

**Evaluación de la glicosilación tipo O-GlcNAc en el hipocampo de
rata sometida a isquemia cerebral focal**

Karime Danyely Victoria Zambrano

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
Santiago de Cali
2017

**Evaluación de la glicosilación tipo O-GlcNAc en el hipocampo de
rata sometida a isquemia cerebral focal**

Karime Danyely Victoria Zambrano

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO EN
PREGRADO EN Química Farmacéutica

Directora: Juliana Rengifo Gómez PhD, M Sc.
Co- Director: Carlos Fernando Cardozo Hernández, PhD (candidato)

Santiago de Cali
2016



APROBADO POR:

Alvaro Andrés Barrera

Álvaro Andrés Barrera PhD M Sc.
Evaluador.

Juliana Rengifo

Juliana Rengifo Gómez PhD M Sc.
Tutor del Proyecto.

CF. Cardozo H

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitirme la salud y la valentía que se necesitan para emprender el sueño de convertirme en una profesional. Agradezco a mi directora Juliana Rengifo Gómez y a mi co- Director Carlos Fernando Cardozo Hernández por su tiempo dedicado en la culminación de este proyecto y por guiar mis ideas en pro de alcanzar los mejores resultados. Agradezco a mi familia, en especial a mis padres Ana y Jesús, a mis hermanos Arleny y Efren y mis cuñados Edinson y Teresa por ser ese apoyo incondicional en tiempos de dificultades y por creer en mí y en mis capacidades, a ustedes dedico mis triunfos y espero poder darles muchas más alegrías.

Contenido

1. RESUMEN DEL PROYECTO	11
2. ABSTRACT	12
3. INTRODUCCIÓN	13
4. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO:	14
4.1 Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia:	14
5. Marco teórico y estado del arte:	15
5.1 Isquemia cerebral	15
5.2 Excitotoxicidad	16
5.3 Hipocampo cerebral	17
5.4 Fenómenos exofocales	18
5.5 Glicosilación tipo O-GlcNAc	20
5.6 Anticuerpos anti-NeuN y anti-O-GlcNAc	22
5.7 Modelos experimentales	23
5.8 Software ImageJ	24
6. Objetivos	24
6.1 Objetivo general.....	24
6.2 Objetivos específicos	25
7. Metodología utilizada	25
7.1 Biomodelos y procedimiento quirúrgico	25
7.2 Diseño experimental	26
7.3 Inmunofluorescencia	26
7.4 Obtención de imágenes por microscopía confocal de fluorescencia	27
7.5 Tratamiento de las imágenes por medio del software ImageJ	27
7.5.1 Separación de canales de color en imágenes	27
7.5.2 Conteo de neuronas marcadas con anti-NeuN	28
7.5.3 Conteo de neuronas marcadas con anti-O-GlcNAc (RL2) y cuantificación de intensidad de fluorescencia	30
7.5.4 Análisis de doble marcaje de neuronas con glicosilación tipo O-GlcNAc	31

7.6 Análisis estadístico	34
8. Matriz de marco lógico.....	35
9. Resultados	37
9.1 Conteo de neuronas marcadas con anti-NeuN.....	37
9.2 Conteo de neuronas marcadas con RL2 (anti-O-GlcNAc).....	39
9.3 Análisis de doble marcaje de neuronas con glicosilación tipo O-GlcNAc	41
9.3.1 Análisis de doble marcaje de neuronas con glicosilación tipo O-GlcNAc utilizando metodología 1	41
9.3.2 Análisis de doble marcaje de neuronas con glicosilación tipo O-GlcNAc utilizando metodología 2	42
9.3.3 Comparación de metodologías de análisis 1 y 2 en conteo de neuronas O-GlcNAcizadas.....	44
9.4 Comparación de metodologías de análisis 1 y 2 en conteo de células no neuronas O-GlcNAcizadas	44
9.5 Promedio de intensidad de glicosilación tipo O-GlcNAc en neuronas hipocampales según grupo de análisis	45
9.6 Comparación de intensidad de fluorescencia de glicosilación tipo O-GlcNAc en neuronas y células no neuronas según grupo de análisis	46
10. Discusión	46
11. Conclusiones	51
12. Recomendaciones	52
13. Bibliografía	52
14. Anexos	57

Lista de Tablas

Tabla 1. Grupos experimentales	26
---------------------------------------------	-----------

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Número de neuronas marcadas con anti-NeuN obtenido en análisis de imágenes obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia mediante la técnica de inmunohistoquímica.....	37
Gráfico 2. Número de neuronas marcadas con anti-NeuN según área de hipocampo en análisis de imágenes obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia mediante la técnica de inmunohistoquímica.....	39
Gráfico 3. Número de neuronas marcadas con RL2 (anti-O-GlcNAc) según área de hipocampo en análisis de imágenes obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia mediante la técnica de inmunohistoquímica	40
Gráfico 4. Porcentaje de neuronas O-GlcNAcizadas según grupo experimental utilizando metodología 1 para el análisis de doble marcaje en imágenes obtenidas por microscopia confocal de fluorescencia mediante la técnica de inmunohistoquímica.....	41
Gráfico 5. Porcentaje de neuronas O-GlcNAcizadas según grupo experimental utilizando metodología 2 para el análisis de doble marcaje en imágenes obtenidas por microscopia confocal de fluorescencia mediante la técnica de inmunohistoquímica.....	43
Gráfico 6. Comparación de metodologías 1 y 2 en la determinación del porcentaje de neuronas O-GlcNAcizadas según grupo experimental para el análisis de doble marcaje en imágenes obtenidas por microscopia confocal de fluorescencia mediante la técnica de inmunohistoquímica.....	44
Gráfico 7. Comparación de metodologías 1 y 2 en la determinación del porcentaje de células no neuronas O-GlcNAcizadas según grupo experimental para el análisis de doble marcaje en imágenes obtenidas por microscopia confocal de fluorescencia mediante la técnica de inmunohistoquímica.....	45
Gráfico 8. Intensidad de glicosilación tipo O-GlcNAc en neuronas hipocampales según grupo de análisis en imágenes obtenidas por microscopia confocal de fluorescencia mediante la técnica de inmunohistoquímica	45
Gráfico 9. Comparación de intensidad de fluorescencia de glicosilación tipo O-GlcNAc en neuronas y células no neuronas hipocampales según grupo de análisis en imágenes obtenidas por microscopia confocal de fluorescencia mediante la técnica de inmunohistoquímica	46

Lista de Figuras

Figura 1. Accidente cerebrovascular isquémic.....	16
Figura 2. Estructuras de formación hipocampal	17
Figura 3. Conexiones del hipocampo.	19
Figura 4. Vía de las hexosaminas.	20
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).....	22
Figura 6. Esquema del MCAO donde se observa el filamento en la ACI hasta bloquear el origen de la ACM	24
Figura 7. Separación de las imágenes en canales de color.....	27
Figura 8. Selección del comando subtract Background para limpieza de fondo de imagen.	28
Figura 10. Separación de neuronas por medio de la opción de trazado con lápiz.	29
Figura 11. Conteo de neuronas marcadas con anti-NeuN.....	30
Figura 12. Obtención de resultados de conteo de neuronas marcadas con anti-NeuN.....	30
Figura 13. Composición de la imagen para visualización de neuronas O-GlcNAc según metodología 1.	31
Figura 14. Selección de las neuronas con glicosilación tipo O-GlcNAc para la metodología 1.	32
Figura 15. Separación de canales de color de la imagen según metodología 1. (A) Selección del comando para la separación de los canales de color. (B) Visualización de los canales de color de la imagen.	33
Figura 16. Composición de la imagen para la visualización de las neuronas con glicosilación O-GlcNAc según metodología 2. (A) Selección del comando para superposición de los canales de color. (B) Ventaja emergente para la superposición de las imágenes. (C) Imagen superpuesta.....	33
Figura 17. Selección de las neuronas con glicosilación tipo O-GlcNAc para la metodología 2.	34
Figura 18. Imágenes representativas de los grupos experimentales para el marcaje de neuronas con anti-NeuN. Imágenes en escala 10x.	38
Figura 19. Imágenes representativas para los grupos experimentales en el conteo de células marcadas con anti O-GlcNAc. Imágenes en escala 10x.	40
Figura 20. Imágenes representativas para el conteo de neuronas O-GlcNAc según grupo experimental usando la metodología 1..	42
Figura 21. Imágenes representativas para el conteo de neuronas O-GlcNAc según grupo experimental usando la metodología 2..	43

Lista de Anexos

Anexo 1. Prueba de normalidad para el promedio de células marcadas con anti-NeuN.....	57
Anexo 2. Prueba Kruskal-Wallis para el promedio de neuronas marcadas con anti-NeuN.....	57
Anexo 3. Prueba de Kruskal-Wallis para el número de neuronas marcadas con anti-NeuN según región de hipocampo.....	57
Anexo 4. Prueba Kruskal-Wallis para el promedio de células marcadas con anti-O-GlcNac.....	58
Anexo 5. Test de Kruskal-Wallis para el porcentaje de neuronas O-GlcNAcizadas según metodología 1.....	58
Anexo 6. Test de Kruskal-Wallis para el porcentaje de neuronas O-GlcNAcizadas según metodología 2.....	58
Anexo 7. Test de Kruskal-Wallis para la comparación de metodologías 1 y 2 en conteo de neuronas O-GlcNAcizadas.....	58
Anexo 8. Test de Kruskal-Wallis para la comparación de metodologías 1 y 2 en conteo de células no neuronas O-GlcNAcizadas.....	59
Anexo 9. Test de Kruskal-Wallis para el promedio de intensidad de glicosilación tipo O-GlcNAc en neuronas hipocámpales según grupo de análisis.....	59
Anexo 10. Test de Kruskal-Wallis para la comparación de intensidad de fluorescencia de glicosilación tipo O-GlcNAc en neuronas y células no neuronas según grupo de análisis.....	59
Anexo 11. Test de Mann-Whitney para la comparación de intensidad de fluorescencia de glicosilación tipo O-GlcNAc en neuronas y células no neuronas según grupo de comparación.....	59
Anexo 12. Carta de aprobación del comité de ética.....	61
Anexo 13. Presupuesto del proyecto.....	62

1. RESUMEN DEL PROYECTO

El presente trabajo de grado está enmarcado en un proyecto investigativo en el área de neurociencias desarrollado en la Universidad Icesi, orientado en la comprensión de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares (ECV) como la isquemia cerebral. En la actualidad se carece de fármacos especializados cuya efectividad esté comprobada en atenuar la pérdida neuronal en las diferentes fases de la cascada isquémica, siendo una de ellas la excitotoxicidad en la región directamente afectada por la obstrucción de la arteria y los fenómenos exofocales que afectan a regiones alejadas del territorio irrigado por el vaso obstruido. Dicho fenómeno implica una serie de eventos moleculares, bioquímicos y fisiológicos que desencadenan la muerte celular programada de neuronas, siendo el hipocampo de gran importancia debido a su función en la memoria y el aprendizaje. Investigaciones de grupos externos y del grupo de fisiología celular animal de la Universidad Icesi, han demostrado que la administración de glucosamina en biomodelos como las ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) desencadena la O-GlcNAcilación o glicosilación tipo O-GlcNAc de proteínas citoplásmicas en neuronas, lo cual se ha relacionado con mayores niveles de supervivencia celular. En la actualidad estudios no están del todo desarrollados, y son muchas las hipótesis bajo las cuales se cree que la O-GlcNAcilación media en la citoprotección de neuronas en la isquemia cerebral.

En este proyecto se pretende evaluar si la glicosilación tipo O-GlcNAc funciona como un mecanismo de neuroprotección en el área de hipocampo cerebral de ratas sometidas a isquemia cerebral focal. Lo anterior se logra evaluando si el tratamiento con glucosamina induce glicosilación tipo O-GlcNAc en el área de hipocampo posterior a un evento de isquemia cerebral focal, además de determinar el papel neuroprotector de dicha modificación post-traducciona en los fenómenos exofocales ocurridos en el hipocampo. Tales hipótesis fueron debatidas en base a resultados del análisis de imágenes de cortes cerebrales de la región de hipocampo de ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) distribuidas en seis grupos de estudio. Dichas imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia y, fueron estudiadas por medio del uso del software ImageJ, el cual permite determinar la supervivencia neuronal por medio del conteo de este tipo de células que fueron inmunomarcadas con anti-NeuN para el marcaje de células vivas. Por otra parte, se realizó el conteo de neuronas marcadas con RL2 (anti-O-GlcNAc), así como la cuantificación del nivel de fluorescencia del mismo. Una vez obtenidos los resultados de conteo de neuronas marcadas con anti-NeuN y las células O-GlcNAcizadas, se determinó el porcentaje de neuronas O-GlcNAcizadas por medio de dos metodologías de análisis. Asimismo se comparó dicho porcentaje con el de células no neuronas O-GlcNAcizadas y se compararon los promedios de intensidad de fluorescencia de O-GlcNAcilación en neuronas y células no neuronas. Los resultados obtenidos permiten inferir que el tiempo de sobrevivencia de seis horas debe ampliarse con el fin de proporcionar a las células hipocámpales un estímulo de estrés apreciable que desencadene fenómenos exofocales.

Palabras clave: O-GlcNAcilación, Isquemia cerebral, Hipocampo, Fenómenos exofocales, Neuroprotección.

2. ABSTRACT

The present work is defined in a research project in the area of neurosciences developed in the University Icesi, orientated in the understanding of new therapeutic strategies for the treatment of cerebral cerebrovascular diseases (ECV) like cerebral ischemia. At present, there is a lack of specialized drugs whose effectiveness is proven to attenuate the neuronal loss in the different phases of the ischemic cascade, one of them is the excitotoxicity in the region directly affected by the obstruction of the artery and the exofocales phenomena that affect Regions far from the territory irrigated by the obstructed vessel. This phenomenon involves a series of molecular, biochemical and physiological events that trigger programmed cell death of neurons, being the hippocampus of great importance due to its function in memory and learning. Research from external groups and from the Animal Cell Physiology Group at Icesi University have shown that the administration of glucosamine in biomodels such as Wistar rats (*Rattus norvegicus*) triggers the O-GlcNAcylation or O-GlcNAc type glycosylation of cytoplasmic proteins in neurons, which has been associated with higher levels of cell survival. At present, these studies are not fully developed, and there are many hypotheses under which O-GlcNAcylation is thought to mediate cytoprotection of neurons in cerebral ischemia.

