocolo a través del software ImageJ para medir intensidades de una señal, número de células y para hacer análisis de superposición.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Descarga e instalación del software gratuito. - Entrenamiento en el manejo del software. - Reconocer las estructuras celulares en las imágenes de corteza cerebral. - Desarrollar un manual de uso del software que permita medir intensidades de una señal, número de células y para hacer análisis de colocalización. 	<ul style="list-style-type: none"> - Comprensión optima de las estructuras celulares de la corteza cerebral. - Capacidad de corrección del análisis automático del software. 	<p>Protocolo de uso de ImageJ para medir intensidades de una señal, número de células y para hacer análisis de superposición.</p>
<p>Cuantificar tanto la intensidad de fluorescencia de RL2, que da información de la glicosilación tipo O-GlcNAc, como la supervivencia neuronal por medio de la señal de NeuN utilizando el software de análisis de imágenes de fluorescencia ImageJ entre los diferentes</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Codificación de imágenes. - Cuantificar a través del software el número de células vivas en el grupo con tratamiento previo de glucosamina y el que no recibieron tratamiento. 	<ul style="list-style-type: none"> - Imágenes de la corteza cerebral de alta definición que puedan ser detectadas por el software y el lector. 	<p>Promedios de neuronas vivas e intensidad de fluorescencia de RL2 (glicosilación O-GlcNAc) en el grupo con tratamiento previo de glucosamina y el que no recibió tratamiento.</p>

<p>grupos estudiados.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Cuantificar la intensidad de glicosilación tipo O-GlcNAc en el grupo con tratamiento previo de glucosamina y el que no recibieron tratamiento. - Establecer promedios de cada grupo. 		
<p>Determinar si existe asociación entre el tratamiento con glucosamina, el nivel de fluorescencia de RL2 y el número de neuronas detectadas por NeuN en corteza cerebral después de la inducción de isquemia.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Comparar mediante software estadístico la supervivencia celular entre los grupos que recibieron tratamiento previo con glucosamina y los que no lo tuvieron. - Comparar mediante software estadístico de la intensidad de glicosilación entre los grupos que recibieron tratamiento previo con glucosamina y los que no lo tuvieron. - Realizar análisis de superposición de las imágenes 	<ul style="list-style-type: none"> - Imágenes de la corteza cerebral de alta definición que puedan ser detectadas por el software y el lector. - Ambos marcadores fueron aplicados a cada uno de los cortes a analizar en las imágenes. 	<p>Comparación estadística (Prueba t-Student) de la intensidad de fluorescencia del anticuerpo RL2 que indica el nivel de glicosilación O-GlcNAc y el número de neuronas detectadas por NeuN en corteza cerebral de rata con tratamiento previo de glucosamina y las que no recibieron tratamiento.</p>

	<p>marcadas con anticuerpos NeuN y RL 2.</p> <ul style="list-style-type: none">- Determinar número de células neuronales que estén vivas y O-GlcNAcizadas en cada grupo.- Comparación con software estadístico de número de células vivas y O-GlcNAcizadas entre el grupo con tratamiento previo con glucosamina y el que no lo tuvo.		
--	--	--	--