This project intends to evaluate if the glycosylation type O-GlcNAc functions as a mechanism of neuroprotection in the cerebral hippocampal area of rats subjected to focal cerebral ischemia. This is achieved by evaluating if glucosamine treatment induces glycosylation type O-GlcNAc in the hippocampus area after an event of focal cerebral ischemia, in addition to determining the neuroprotective role of this post-translational modification in the exofocales phenomena occurring in the hippocampus. Such hypotheses were debated based on results from the analysis of brain cortex images of the hippocampal region of Wistar rats (*Rattus norvegicus*) distributed in six study groups. These images were obtained by confocal fluorescence microscopy and were studied through the use of ImageJ software, which allows the determination of neuronal survival by counting of these cells that were immunolabelled with anti-NeuN for the labeling of live cells. On the other hand, the account of neurons marked with RL2 (anti-O-GlcNAc) was made, as well as the quantification of the level of fluorescence of the same. Once the counting results of neurons labeled with anti-NeuN and O-GlcNAcylated cells were obtained, the percentage of O-GlcNAcylated neurons was determined by means of two analysis methodologies. This percentage was also compared to that of non-O-GlcNAcylated cells and the fluorescence intensity averages of O-GlcNAcylation in neurons and non-neuron cells were compared. The obtained results allow to infer that the time of survival of six hours should be extended in order to provide hippocampal cells with a stimulus of appreciable stress that triggers exofocales phenomena.

Keywords: O-GlcNAcylation, Cerebral ischemia, Hippocampus, Exofocal phenomena, Neuroprotection.

3. INTRODUCCIÓN

Los accidentes cerebrovasculares (ACV) son descritos como la interrupción del flujo sanguíneo circulatorio al cerebro, ya sea de origen isquémico, el cual representa el 80% de los casos, o de origen hemorrágico, en el 15% de los casos reportados (Matilde, Mcgrath, & Gaviria, 2007). Actualmente los ACV constituyen uno de los problemas más importantes de la neurología, teniendo en cuenta que son las enfermedades con mayor aparición a nivel mundial, además de caracterizarse por su elevada tasa de muerte, minusvalía y discapacidad, lo cual repercute considerablemente a nivel social, psicológico y económico (González, Luis, Miranda, & Caridad, 2015). A lo anterior se le suma el hecho de que se carece de tratamientos farmacológicos con efecto citoprotector a nivel neuronal, pues en la actualidad los fármacos de elección para el tratamiento de los ACV son de tipo anticoagulantes, antiagregantes plaquetarios, entre otros, los cuales están dirigidos a mejorar o reestablecer el flujo sanguíneo circulatorio (Egido et al., 2014). Por lo anterior, uno de los objetivos de investigación en neurociencias es la búsqueda de nuevas estrategias farmacológicas con efecto neuroprotector que puedan contribuir en el mejoramiento de la calidad de vida de los pacientes.

Investigaciones realizadas en cardiomiocitos han reportado que el aumento en los niveles de glicosilación tipo O-GlcNAc están asociados a un mayor nivel de supervivencia celular, lo cual confiere a las células una mejor respuesta a los diferentes estímulos de estrés celular (Zachara et al., 2004). En base a lo anterior se han liderado investigaciones con el fin de evaluar si este efecto citoprotector se observa a nivel neuronal en regiones cerebrales como el hipocampo, el cual presenta un daño secundario debido a que se encuentra alejado del foco isquémico pero conectado sinápticamente, lo cual se conoce como fenómenos exofocales (Medina & Escobar, 2010). La importancia de este tipo de estudios en regiones como el hipocampo cerebral subyace en que se ha demostrado que el daño neuronal puede afectar procesos como el almacenamiento de la memoria, el reconocimiento de objetos, la orientación espacial, entre otros efectos a nivel cognitivo que deterioran la función cerebral gravemente (Solís & López Hernández, 2009).

El presente proyecto busca evaluar si la glicosilación tipo O-GlcNAc actúa como un mecanismo citoprotector a nivel neuronal ante los fenómenos exofocales en el área de hipocampo cerebral de ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) sometidas a isquemia cerebral focal, mediante la cuantificación de neuronas de hipocampo cerebral y la evaluación de los niveles de glicosilación tipo O-GlcNAc en fotos obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia, todo ello por medio del uso del software ImageJ.

4. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO:

4.1 Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia:

Según la definición de la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades cerebrovasculares (ECV) son un síndrome clínico de una duración mayor a 24 horas, tiempo en el cual se genera un compromiso de las funciones cerebrales normales del individuo (Moyano V, 2010). Los datos epidemiológicos reportan que la enfermedad cerebrovascular, junto con las enfermedades cardiovasculares y el cáncer son las principales causas de muerte en países desarrollados (Silva, Zarruk, Quintero, Arenas, & Silva, 2006). Adicionalmente, se estima que el porcentaje de pacientes que mueren antes de recibir atención médica oscila entre el 10% y el 40% (Silva et al., 2006). En Latinoamérica la incidencia para las ECV se reporta entre 0,89-1,83/1000, mientras que su prevalencia se encuentra entre un rango de de 1,7 a 6,5/1000 (Silva et al., 2006). En Colombia, la mortalidad por enfermedades cerebrovasculares ocupa el cuarto lugar. Los altos índices de mortalidad, junto con su alta tasa de recurrencia, discapacidad e impacto sobre la calidad de vida de los individuos hacen que adelantar investigaciones en esta área sea de gran importancia (Silva et al., 2006).

Actualmente las ECV son clasificadas según su origen, ya sea de tipo hemorrágico o isquémico. En cuanto a la isquemia cerebral, esta es originada por la obstrucción de alguna arteria que irriga al cerebro, limitando la circulación sanguínea y por tanto el aporte de oxígeno necesario para procesos vitales de las neuronas comprometidas. Lo anterior puede ser agravado con la presencia de factores de riesgo como la hipertensión arterial, dislipidemias, diabetes, alteraciones del ritmo cardíaco, tabaquismo, obesidad y sedentarismo, o incluso trastornos de origen genético que generen debilidad en la pared arterial, alteraciones de la cascada de coagulación o defectos en las cavidades cardíacas (Díaz, 2016).

Entre los tratamientos empleados en la isquemia cerebral se encuentra el uso de antiangregantes plaquetarios, anticoagulantes orales y procedimientos quirúrgicos como endarterectomía carotídea, angioplastia transluminal percutánea de carótida, anastomosis extra-intracraneal y tratamiento endovascular intracraneal (Fuentes et al., 2014). El mecanismo de acción de estas estrategias terapéuticas e intervenciones se limita al origen vascular de la isquemia cerebral, no considerando los eventos celulares moleculares y bioquímicos asociados a la muerte celular programada causada en la cascada isquémica. De esta manera, un tratamiento más efectivo para la prevención y atenuación de la pérdida neuronal asociada a un evento isquémico debe basarse principalmente en la neuroprotección, es decir, en limitar o prevenir el daño de tejido nervioso causado por procesos de apoptosis o excitotoxicidad (Fernández-Gómez et al., 2008).

En la búsqueda de tratamientos dirigidos a moléculas específicas en la cascada isquémica que vayan más allá de la disolución del trombo sanguíneo, se han dilucidado algunos mecanismos por medio de los cuales la glicosilación tipo O-

GlcNAc podría ejercer un efecto citoprotector a nivel neuronal posibilitando la disminución de la muerte celular, lo cual sienta las bases para futuras investigaciones (Ngho, Facundo, Zafir, & Jones, 2010).

No obstante, los mecanismos a través de los cuales la O-GlcNAcilación logra dicho efecto no son comprendidos en su totalidad y, aún no se tiene completo conocimiento de si dicha modificación neuronal puede prevenir el daño tisular inducido por fenómenos exofocales en regiones cerebrales como el hipocampo o favorecer la recuperación de neuronas tras el restablecimiento del flujo sanguíneo o reperfusión. Por consiguiente, en este proyecto se hará un análisis inicial con el fin de evidenciar si la administración de glucosamina vía intraperitoneal ejerce algún efecto en el aumento de la glicosilación tipo O-GlcNAc en neuronas de hipocampo cerebral de ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) previa a la inducción de isquemia cerebral y posterior reperfusión. Se espera de esta manera aportar parte del conocimiento necesario para establecer nuevas estrategias de tratamiento para la isquemia cerebral, enfermedad que por su epidemiología es de relevancia para la investigación en el área de neurociencias en Colombia y el mundo.

5. Marco teórico y estado del arte:

5.1 Isquemia cerebral

Los accidentes cerebrovasculares de tipo isquémico son producidos por la obstrucción de una o más arterias que irrigan al cerebro, ya sea por el desprendimiento de coágulos procedentes del corazón o vasos sanguíneos o por la formación de trombos en las paredes arteriales que imposibilitan el flujo sanguíneo y por tanto la oxigenación adecuada del tejido cerebral (Díaz, 2016). Asimismo, especialmente en pacientes jóvenes, la isquemia cerebral puede producirse debido a factores genéticos que originan defectos a nivel vascular, como disecciones arteriales, debilidad de las paredes arteriales o, en otros casos, alteraciones de la coagulación sanguínea (Díaz, 2016).

La reducción del aporte de oxígeno a las células, el cual es importante para la realización de sus procesos vitales, puede desencadenar la muerte celular de dos maneras. En primer lugar está la muerte necrótica, en la cual la depleción energética contribuye a la pérdida de morfología celular y posterior lisis celular, lo cual genera un proceso inflamatorio. En segundo lugar está la muerte celular programada, o apoptosis, ocasionada por la activación de mecanismos intracelulares que conllevan a la degradación celular sin producir una reacción inflamatoria (Arango-Davila, Escobar-Betancourt, Cardona-Gómez, & Pimienta-Jiménez, 2004). Dichas vías de muerte celular son causadas por la interrupción del flujo sanguíneo circulatorio en un área vascular determinada, lo que afecta el aporte de oxígeno y nutrientes como la glucosa, importantes en el metabolismo energético. Lo anterior impide a las células mantener su potencial de membrana y conservar sus propiedades eléctricamente excitables. Posteriormente, si la isquemia continúa se

activan mecanismos moleculares como la liberación indiscriminada de neurotransmisores, entrada y salida de iones, formación de edemas y activación de hidrolasas que desencadenan la muerte celular necrótica en el área de infarto (Sosa et al., 2008).

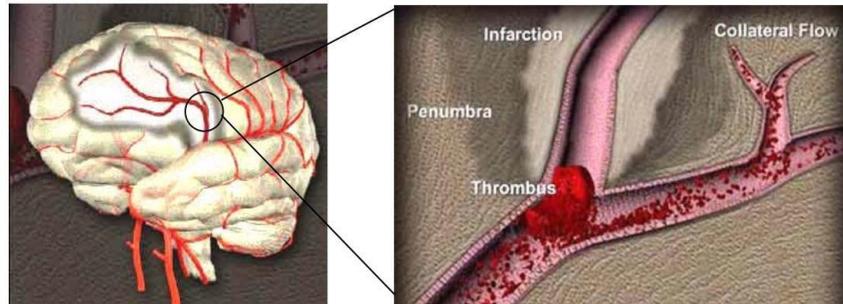


Figura 1. Accidente cerebrovascular isquémico (Badiola Nahuai Benito, 2008).

El restablecimiento del flujo sanguíneo y por tanto de la oxigenación cerebral es un proceso conocido como reperfusión. Éste puede ir acompañado de varios fenómenos como el aumento de radicales libres de oxígeno y por tanto la peroxidación lipídica de la membrana celular, la oxidación de proteínas y rotura del ADN; reentrada masiva de calcio a la célula que genera alteraciones en el acoplamiento excitación-contracción, aumento en la permeabilidad de membrana y la inhibición de la síntesis de ATP; acidosis intracelular a causa de la liberación de iones hidrógeno debido al inicio de un metabolismo anaeróbico y la producción de ácido láctico; acumulación neutrófilos y monocitos que pueden liberar sustancias tóxicas y desencadenar un proceso de inflamación; activación plaquetaria e inducción de trombosis, con riesgo de reoclusión de vasos sanguíneos; daño tisular por formación de radicales libres tras la acumulación de óxido nítrico y alteraciones a nivel metabólico que implican la disminución de la fosforilación oxidativa y por tanto de los niveles de ATP (Férez, Márquez, & Peña, 2016).

5.2 Excitotoxicidad

Dentro de la cascada isquémica se encuentra la secreción de sustancias citotóxicas al espacio extracelular en las uniones sinápticas, caracterizada por la liberación indiscriminada de neurotransmisores, iones y especies reactivas de oxígeno, lo cual genera estrés oxidativo y agrava la lesión isquémica y el daño neuronal (Osuna-Zazueta, Ponce-Gómez, & Pérez-Neri, 2015). En el mecanismo de excitotoxicidad confluyen diferentes tipos celulares y componentes del sistema nervioso (Miller, Maletic, & Raison, 2010).

Inicialmente, la microglía es el receptor inicial de las señales inflamatorias que llegan al cerebro. Ésta a su vez activa una cascada inflamatoria con la subsecuente liberación de citocinas, mediadores inflamatorios, quimiocinas y especies reactivas de oxígeno, lo cual a su vez induce la activación de la astrogía, encargada de amplificar dichas señales inflamatorias en el sistema nervioso central (Miller et al.,

2010). Dichas citocinas activan la enzima indoleamina 2,3 dioxigenasa o IDO, la cual hidroliza el precursor primario de serotonina (5-HT) o triptófano (TRP), a ácido quinolínico (QUIN), agonista NMDA y estimulador de liberación de glutamato. A causa de la sobreexposición a QUIN y a las especies reactivas de oxígeno, se ve afectada la recaptación de glutamato. Adicionalmente, la oligodendroglía sufre lesión debido a la exposición a dichas sustancias ya mencionadas, lo cual produce su muerte celular por apoptosis y desmielinización (Miller et al., 2010). Así, el exceso de glutamato, la activación de receptores NMDA y el daño a la oligodendroglía desencadenan estrés oxidativo a nivel neuronal y muerte celular por excitotoxicidad (Miller et al., 2010).

5.3 Hipocampo cerebral

El sistema nervioso está conformado por múltiples sistemas interconectados organizados en diferentes niveles, dentro de los cuales se encuentran estructuras corticales y subcorticales cuya agrupación se conoce como sistema límbico. Dicho sistema está conformado por el hipocampo, el parahipocampo, amígdala, hipotálamo, núcleo anterior del tálamo, entre otros. En cuanto al hipocampo cerebral, éste se encuentra a nivel del lóbulo temporal y está conformado por el cuerno de Amón, el giro dentado y el subículo. En el cuerno de amón se encuentran las bandas CA1, CA2, CA3 y CA4 del hipocampo (Fig.2) (Escobar & Pimienta, 2006). Con respecto a dichas regiones, se conoce que las células piramidales de las regiones CA2 y CA3 son más largas que las de la región CA1 y además que los cuerpos celulares de las áreas CA2 y CA3 son del mismo tamaño aproximado y su área de superficie es mayor que la de las células de la región CA1 (López Hernández & Solís, 2012). Adicionalmente, en el hipocampo cerebral se pueden distinguir células no neuronales como astrocitos, oligodendrocitos, microglía y células de Schwann (Bustamante Zuleta, 2007).

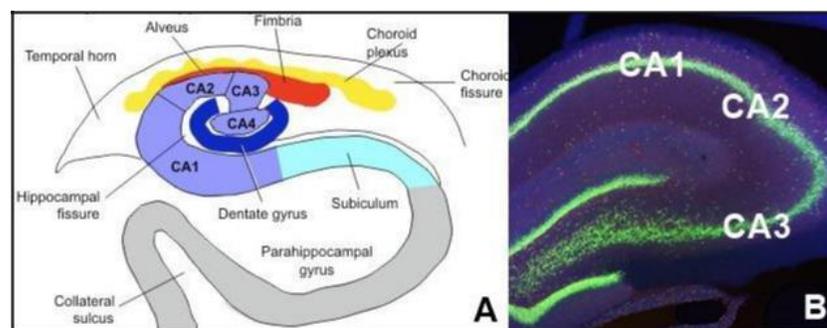


Figura 2. Estructuras de formación hipocampal. (Ramaswamy, 2014). (A) Anatomía del hipocampo. (B) Regiones de hipocampo localizadas en corte sagital obtenido por microscopía confocal de fluorescencia (Cardozo Hernández, 2017).

En cuanto a su función, por medio de evidencia clínica se ha determinado que el hipocampo cerebral participa de manera importante en los procesos de adquisición

de memoria declarativa o explícita y de memoria no declarativa o implícita. La primera se asocia con la capacidad del individuo para comunicarse de manera verbal o no verbal y recordar experiencias previas, rostros, nombres, hechos, entre otros. En cuanto a la segunda, ésta se concibe por medio de la repetición de actividades o hábitos que realice el individuo. También se asocia el hipocampo con otras funciones como el reconocimiento de objetos y la orientación espacial (Solís & López Hernández, 2009).

Estudios realizados en animales utilizando el modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) han revelado que la región CA1 presenta una mayor susceptibilidad a estímulos de estrés, lo cual se dilucida a través de una menor supervivencia celular (Tanya L Butler, Kassed, Sanberg, Willing, & Pennypacker, 2002). Investigadores han explicado dicho comportamiento en base a que un desbalance en la actividad inhibitoria y excitatoria debido a la disminución de células que tienen somatostatina conduce a un incremento de la actividad excitatoria en las células de la región CA3, lo cual conlleva a una liberación exagerada de impulsos de la región CA3 a la región CA1, con el consecuente daño neuronal de dicha región (Escobar & Pimienta, 2006). Las dendritas de las células piramidales de la región CA1 reciben estímulos provenientes de la región CA3, y se ha observado que el deterioro de esta conexión debido a la muerte neuronal produce un deterioro en la memoria (Unda Velazco, 2015). Por tal razón el daño a nivel de la región CA1 compromete en gran medida las funciones normales del hipocampo cerebral. En la actualidad la región CA1 es una de las más estudiadas dado que ésta presenta la población neuronal más homogénea, las entradas intrínsecas y extrínsecas están bien diferenciadas y las células piramidales se encuentran dispuestas en capas definidas (Zilágyi, Is, & Orváth, 2011).

5.4 Fenómenos exofocales

La muerte celular generada tras la interrupción de la irrigación sanguínea puede producirse tanto de manera temprana (durante cortos tiempos de oclusión arterial) o por la muerte retardada de neuronas susceptibles en regiones vecinas al foco isquémico. Por tanto, debido a que se pueden generar procesos de necrosis o apoptosis celular en tiempo prolongado, dichas neuronas tienen potencial de ser recuperadas por medio de estrategias farmacológicas (T L Butler, Kassed, Sanberg, Willing, & Pennypacker, 2002).

A nivel del hipocampo cerebral se pueden distinguir cuatro tipos principales de conexiones, éstas son aferentes, intrínsecas, comisurales y eferentes. Las fibras aferentes proceden de la corteza cerebral y estructuras subcorticales. Las fibras intrínsecas conectan con el mismo hipocampo. Las fibras comisurales conectan áreas del hipocampo específicas y las eferentes conectan el hipocampo con otras estructuras cerebrales (Fig. 3) (Escobar & Pimienta, 2006). Dichas conexiones nerviosas de tipo aferente y eferente se conocen como diasquisis o deaferentación y conectan el hipocampo con regiones periféricas al foco isquémico (Sánchez Chávez, 1999). El descubrimiento de tales conexiones permite explicar el hecho de

que algunas manifestaciones clínicas no se relacionan directamente con el foco isquémico y que además el grado de daño cerebral y funcional no siempre corresponde con la localización o el tamaño de dicha lesión (Dávila, Escobar, & Buriticá, 2017).

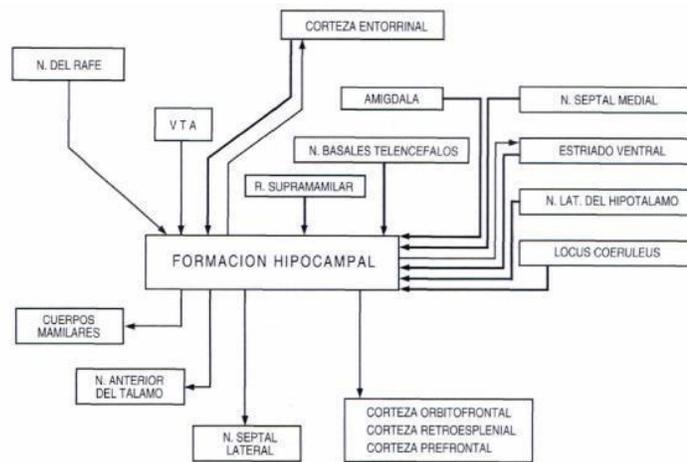


Figura 3. Conexiones del hipocampo (Escobar & Pimienta, 2006).

Cuando dichas conexiones son afectadas por medio de la lesión isquémica se producen cambios transinápticos o transneurales conocidos como fenómenos exofocales, los cuales pueden presentarse por la variación de los patrones de conectividad o diasquisis; señales eléctricas o químicas generadas por alteración en la expresión de receptores de neurotransmisores o incremento de la cantidad de los mismos, respectivamente; y cambios adaptativos en las estructuras cerebrales remotas al área de infarto debido a la reorganización del tejido cerebral tras la pérdida significativa de neuronas, lo cual incluye cambios estructurales, fisiológicos y neuroquímicos (César A. Arango-Dávila, Escobar, Buriticá, & Pimienta, 2008).

Un estudio realizado en animales empleando el modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) ha relevado que la degeneración de neuronas en el hipocampo se presenta entre 12 horas y 7 días después de la inducción de isquemia, con un pico de muerte neuronal de 4 días, con un tiempo de inducción de isquemia de 60 minutos (Tanya L Butler et al., 2002). Adicionalmente, en un estudio realizado por investigadores de la Universidad del Valle en el cual se evaluó el efecto neuroprotector de los estrógenos en ratas hembras a las cuales se les indujo isquemia cerebral por el MCAO, se encontró que la muerte neuronal hipocámpal se presentó después de tres días después de la inducción de isquemia cerebral (César A. Arango-Dávila et al., 2008). Dichos datos son de importancia a la hora de determinar el tiempo de sobrevivencia en la realización de estudios en el hipocampo cerebral.

5.5 Glicosilación tipo O-GlcNAc

La glicosilación tipo O-GlcNAc puede definirse como una modificación postraduccional que se da en proteínas citoplásmicas, nucleares y mitocondriales tras la adición de una molécula de N-Acetilglucosamina o GlcNAc al enlace hidroxilo de un aminoácido serina o treonina en la vía de las hexosaminas (Ngoh et al., 2010). En dicha adición participa la enzima uridina difosfato-N-acetilglucosamina: péptido β -N-acetilglucosamil transferasa u OGT, la cual cede la molécula de monosacárido, mientras que el retiro de la molécula GlcNAc lo produce la enzima β -N-acetilglucosaminidasa o O-GlcNAcase (Fig. 4). Debido a que la modulación de la O-GlcNAcilación es realizada por dichas dos enzimas hace que se diferencie de otras modificaciones como la fosforilación, en la cual participan alrededor de 600 proteínas quinasas y fosfatasa. No obstante, a pesar de tener dos enzimas en su modulación, la glicosilación tipo O-GlcNAc es ubicua, es decir, muchas proteínas sufren dicha modificación postraduccional (Ngoh et al., 2010), siendo las células de tipo neuronal las que presentan mayor nivel de glicosilación O-GlcNAc según estudios realizados en los que se encontró mayor expresión de las proteínas OGT y O-GlcNAcase, las cuales regulan el proceso de O-GlcNAcilación, en neuronas hipocampales (Akimoto et al., 2003).

Estudios realizados en cardiomiocitos han revelado que existe una correlación entre la administración de glucosamina y los niveles de glicosilación tipo O-GlcNAc, por lo cual se emplea dicho fármaco con el fin de realizar estudios en los que se busque evaluar los efectos del aumento de dicha modificación postraduccional (Champattanachai, Marchase, & Chatham, 2007). Asimismo, en células mamarias y cardíacas se ha observado que estímulos de estrés aumentan el nivel de O-GlcNAcilación en proteínas citoplásmicas y nucleares, aunque los mecanismos que subyacen en dicho proceso no son conocidos en su totalidad. Inicialmente, en diferentes investigaciones se plantea que el mecanismo de citoprotección se debe al aumento en la expresión de proteínas de choque término 70 (HSP70) (Champattanachai, Marchase, & Chatham, 2008). Dichas proteínas aumentan la supervivencia celular ante estímulos de estrés como lo son las altas temperaturas, además de participar en otras funciones como el plegamiento y translocación de proteínas, activación de factores de transcripción o quinasas, señalización proteica, presentación antigénica, entre otras (Carmelo, Zurita, González, Martínez, & Valladares, 2006).

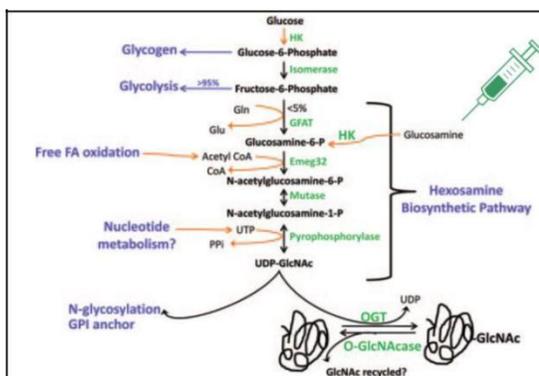
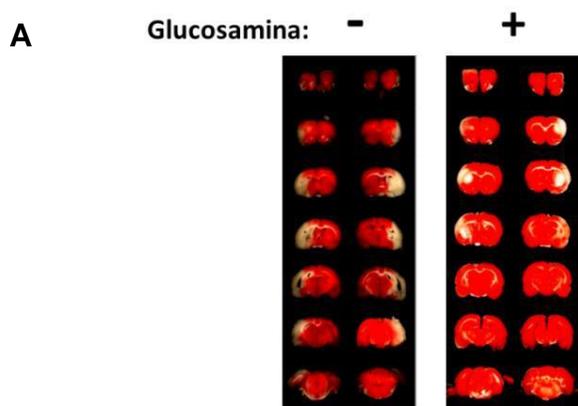


Figura 4. Vía de las hexosaminas. (Ngoh et al., 2010).

Por otra parte, otros estudios muestran que la O-GlcNacilación actúa aumentando la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 (Champattanachai et al., 2008), cuya función es la de regular la permeabilidad mitocondrial en la vía intrínseca de la apoptosis celular, junto con otras funciones como la formación del poro mitocondrial (Paola, Shubach, & Galindo, 2015). Además se plantea que esta modificación tiene un efecto de supresión transcripcional de genes proinflamatorios, lo cual se observa incluso después de 3 horas de realizar la reperfusión, indicando un proceso de retraso de daño neuronal post-isquémico. Es así como se ha observado la inhibición de la actividad del factor kappaB (NFkB) (Hwang et al., 2010), el cual está relacionado con la expresión de genes que participan en reacciones inflamatorias, adhesión celular y apoptosis celular. Otro mecanismo por el cual se cree que la O-GlcNacilación tiene un efecto citoprotector es por medio de la regulación de STIM1 (Molécula de interacción del estroma 1) (Zhu-mauldin, Marsh, Zou, Marchase, & Chatham, 2012), la cual es una proteína localizada en el lumen del retículo endoplásmico cuya función se relaciona con el mantenimiento de los niveles de calcio intracelular, factor importante en el mantenimiento de la homeostasis celular (Oh-hora et al., 2009).

De la misma forma, estudios han dilucidado que la O-GlcNacilación confiere citoprotección a cardiomiocitos a través de la atenuación de la formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP), evitando así la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (A. Ngoh, J. Watson, T. Facundo, & P. Jones, 2012). Asimismo, autores plantean que la O-GlcNacilación participa en la regulación de canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC) en las mitocondrias, lo cual también contribuye en la regulación del potencial eléctrico celular (A. Ngoh, J. Watson, T. Facundo, & P. Jones, 2011). Estos datos son confirmados con exámenes clínicos en modelos biológicos de ratas en los que se observa una disminución del déficit neurológico y motor (Bodemer, Smahi, Courtois, Rabia, & Do, 2002). De igual manera, en un estudio realizado en la Universidad Icesi empleando animales y el modelo MCAO para la inducción de isquemia cerebral, se observó una disminución del tamaño de infarto cerebral con el tratamiento de glucosamina aplicada en dosis única peritoneal de 200mg/Kg (Fig. 5) (Vera González, 2016).



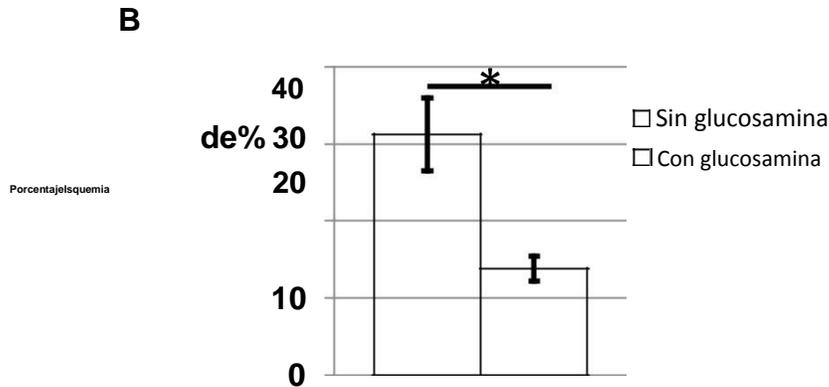


Figura 5. Tamaño del infarto evaluado con TTC, reactivo que destaca en blanco el tejido muerto que no se tiñe de rojo, a las 24 horas de inducida la isquemia en el modelo de isquemia cerebral focal en ratas Wistar MCAO (Middle cerebral artery occlusion). (A) Cor Cortes coronales de cerebro de ratas a las que se les indujo isquemia con reperusión, 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).

En la actualidad diferentes investigaciones se están liderando con el fin de evaluar la hipótesis de que la glicosilación tipo O-GlcNAc pueda estar mediando en la citoprotección de neuronas como las localizadas a nivel de hipocampo, región cerebral relacionada con la memoria y el aprendizaje tanto a corto como a largo plazo y cuyo deterioro ocasiona trastornos a nivel cognitivo (Olivares, Juárez, & García, 2015). El conocimiento sobre los eventos moleculares desencadenados en la penumbra isquémica y los cambios exofocales observados en áreas lejanas al infarto hace que la búsqueda de tratamientos farmacológicos para la isquemia cerebral se centre en el restablecimiento del flujo sanguíneo circulatorio y en la obtención de un efecto neuroprotector que permita prevenir y mitigar el daño tisular y promover la recuperación de neuronas como tratamiento post-isquemia (Fernández-Gómez et al., 2008).

5.6 Anticuerpos anti-NeuN y anti-O-GlcNAc

La microscopía de fluorescencia ha sufrido un impulso en la última década con el desarrollo de la microscopia confocal (MC) y el descubrimiento de proteínas fluorescentes denominadas también como fluoróforos, los cuales pueden conjugarse con moléculas como anticuerpos (Samaniego, 2009). Entretanto la microscopia convencional de fluorescencia genera imágenes con luz fuera de foco, la MC selecciona de manera óptica secciones de la muestra y genera imágenes que

corresponden a los planos de foco (Samaniego, 2009). Gracias a eso la MC es una herramienta útil en la visualización de células, tejidos u órganos para realizar estudios morfológicos o comparativos de proteínas en células vivas, realizar reconstrucciones 3D a partir de secciones confocales o estudiar de manera dinámica proteínas con el uso de videomicroscopía (Samaniego, 2009).

Dentro de los anticuerpos utilizados en estudios de morfología y función cerebral se encuentran los anticuerpos anti-NeuN y anti-O-GlcNAc. En cuanto al anti-NeuN, este es un antígeno nuclear neuronal presente sólo en neuronas y no en otros tipos celulares (Herculano-Houzel, 2005), lo cual implica que dicha marcación sea específica y no se marquen células gliales o estructuras vasculares. La reactividad de anti-NeuN en la célula se da principalmente donde existe una baja densidad de cromatina y se excluyen regiones con ADN altamente empaquetado. Además, el anticuerpo NeuN es una fosfoproteína, por tanto la unión al anticuerpo depende del estado de fosforilación, el cual se ve alterado en la isquemia cerebral. De esta manera, la disminución en la cuantificación de anti-NeuN en células es un indicativo de pérdida neuronal por procesos de necrosis y apoptosis (César Augusto Arango-Dávila, Ospina, Castaño, Potes, & Prieto, 2016). Por otro lado, los anticuerpos monoclonales RL2 son obtenidos a partir de células hepáticas de ratas y, son utilizados en la detección de moléculas O-GlcNAc ligadas por medio del reconocimiento de la O-Unión de la glucosamina ligada a grupos serina y treonina de proteínas de células en un variado grupo de especies como mamíferos, gusanos, plantas, hongos e insectos (RL2: sc-59624," n.d.) (Sayeski & Kudlow, 1996). Así, la cuantificación de los niveles de RL2 indica la presencia de O-GlcNAcilación y por tanto su medición sirve para determinar si existe aumento de ésta en eventos de isquemia cerebral ("O-GlcNAc (RL2): sc-59624," n.d.).

5.7 Modelos experimentales

En la actualidad existe un gran uso de modelos experimentales para el estudio de mecanismos de neuroprotección y caracterización de genes y proteínas relacionadas con la lesión por enfermedades cerebrovasculares como la isquemia cerebral. Gran parte de los modelos de isquemia cerebral focal comprenden la oclusión de vasos sanguíneos cerebrales principales, por ejemplo la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) en animales pequeños como ratas Wistar, lo cual contribuye a la reducción del flujo sanguíneo circulatorio en el lugar de la oclusión ya sea permanente o temporal (reperfusión) (Fig. 6). Una variación de la MCAO implica la oclusión de la arteria carótida común, la cual se oculta temporalmente y se permite el flujo sanguíneo en un punto posterior (Traystman, 2003).

Por otro lado, el modelo fotoquímico MCAO supone la irradiación de diferentes ramas de la arteria cerebral media con un láser de argón después de la administración de un colorante fotosensible por vía intravenosa, a lo cual le sigue la realización de una craneotomía. Otro modelo de isquemia cerebral focal incluye la introducción de coágulos sanguíneos a través de un Cateter ubicado en la arteria carótida. Finalmente, otro procedimiento simple y menos invasivo es el uso de un

filamento intraluminal, el cual implica la inserción de un filamento de nylon en la arteria carótida interna para bloquear el flujo sanguíneo en la arteria cerebral media. De esta manera, cuando se retira dicho nylon se produce la reperfusión (Traystman, 2003). En el presente proyecto se empleará el modelo MCAO junto con la inserción de un filamento de nylon para el bloqueo de la irrigación sanguínea.

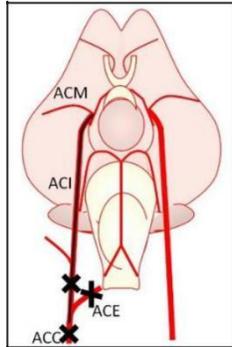


Figura 6. Esquema del MCAO donde se observa el filamento en la ACI hasta bloquear el origen de la ACM (ACC: arteria carótida común; ACE: arteria carótida externa; ACI: arteria carótida interna; ACM: arteria cerebral media) (Subirós Martínez et al., 2012).

5.8 Software ImageJ

ImageJ es un software para el procesamiento de imágenes médicas, imágenes obtenidas por microscopía y ciencias de materiales, entre otras, disponible para descarga gratuita (Rasband, 1997). El software incluye más de 400 plugins organizados en submenús con diferentes opciones que proporcionan funcionalidad y practicidad al programa. Éste permite trabajar con un amplio formato de archivos estándar, los cuales se están actualizando y ampliando frecuentemente. También cuenta con la capacidad de procesamiento de análisis de intensidad de fluorescencia, lo cual permite seleccionar umbrales de color, lo cual es útil para el análisis de cortes histológicos. Una gran ventaja es la capacidad de ImageJ en realizar análisis de co-localización, en el cual se pueden realizar enfoques específicos a imágenes obtenidas por ejemplo, por medio de microscopía confocal de fluorescencia y sobrelapar imágenes obtenidas con señales diferentes dentro del mismo campo o muestra, lo cual facilita la realización de estudios comparativos y morfológicos en células (Collins, 2007).

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Evaluar si la glicosilación tipo O-GlcNAc funciona como mecanismo neuroprotector ante cambios exofocales en el área de hipocampo cerebral de ratas sometidas a isquemia cerebral focal.

6.2 Objetivos específicos

Cuantificar neuronas de hipocampo de ratas sometidas a isquemia cerebral en fotos obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia.

Evaluar los niveles de glicosilación tipo O-GlcNAc en el hipocampo de ratas sometidas a isquemia cerebral focal.

Analizar si la glicosilación tipo O-GlcNAc permite la recuperación de neuronas hipocampales de ratas después de un evento de isquemia cerebral.

7. Metodología utilizada

7.1 Biomodelos y procedimiento quirúrgico

Las imágenes de microscopía confocal de fluorescencia que serán analizadas en el proyecto fueron obtenidas en un estudio previo realizado por el grupo de investigación en fisiología celular animal de la Universidad Icesi. El procedimiento experimental fue evaluado y autorizado por el Comité de Ética de Investigaciones en Animales Experimentales del Centro Internacional de Investigaciones Médicas (CIDEIM) y la Universidad Icesi (Cardozo Hernández, 2013).

En el estudio los investigadores utilizaron ratas Wistar de una edad promedio de 12 meses y peso promedio de 350 gramos, mantenidas en el bioterio de la Universidad Icesi hasta el momento de su sacrificio. Previa a la inducción de isquemia cerebral se les fue aplicada una dosis de 200mg/Kg de glucosamina vía intraperitoneal. Posteriormente, dichos biomodelos se sometieron al modelo experimental de MCAO para la inducción de isquemia cerebral durante 90 minutos por medio de la inserción de un filamento de nylon a través de la arteria carótida y su posterior retiro para promover reperfusión. Dicho procedimiento quirúrgico fue realizado en el Laboratorio de Microcirugía de la Universidad Icesi empleando un microscopio de cirugía Carl Zeiss. Los biomodelos fueron anestesiados mediante una dosis de inducción de 5% de isoflurano y una dosis de mantenimiento de entre 1,5% y 3,0%. La monitorización de la temperatura rectal, presión arterial, frecuencia cardíaca y actividad respiratoria fue realizada por los investigadores mediante el sistema Physitemp BAT-12, el sistema IITC (Rat and Mouse Blood Pressure Amplifier, Manual Inflation), electrodos epidérmicos en extremidades y electrodos epidérmicos en la base de la caja torácica, respectivamente. El tiempo de sobrevida desde el inicio de la isquemia fue de 6 horas. Posteriormente fue realizada una evaluación neurológica basada en el test de García para valorar la inducción de isquemia

cerebral. Finalmente, los investigadores realizaron el sacrificio de los biomodelos y extracción de los cerebros para posterior análisis (Cardozo Hernández, 2013).

7.2 Diseño experimental

Se realizó el siguiente diseño experimental con un n=3 por cada grupo de estudio, con un total de 3 imágenes de hipocampo por individuo obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia. Tales imágenes corresponden a las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo. Se realizó el análisis comparativo de los grupos A y C, B y D, y E y F. La selección del tamaño de la muestra se realizó en base al principio de las tres R's de Russel y Burch, el cual busca minimizar al máximo el uso de animales en experimentación y garantizar las condiciones necesarias para evitar su sufrimiento (Hernández, 2010).

- (A) Isquemia sin reperfusión, sin tratamiento de glucosamina.
- (C) Isquemia sin reperfusión, con tratamiento de glucosamina.
- (B) Isquemia con reperfusión, sin tratamiento de glucosamina.
- (D) Isquemia con reperfusión, con tratamiento de glucosamina.
- (F) Control sin isquemia y sin glucosamina.
- (E) Control sin isquemia y con glucosamina.

Tabla 1. Grupos experimentales

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

7.3 Inmunofluorescencia

Posterior a la extracción de los cerebros de los biomodelos se realizó la inmersión de los mismos en paraformaldehído previo a la realización de los cortes histológicos coronales del cerebro que contuviera hipocampo cerebral para su incubación con los anticuerpos NeuN de ratón (1:100; Clon A60; Millipore, No. de catálogo MAB377) para el marcaje neuronal y, anticuerpo RL2 de conejo (1:100; Thermo Scientific, No. de catálogo MA1-072), específico para detección de glicosilación tipo O-GlcNAc. Como marcador nuclear se empleó DAPI (Dilución 1:1000). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron AlexaFluor555 anti-ratón y alexafluor633 anti-cabra, obtenidos en burro, a una dilución de 1:500. Se analizó un corte cerebral por individuo de estudio (Cardozo Hernández, 2013).

7.4 Obtención de imágenes por microscopía confocal de fluorescencia

Las imágenes fueron obtenidas por medio de un microscopio confocal de fluorescencia marca Zeiss LSM700 ubicado en la Universidad del Valle. Se obtuvo un total de 3 imágenes por individuo para el análisis de cantidad de neuronas en el hipocampo y la intensidad de fluorescencia del anticuerpo RL2 (anti-O-GlcNAc).

7.5 Tratamiento de las imágenes por medio del software ImageJ

A continuación se detalla el procedimiento de análisis de las imágenes por medio del software ImageJ (Cardozo Hernández, 2013)

7.5.1 Separación de canales de color en imágenes

La separación de los canales de color de las imágenes a analizar es un procedimiento previo al conteo neuronal y a la determinación de la intensidad de fluorescencia de la glicosilación tipo O-GlcNAc. Este procedimiento permite diferenciar las células que presentan marcaje de color verde (Fig. 7B), característico del marcador anti-NeuN, y las células marcadas en color rojo (Fig. 7A, característico del marcador O-GlcNAc. Para ello se empleó el software LSM Image Browser.

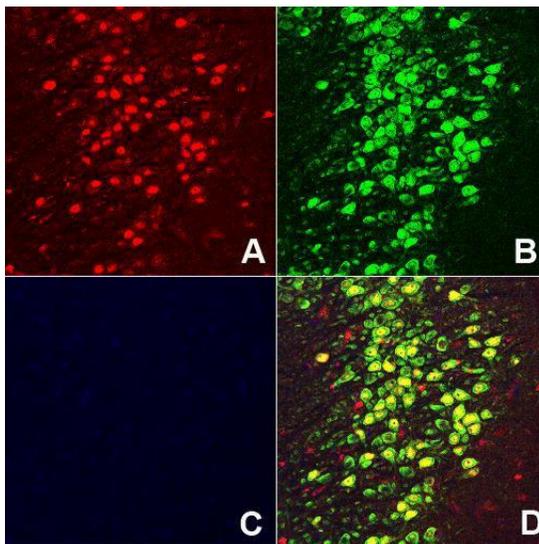


Figura 7. Separación de las imágenes en canales de color. (A) Visualización del marcador de O-GlcNAc. (B) Visualización del marcador de anti-NeuN. (C) Visualización del marcados Dapi. (D) Imagen original del Laboratorio de Fisiología Celular Animal de la Universidad Icesi. Escala de imagen 10x.

7.5.2 Conteo de neuronas marcadas con anti-NeuN

Paso 1. Posterior a la separación de las imágenes en canales de color se procedió a realizar el conteo de neuronas marcadas con anti-NeuN empleando las imágenes de coloración verde fluorescente. Para ello se visualizó la imagen por medio del software ImageJ y en la opción *Process* de la barra de opciones se seleccionó la opción *Subtract Background*. Esto permite realizar un barrido del fondo de la imagen con el fin de eliminar ruido (Fig 8B).

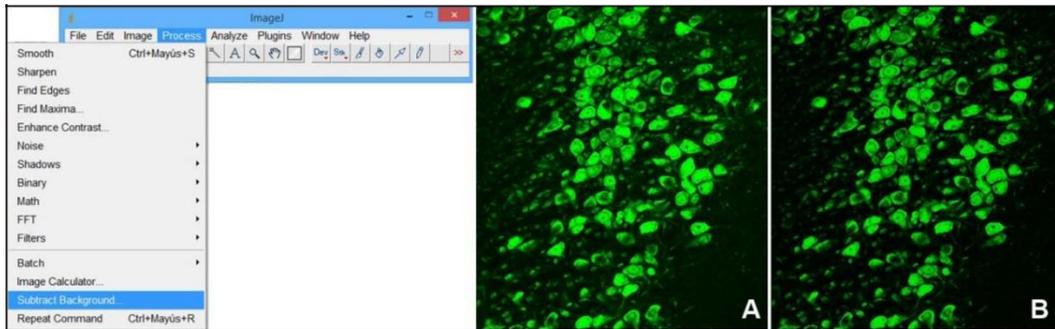


Figura 8. Selección del comando *subtract Background* para limpieza de fondo de imagen. (A) Imagen original de marcador de anti-NeuN. (B) Imagen posterior al barrido de fondo.

Paso 2. Posteriormente se realiza un barrido de fondo de la imagen más riguroso con el fin de eliminar partículas de tamaño despreciable que pueden interferir en el conteo neuronal. Para ello se seleccionó la opción *Image*, seguida de la opción *Adjust* y posteriormente la opción *Color Threshold* (Fig. 9A). Al realizar este procedimiento surge una ventana en la cual se observa una curva denominada *Brightness*, la cual corresponde al brillo de la imagen. Por medio del movimiento de la barra inferior se selecciona el punto de brillo correspondiente al punto de inflexión aproximado de la curva. Posteriormente se selecciona la opción *Select* para realizar selección del fondo de la imagen. Se presiona a tecla *Delete* del computador para eliminar el fondo (Fig 9B).

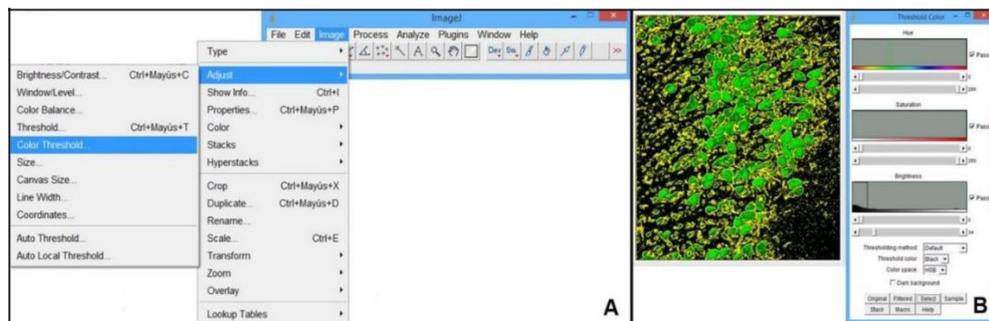


Figura 9. Selección del fondo de la imagen. (A) Selección del comando *Color Threshold* para selección del fondo de la imagen. (B) Ventana de *Color Threshold* para selección de brillo de la imagen y fondo.

Paso 3. Una vez realizado este proceso se elimina ruido de fondo y se permite una mejor visualización de las células neuronales. Debido a la alta densidad de neuronas muchas de estas pueden verse superpuestas o muy cercanas, por lo cual al momento de realizar el conteo neuronal pueden contarse varias células como una sola. Para separar dichas neuronas se seleccionó un icono en forma de lápiz en la segunda barra de opciones, realizando doble click se selecciona el grosor y color del lápiz (Fig. 10A). En este caso se empleó un grosor número 2. Se utiliza el lápiz por medio de trazos para separar las células y permitir una mejor visualización (Fig. 10B).

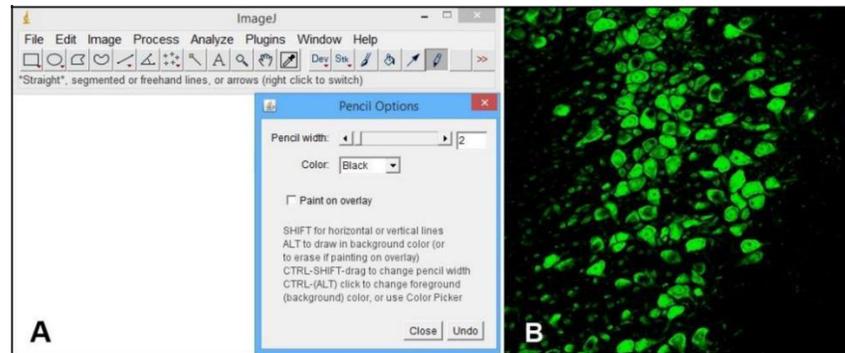


Figura 10. Separación de neuronas por medio de la opción de trazado con lápiz. (A) Selección del lápiz, grosor y color del trazo. (B) Imagen obtenida una vez separadas las neuronas con el lápiz.

Paso 4. Una vez eliminado el ruido de fondo y visualizando las neuronas separadas y bien diferenciadas se procede al conteo neuronal. Para ello nuevamente se seleccionan las opciones *Image<Adjust<Color Threshold*. En la ventana emergente se seleccionaron las células por medio del arrastre de la segunda barra hacia su máximo valor, el cual corresponde a 255, mientras que la primera barra se *selecciona en un valor igual a 1*. Una vez realizado esto, se *selecciona la opción Select* para realizar selección de las células (Fig. 11A). Posteriormente se selecciona la opción *Analyze*, y posteriormente *Analyze particles* (Fig. 11B). En la ventana emergente se determina el tamaño de partícula a contar, este es de 500-infinity, se selecciona la opción *Masks* en la barra de *Show* y adicionalmente se seleccionan las opciones *Display results* y *Include holes* (Fig. 11C). La visualización de la máscara permite observar las neuronas y determinar y se encuentran bien diferenciadas.

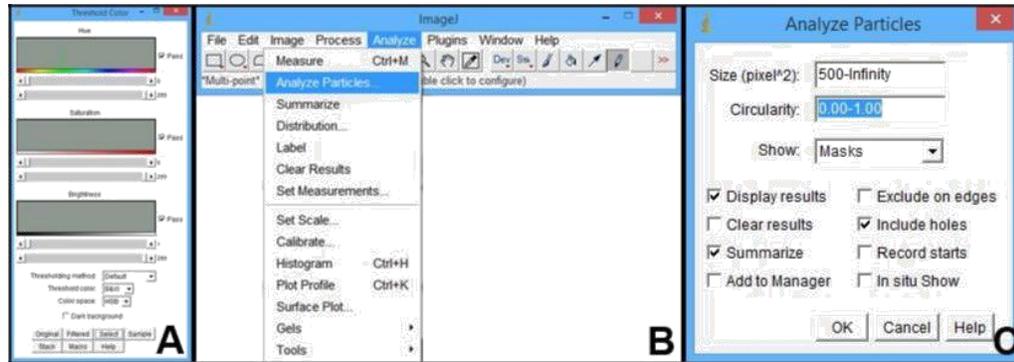


Figura 11. Conteo de neuronas marcadas con anti-NeuN. (A) Ventana de para la selección de las neuronas marcadas con anti-NeuN. (B) Comando de selección para el conteo de partículas. (C) Ventana de selección de tamaño de partícula, visualización de máscara y de resultados de conteo y fluorescencia.

Una vez realizado este procedimiento, se observa la máscara de la imagen (Fig. 12A) y los resultados del conteo neuronal. En la ventana emergente con los resultados se encuentran los datos de número de partículas (neuronas) contabilizadas y la intensidad de fluorescencia, entre otros datos como el área de la partícula (Fig 12B). Para guardar cada uno de los pasos realizados se selecciona la opción *File*, seguida de la opción *Save As...* y se guarda en formato *PNG* (Fig. 12C). Para copiar los datos obtenidos del conteo neuronal de selecciona la opción *File*, seguida de la opción *Copy*.

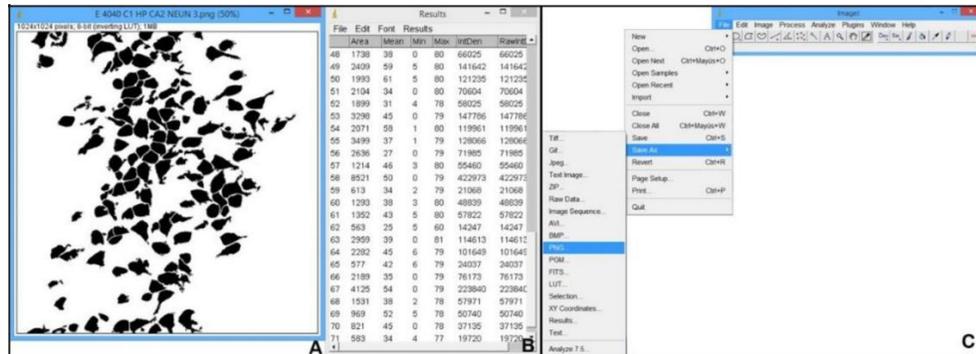


Figura 12. Obtención de resultados de conteo de neuronas marcadas con anti-NeuN. (A) Máscara de imagen. (B) Resultados de conteo de neuronas e intensidad de fluorescencia. (C) Procedimiento para guardar imágenes en formato PNG.

7.5.3 Conteo de neuronas marcadas con anti-O-GlcNAc (RL2) y cuantificación de intensidad de fluorescencia

El procedimiento para el conteo de neuronas marcadas con RL2 y la cuantificación de la intensidad de fluorescencia es el mismo realizado para el conteo de neuronas marcadas con anti-NeuN.

7.5.4 Análisis de doble marcaje de neuronas con glicosilación tipo O-GlcNAc

El análisis de doble marcaje de neuronas con glicosilación tipo O-GlcNAc se realizó en base a dos metodologías. La primera metodología se realizó en base a trabajos previos del Grupo de Investigación de Fisiología Celular Animal de la Universidad Icesi (Cardozo Hernández, 2013). La segunda metodología se realizó en base a literatura reportada en el sitio web del software ImageJ (ImageJ, 2017).

7.5.4.1 Análisis de doble marcaje de neuronas con glicosilación tipo O-GlcNAc utilizando metodología 1

Paso 1. Se seleccionan las dos imágenes correspondientes a los canales verde y rojo para los marcadores anti-NeuN y RL2 (anti-O-GlcNAc), respectivamente (Fig. 13A). Posteriormente se seleccionó la opción **Image** de la barra de herramientas, seguida de la opción *Overlay* y posteriormente la opción *Add Selection...* (Fig. 13B). En la ventana emergente se selecciona la imagen de anti-NeuN en la barra Image to add, mientras que en la barra de *Opacity* se selecciona una opacidad de 50. Se debe hacer click en la opción *Zero transparent* (Fig. 13C). Finalmente tras este paso se observa una imagen compuesta por los dos canales de color, en la cual se visualizan las neuronas O-GlcNAcizadas (Fig. 13D).

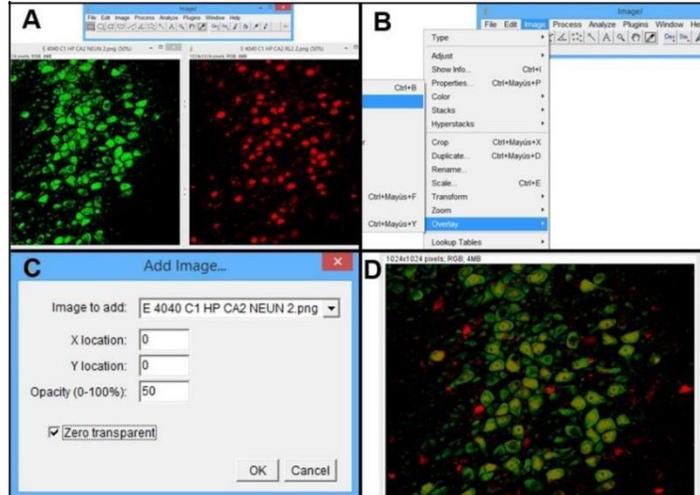


Figura 13. Composición de la imagen para visualización de neuronas O-GlcNAcizadas según metodología 1. (A) Selección de imágenes de anti-NeuN y RL2 (anti-O-GlcNAc). (B) Comandos para la superposición de las imágenes. (C) Ventana de selección para la superposición de las imágenes. (D) Imágenes superpuestas.

Paso 2. Se realiza el procedimiento detallado en la figura 12C para guardar la imagen compuesta por ambos canales de color.

Paso 3. Se realiza el procedimiento descrito en la figura 9A.

Paso 4. En la ventana emergente de Treshold Color (Fig 14) se selecciona en las primeras barras de la opción *Hue* un rango de color de entre 15 en la barra superior y 65 en la barra inferior. Esto se realiza con el fin de seleccionar las neuronas de coloración entre naranja y amarillo, colores característicos de las neuronas glicosiladas. En la opción *Brightness*, la barra superior debe estar en un valor de 0 y la barra inferior en un valor de 255. Finalmente en la opción *Threshold Color* se selecciona el color blanco con el fin de visualizar las neuronas glicosiladas. Se selecciona el comando *Select* para seleccionar las neuronas.

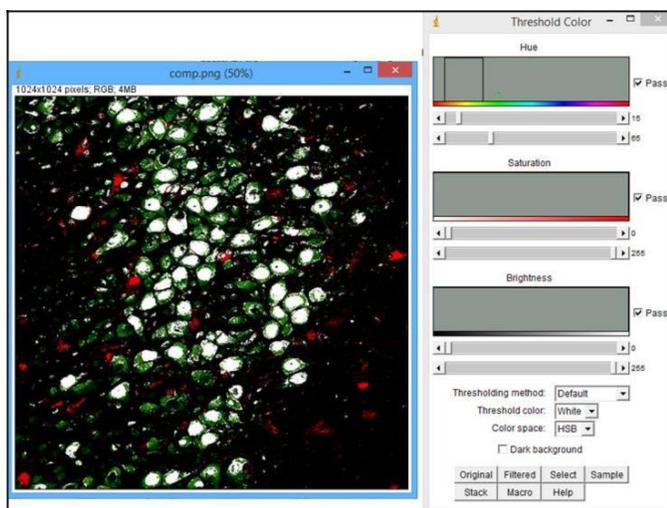


Figura 14. Selección de las neuronas con glicosilación tipo O-GlcNAc para la metodología 1.

Paso 5. Se repite el procedimiento mencionado en la Figura 11B y 11C, lo cual permite obtener los resultados del conteo de neuronas con glicosilación tipo O-GlcNAc.

7.5.4.2 Análisis de doble marcaje de neuronas con glicosilación tipo O-GlcNAc utilizando metodología 2

Paso 1. Se comenzó visualizando la imagen original obtenida por microscopia confocal de fluorescencia. Posteriormente se seleccionó la opción *Image*, seguida de la opción *Color* y la opción *Split Channels* (Fig. 15A). Una vez realizado este paso se observan tres imágenes correspondientes a los canales de color de la imagen (verde, rojo azul) (Fig. 15B).

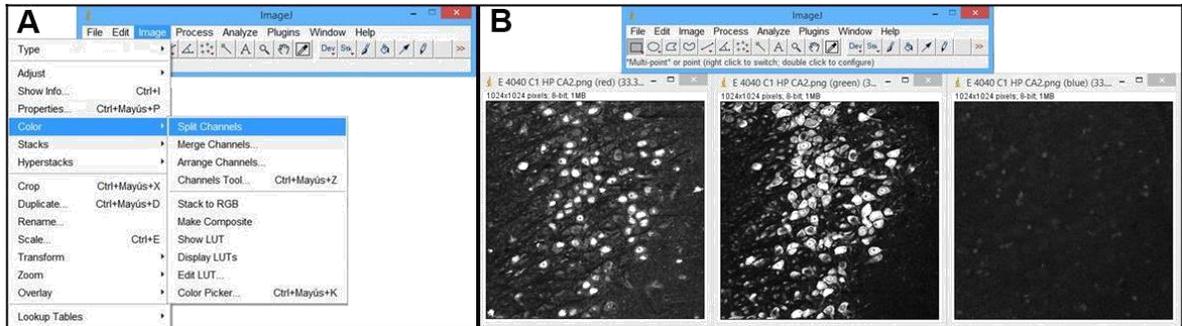


Figura 15. Separación de canales de color de la imagen según metodología 1. (A) Selección del comando para la separación de los canales de color. (B) Visualización de los canales de color de la imagen.

Paso 2. Posteriormente se seleccionó la opción *Image*, seguida de la opción *Color* y la opción *Merge Channels* (Fig. 16A). Seguidamente en la ventana emergente se seleccionaron las imágenes correspondientes a los colores rojo y verde (Fig. 16B). Tras realizar este paso se observa una imagen compuesta por los canales de color verde y rojo en los cuales se observan las neuronas glicosiladas (Fig. 16C).

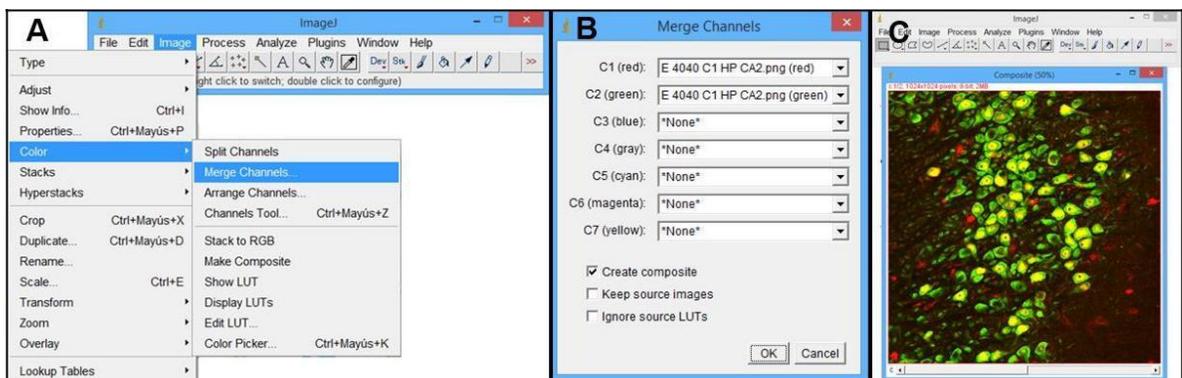


Figura 16. Composición de la imagen para la visualización de las neuronas con glicosilación O-GlcNAc según metodología 2. (A) Selección del comando para superposición de los canales de color. (B) Ventaja emergente para la superposición de las imágenes. (C) Imagen superpuesta.

Paso 3. Se seleccionó la opción *Image*, seguida de la opción *Type* y la opción *RGB color* para cambiar la imagen a formato color (Fig. 17A). Seguidamente se seleccionó la opción *Image > Adjust > Color Threshold*. En la ventana emergente se seleccionó un valor de 15 en la barra superior y 65 en la barra inferior de la opción *Hue*. Asimismo, en la opción de *Brightness* se seleccionó un valor correspondiente al umbral de la curva de brillo, ello mediante la primera barra (Fig. 17B). Finalmente se seleccionó la opción *Select*.

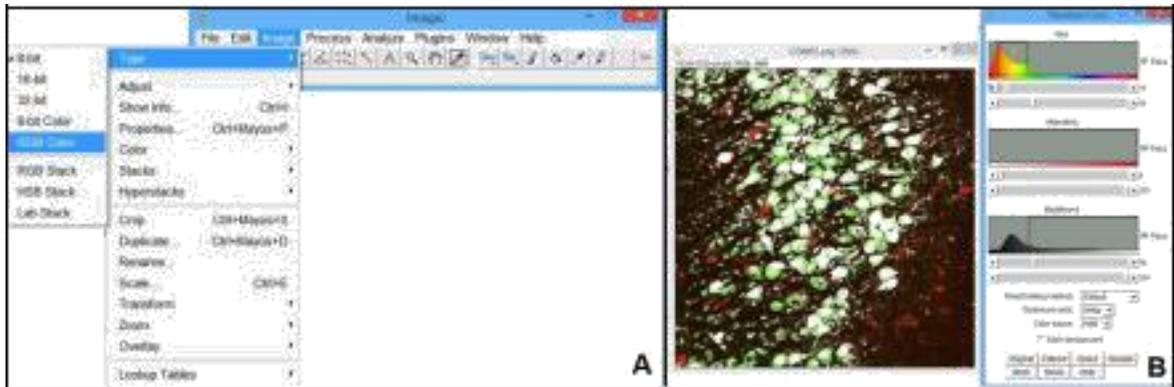


Figura 17. Selección de las neuronas con glicosilación tipo O-GlcNAc para la metodología 2.

Paso 4. Se siguió el procedimiento mencionado en la Figura 11B y 11C, lo cual permite obtener los resultados del conteo de neuronas con glicosilación tipo O-GlcNAc.

7.6 Análisis estadístico

Para todas las pruebas estadísticas de tipo Kruskal-Wallis, Mann-Whitney y el test de normalidad se declara un nivel de significancia a partir de un valor de p menor o igual a 0,05. Inicialmente, para el análisis estadístico se realizó un test de normalidad para evaluar si los datos siguen una distribución normal. Dado que se encontró que los datos de promedio de neuronas marcadas con anti-NeuN no cumplían con el criterio de normalidad ($p=0,138$) (Ver anexo 1.), se procedió a realizar un test de Kruskal-Wallis con el fin de comparar los grupos experimentales a fin de determinar si existe diferencia significativa a nivel de supervivencia neuronal según grupo de análisis. De igual forma se realizó el mismo test para el número de neuronas marcadas con anti-NeuN según región de hipocampo para los grupos de análisis, y un test de Mann-Whitney para cada grupo de comparación. El promedio de neuronas marcadas con anti-NeuN se calculó a partir del promedio de neuronas de los individuos de cada grupo experimental. Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para el promedio de células marcadas con anti-O-GlcNAc a fin de determinar si existe diferencia significativa en el promedio de células glicosiladas.

Posteriormente se realizó el cálculo del porcentaje de neuronas O-GlcNAcizadas, ello tomando como el 100 por ciento el número de neuronas macadas con anti-NeuN. Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para determinar si existe diferencia significativa entre los grupos experimentales y asimismo un test de Mann-Whitney para los grupos de comparación. Dicho procedimiento se realizó para los resultados obtenidos de doble marcaje utilizando la metodología 1 y 2. Se realizó una comparación entre ambas metodologías en la detección de neuronas O-GlcNAcizadas para determinar si existe diferencia entre las metodologías de análisis.

Asimismo se realizó una comparación de las metodologías de análisis en conteo de células no neuronas O-GlcNAc, realizando un test de Kruskal-Wallis para los grupos experimentales.

Finalmente se analizó el promedio de intensidad de glicosilación tipo O-GlcNAc en neuronas y se realizó un test de Kruskal-Wallis a fin de determinar diferencias entre los niveles de glicosilación en los grupos de estudio. De igual manera se realizó la comparación de la intensidad de fluorescencia de glicosilación tipo O-GlcNAc en neuronas y no neuronas según grupo de análisis, para lo cual se realizó un test de Kruskal-Wallis para los grupos experimentales y un test de Mann-Whitney según grupo de comparación.

8. Matriz de marco lógico

Objetivo general			
Evaluar si la glicosilación tipo O-GlcNAc funciona como un mecanismo de neuroprotección ante cambios exofocales en el área de hipocampo cerebral de ratas sometidas a isquemia cerebral focal.			
Objetivos específicos	Actividades	Indicadores	Supuestos
Cuantificar neuronas de hipocampo de ratas sometidas a isquemia cerebral en fotos obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia.	<ul style="list-style-type: none"> - Capacitar en el uso del software ImageJ para análisis de imágenes obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia. - Realizar conteo de neuronas glicosiladas en hipocampo cerebral de ratas sometidas a tratamiento de glucosamina. - Determinar estadísticamente si existe diferencia significativa en la glicosilación de hipocampo de ratas con y sin tratamiento de glucosamina. 	Número de neuronas hipocampales glicosiladas determinada.	<ul style="list-style-type: none"> - Las imágenes de hipocampo de ratas presentan la definición adecuada para ser analizadas por el software. - Disponibilidad de equipos de cómputo con software ImageJ. - Disponibilidad de software para

			análisis estadístico .
<p>Evaluar los niveles de glicosilación tipo O-GlcNAc en el hipocampo de ratas sometidas a isquemia cerebral focal.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Cuantificar por medio del software las neuronas glicosiladas vivas en hipocampo de ratas sometidas a isquemia cerebral y tratamiento con glucosamina. - Cuantificar por medio del software las neuronas glicosiladas vivas en hipocampo de ratas no sometidas a isquemia cerebral y con tratamiento con glucosamina. - Analizar estadísticamente si existe diferencia significativa en la glicosilación de neuronas hipocámpales de ratas sometidas y no a isquemia cerebral focal después de administración de glucosamina. 	<p>Número de neuronas glicosiladas y neuronas vivas en hipocampo de ratas sometidas a isquemia cerebral focal determinada.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Las imágenes de hipocampo de ratas presentan la definición adecuada para ser analizadas por el software. - Disponibilidad de equipos de cómputo con software ImageJ. - Disponibilidad de software para análisis estadístico .
<p>Analizar si la glicosilación tipo O-GlcNAc permite la recuperación de neuronas hipocámpales de ratas después de un evento de isquemia cerebral.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Cuantificar por medio del software las neuronas glicosiladas vivas en hipocampo de ratas sometidas a isquemia cerebral y posterior perfusión, después del tratamiento con glucosamina. 	<p>Tasa de recuperación de neuronas hipocámpales identificadas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Las imágenes de hipocampo de ratas presentan la definición adecuada para ser analizadas

	<ul style="list-style-type: none"> - Evaluar estadísticamente si existe diferencia significativa en la glicosilación de neuronas de hipocampo de ratas sometidas a isquemia cerebral y posterior reperusión y las no sometidas a reperusión, después del tratamiento con glucosamina. 		<ul style="list-style-type: none"> por el software. - Disponibilidad de equipos de cómputo con software ImageJ. - Disponibilidad de software para análisis estadístico.
--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

9. Resultados

9.1 Conteo de neuronas marcadas con anti-NeuN

Se realizó el conteo de neuronas marcadas con anti-NeuN con el fin de determinar el promedio de neuronas vivas marcadas con anti-NeuN. Para ello se calculó el promedio de neuronas por individuo correspondiente al promedio de las regiones CA1, CA2 y CA3, y se calculó el promedio de neuronas de los individuos para obtener el promedio por grupo experimental.

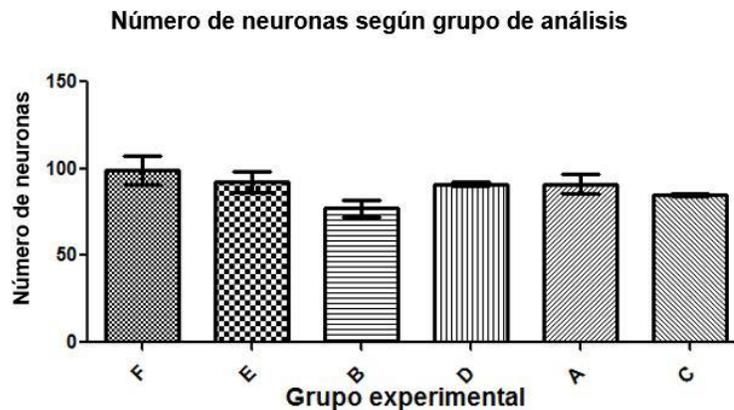


Gráfico 1. Número de neuronas marcadas con anti-NeuN obtenido en análisis de imágenes obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia mediante la técnica de inmunohistoquímica. (Promedio \pm EEM (error estándar de la media), $n=3$).

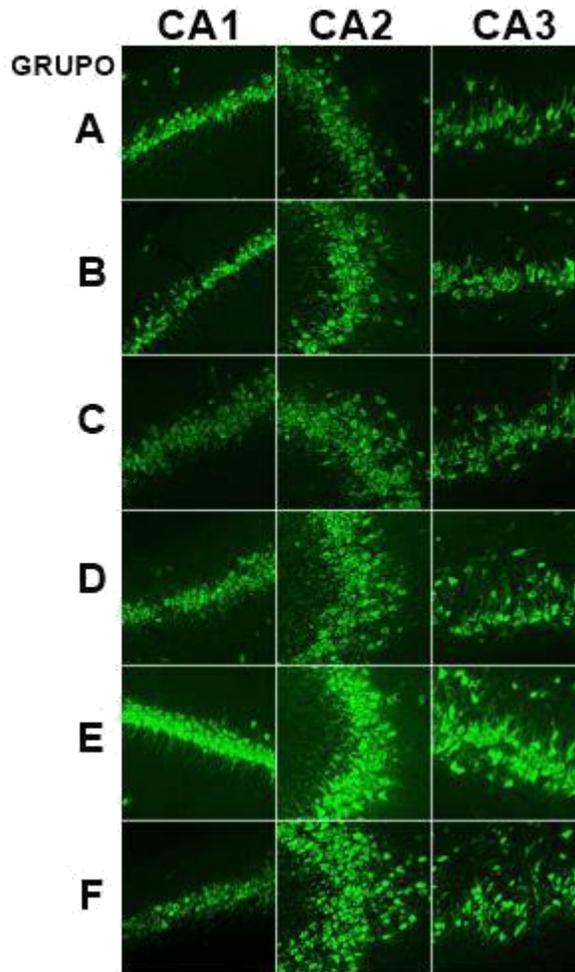


Figura 18. Imágenes representativas de los grupos experimentales para el marcaje de neuronas con anti-NeuN. Imágenes en escala 10x.

En base a los resultados obtenidos se realizó un test de Kruskal-Wallis, en el cual no se determinó diferencia significativa entre los grupos de estudio ($p=0,2342$) (Ver anexo 2.). Se declara una diferencia significativa con un valor p menor o igual a 0,05. A pesar de que dicha prueba no detecte diferencia significativa entre los grupos de estudio, se puede observar en el gráfico 1 que el grupo de isquemia-reperfusión (B) presenta un menor promedio de neuronas y su barra de EEM no se sobrelapa con la barra de EEM del grupo de isquemia-reperfusión en tratamiento con glucosamina (D), lo cual revela una tendencia, es decir, que al aumentar el n experimental dicha tendencia podría convertirse en una diferencia estadísticamente significativa. Dicho resultado permite además inferir que no existe diferencia entre los grupos control sin isquemia ni glucosamina (F) vs isquemia permanente (A), y control sin isquemia ni glucosamina (F) vs isquemia-reperfusión (B), lo cual indicaría que la inducción de isquemia cerebral e isquemia-reperfusión no alteró de manera significativa los niveles de supervivencia neuronal en el hipocampo. No obstante,

como se puede observar en la gráfica, las barras del EEM de los grupos F y B no se traslapan, lo cual permite inferir que existe una tendencia a la disminución del número neuronal con la inducción de isquemia cerebral-reperfusión, tendencia que puede convertirse en una diferencia significativa aumentando el n experimental y el tiempo de sobrevida de los biomodelos.

Se determinó además el número de neuronas marcadas con anti-NeuN según área de hipocampo (Gráfico 2.). Se realizó un test de Kruskal-Wallis, en el cual se determinó que existe una diferencia significativa entre los grupos de estudio ($p=0,019$) (Ver anexo 3.). Sin embargo, al realizar el test de Mann-Whitney para los grupos de comparación no se obtuvo diferencia significativa en el número de neuronas marcadas con anti-NeuN para las regiones CA1 y CA2+CA3 (Ver anexo 4) (F vs E CA1 $p=0,700$; F vs E CA2+CA3 $p>0,999$; B vs D CA1 $p=0,300$; B vs D CA2+CA3 $p=0,100$; A vs C CA1 $p>0,999$; A vs C CA2+CA3 $p>0,999$). A pesar de dicho resultado, se observa en el gráfico 2 que las barras de EEM de la región CA2+CA3 del grupo F no se traslapa con las barras de EMM de la región CA2+CA3 de los grupos B y D, lo cual indica una tendencia, la cual podría aumentar con el n experimental.

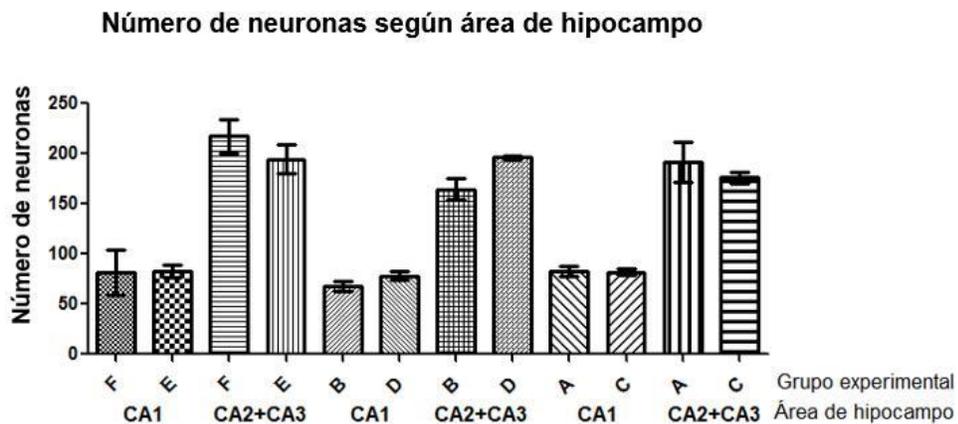


Gráfico 2. Número de neuronas marcadas con anti-NeuN según área de hipocampo en análisis de imágenes obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia mediante la técnica de inmunohistoquímica. (Promedio ± EEM, n=3).

9.2 Conteo de células marcadas con RL2 (anti-O-GlcNAc)

Se realizó el conteo de células marcadas con RL2 para evaluar el promedio de células O-GlcNAcizadas. Para ello se tomó el número total de células marcadas con anti-O-GlcNAc (RL2) por individuo, correspondiente a la suma de las células marcadas en las regiones CA1, CA2 y CA3, y se calculó el promedio de células de los individuos para obtener el promedio por grupo experimental.

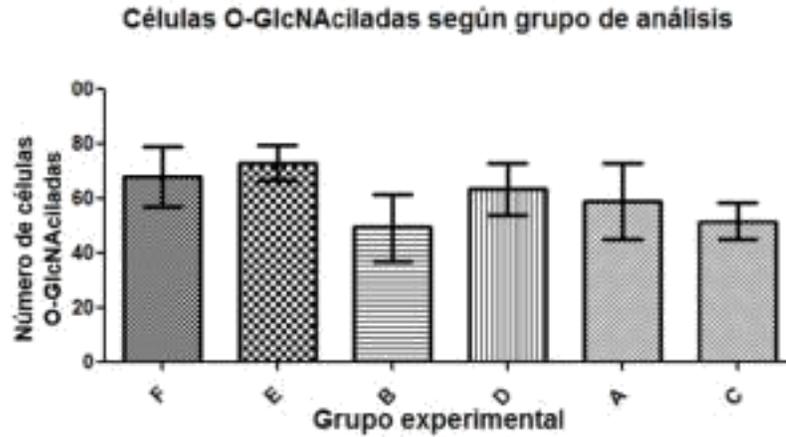


Gráfico 3. Número de células marcadas con RL2 (anti-O-GlcNAc) en hipocampo en análisis de imágenes obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia mediante la técnica de inmunohistoquímica. (Promedio \pm EEM, n=3).

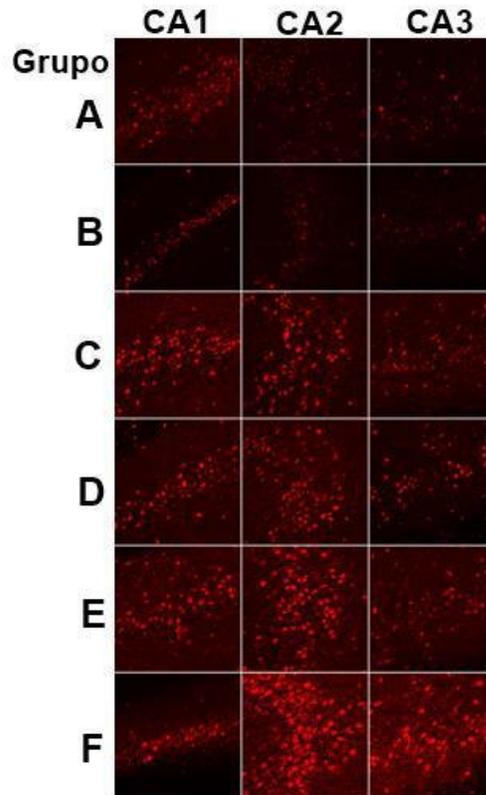


Figura 19. Imágenes representativas para los grupos experimentales en el conteo de células marcadas con anti O-GlcNAc. Imágenes en escala 10x.

En base a los resultados obtenidos se realizó un test de Kruskal-Wallis, en el cual no se determinó diferencia significativa entre los grupos de estudio (Ver anexo 5.).

9.3 Análisis de doble marcaje de neuronas con glicosilación tipo O-GlcNAc

9.3.1 Análisis de doble marcaje de neuronas con glicosilación tipo O-GlcNAc utilizando metodología 1

Se determinó el porcentaje de neuronas con glicosilación tipo O-GlcNAc por medio de la metodología 1 con el fin de determinar si el tratamiento con glucosamina permite el aumento de neuronas O-GlcNAc y si estas a su vez son mayores en los grupos de ischemia e ischemia-reperfusión. Dicho cálculo fue realizado tomando los resultados obtenidos tras el conteo de neuronas marcadas con anti-NeuN como el 100%. Posteriormente con la superposición de neuronas marcadas con anti-NeuN y anti-O-GlcNAc se determinó el número de neuronas O-GlcNAc, el cual se divide sobre el valor de neuronas marcadas con NeuN para determinar el porcentaje de neuronas O-GlcNAc (Ecuación 1.)

$$\text{Porcentaje de neuronas O-GlcNAc} = \frac{\text{Número de neuronas O-GlcNAc}}{\text{Número de neuronas NeuN}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1.}$$

Para ello se realizó un test de Kruskal-Wallis, bajo el cual se determinó que no existe diferencia significativa entre los grupos experimentales (Ver anexo 6).

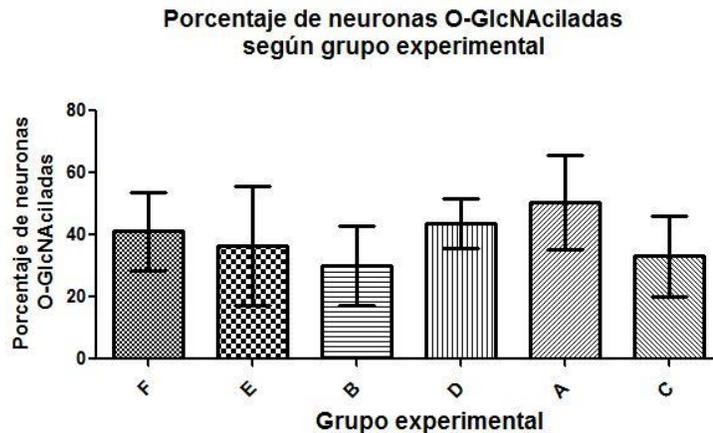


Gráfico 4. Porcentaje de neuronas O-GlcNAc según grupo experimental utilizando metodología 1 para el análisis de doble marcaje en imágenes obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia mediante la técnica de inmunohistoquímica (Promedio ± EEM, n=3).

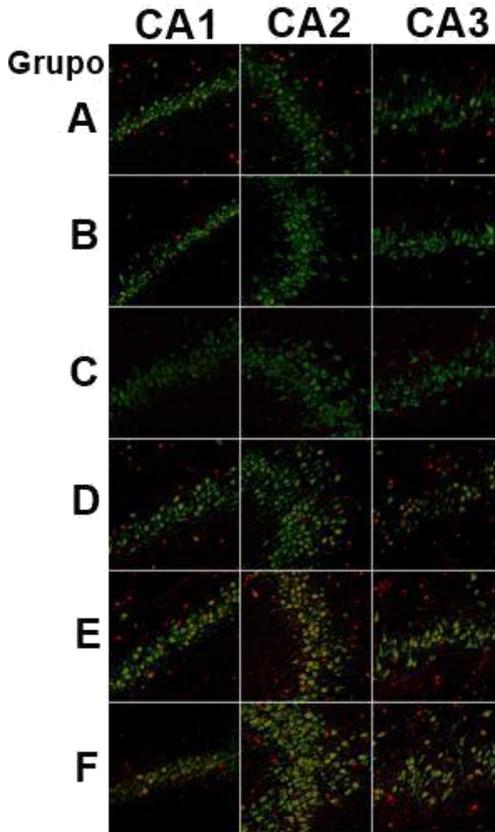


Figura 20. Imágenes representativas para el conteo de neuronas O-GlcNAcizadas según grupo experimental usando la metodología 1. Imágenes en escala 10x.

9.3.2 Análisis de doble marcaje de neuronas con glicosilación tipo O-GlcNAc utilizando metodología 2

Por medio de la metodología 2, se definió el porcentaje de neuronas con glicosilación tipo O-GlcNAc (Ecuación 1.) para evaluar si el tratamiento con glucosamina permite el aumento de neuronas O-GlcNAcizadas y si estas a su vez son mayores en los grupos de isquemia e isquemia cerebral-reperfusión. Se realizó un test de Kruskal-Wallis, el cual arrojó como resultado que no existe diferencia significativa entre los grupos experimentales (Ver anexo 7).

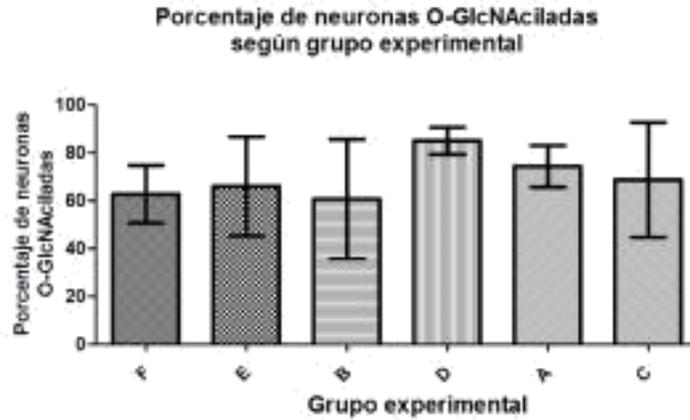


Gráfico 5. Porcentaje de neuronas O-GlcNAcizadas según grupo experimental utilizando metodología 2 para el análisis de doble marcaje en imágenes obtenidas por microscopia confocal de fluorescencia mediante la técnica de inmunohistoquímica (Promedio \pm EEM, n=3).

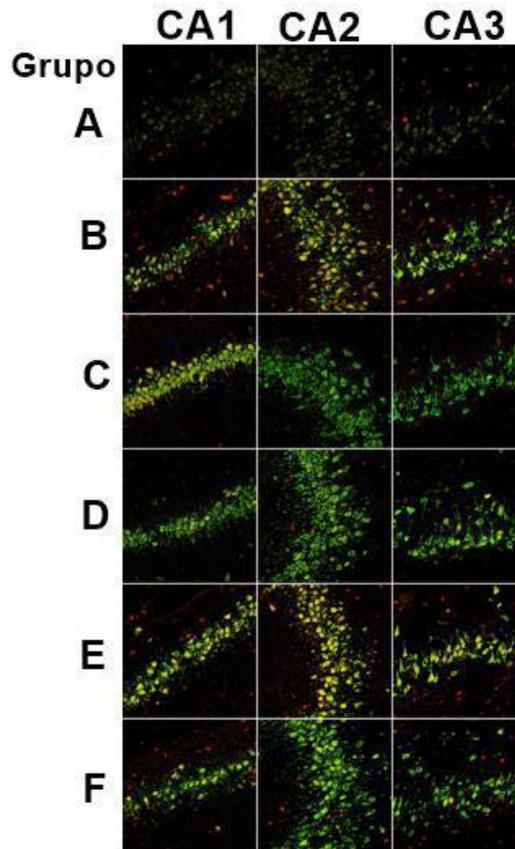


Figura 21. Imágenes representativas para el conteo de neuronas O-GlcNAcizadas según grupo experimental usando la metodología 2. Imágenes en escala 10x.

9.3.3 Comparación de metodologías de análisis 1 y 2 en conteo de neuronas O-GlcNAcizadas

Se desarrolló una comparación de las metodologías de análisis empleadas para el conteo de neuronas O-GlcNAcizadas con el fin de determinar cuál metodología presenta mejor sensibilidad en la obtención de resultados. Para ello se realizó un test de Kruskal-Wallis a fin de determinar si existe diferencia significativa en el porcentaje de neuronas O-GlcNAcizadas obtenido para cada grupo experimental según la metodología 1 y 2. Dicha prueba determinó que no existe diferencia significativa ($p=0,3527$) (Anexo 8).

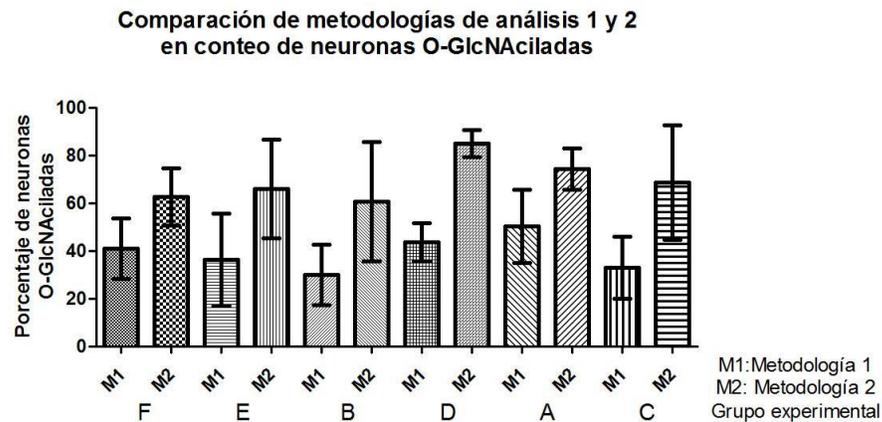


Gráfico 6. Comparación de metodologías 1 y 2 en la determinación del porcentaje de neuronas O-GlcNAcizadas según grupo experimental para el análisis de doble marcaje en imágenes obtenidas por microscopia confocal de fluorescencia mediante la técnica de inmunohistoquímica (Promedio \pm EEM, $n=3$).

9.4 Comparación de metodologías de análisis 1 y 2 en conteo de células no neuronas O-GlcNAcizadas

Con el fin de determinar si las metodologías 1 y 2 poseen igual sensibilidad en el conteo de células no neuronas O-GlcNAcizadas se determinó el promedio de células no neuronas O-GlcNAcizadas en cada grupo experimental usando las metodologías 1 y 2. El test de Kruskal-Wallis arrojó que no existe diferencia significativa en los conteos de células no neuronas O-GlcNAcizadas para ambas metodologías ($p=0,9864$) (Ver anexo 9).

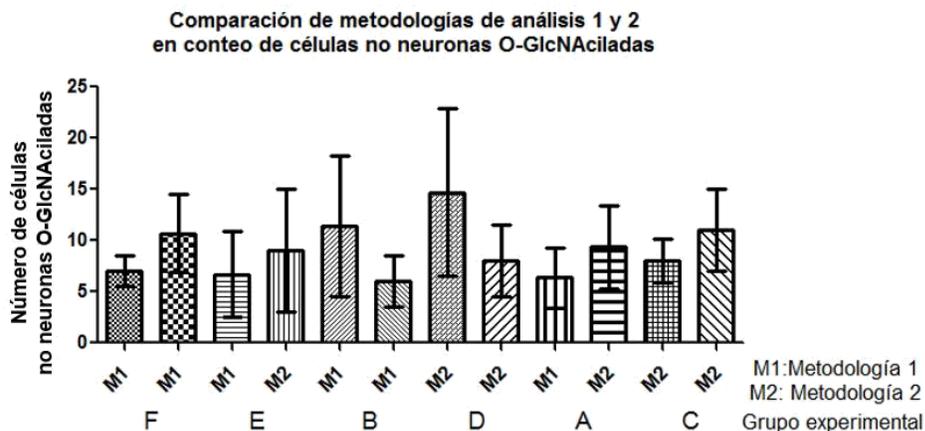


Gráfico 7. Comparación de metodologías 1 y 2 en la determinación del porcentaje de células no neuronas O-GlcNAcAciladas según grupo experimental para el análisis de doble marcaje en imágenes obtenidas por microscopia confocal de fluorescencia mediante la técnica de inmunohistoquímica (Promedio \pm EEM, n=3).

9.5 Promedio de intensidad de glicosilación tipo O-GlcNAc en neuronas hipocampales según grupo de análisis

Se determinó el promedio de intensidad de O-GlcNAcAcilación en neuronas hipocampales con el fin de determinar si el tratamiento con glucosamina permite el aumento de dichos niveles y si éstos son mayores en los grupos experimentales con isquemia e isquemia-reperusión. El test de Kruskal-Wallis dio como resultado que no existe diferencia en el promedio de intensidad de glicosilación para los grupos experimentales ($p=0,6053$) (Ver anexo 10).

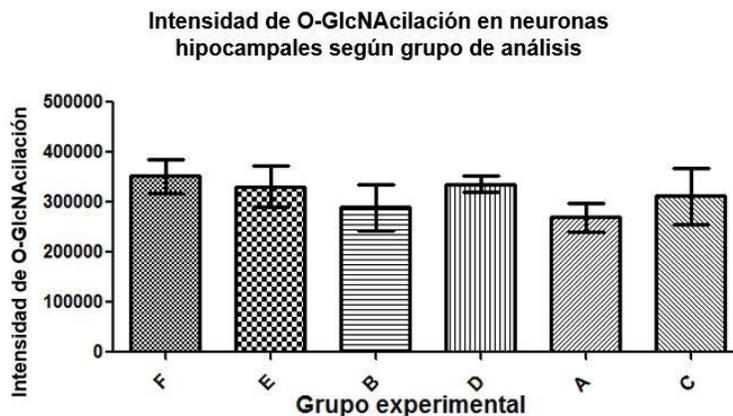


Gráfico 8. Intensidad de glicosilación tipo O-GlcNAc en neuronas hipocampales según grupo de análisis en imágenes obtenidas por microscopia confocal de fluorescencia mediante la técnica de inmunohistoquímica (Promedio \pm EEM, n=3).

9.6 Comparación de intensidad de fluorescencia de glicosilación tipo O-GlcNAc en neuronas y células no neuronas según grupo de análisis

La comparación de intensidad de fluorescencia de glicosilación tipo O-GlcNAc en neuronas y células no neuronas según grupo de análisis fue realizada con el fin de determinar si los niveles de glicosilación tipo O-GlcNAc en neuronas hipocampales son mayores que en las células no neuronas. El test de Kruskal-Wallis determinó que existe diferencia significativa entre los grupos experimentales ($p=0,0036$) (Ver anexo 11). Sin embargo, el test de Mann-Whitney determinó que no existe diferencia significativa entre los niveles de glicosilación de neuronas y células no neuronas hipocampales para los grupos de estudio (Ver anexo 12). Dicho comportamiento sugiere que existe una tendencia a mayores niveles de glicosilación en neuronas, la cual puede convertirse en una diferencia significativa al aumentar el n experimental.

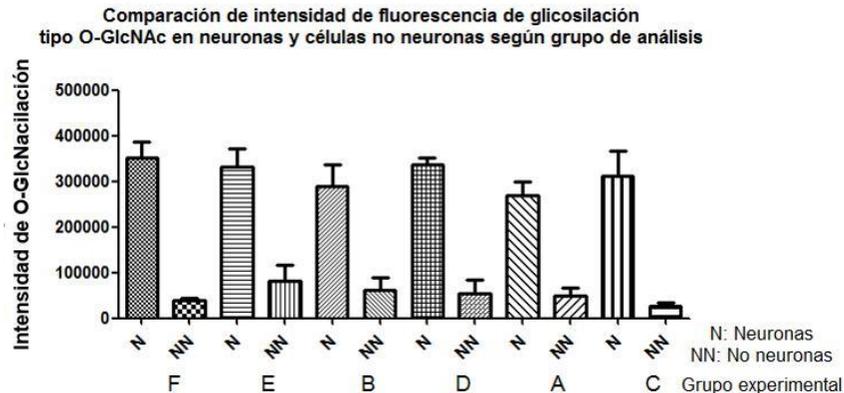


Gráfico 9. Comparación de intensidad de fluorescencia de glicosilación tipo O-GlcNAc en neuronas y células no neuronas hipocampales según grupo de análisis en imágenes obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia mediante la técnica de inmunohistoquímica (Promedio \pm EEM, $n=3$).

10. Discusión

Los accidentes cerebrovasculares (ACV) constituyen en la actualidad la tercera causa de muerte en los países industrializados, y se cree que la mortalidad incrementa de manera exponencial con la edad de los pacientes. La búsqueda de tratamientos en la actualidad indaga por encontrar alternativas que vayan más allá del tratamiento de los síntomas, investigando nuevas moléculas para que brinden un mecanismo de neuroprotección (Sosa et al., 2008). Una de dichas alternativas es la glicosilación tipo O-GlcNAc, la cual se ha relacionado con mayores niveles de supervivencia celular en estudios realizados en cardiomiocitos (A. Ngho et al., 2011).

En la actualidad, investigaciones en el área de neurociencias buscan evaluar la hipótesis de que la O-GlcNacilación pueda ejercer un efecto neuroprotector a nivel cerebral. Es por ello que la presente investigación, realizada en el Grupo de Investigación en Fisiología Celular Animal de la Universidad Icesi busca contrastar dicha hipótesis en base a resultados obtenidos del análisis de imágenes obtenidas por microscopia confocal de fluorescencia de hipocampo de ratas Wistar distribuidas en seis grupos de estudio. En primer lugar se realizó el conteo de neuronas marcadas con anti-NeuN para determinar el nivel de supervivencia neuronal de los grupos con evento de isquemia e isquemia-reperusión (Gráfico 1.) y analizar el comportamiento de los datos en los grupos de comparación ($p < 0,05$). Los resultados obtenidos para la prueba de Kruskal-Wallis indican que no existen diferencias entre los grupos de análisis ($p = 0,2342$), lo cual indicaría que, para el grupo de comparación de isquemia permanente (A) vs isquemia permanente en tratamiento con glucosamina (C), la inducción de isquemia cerebral posterior a la administración de glucosamina no aumentó significativamente los niveles de supervivencia neuronal después de un tiempo de sobreduda de seis horas. En base a la literatura, se esperaba que la administración de glucosamina previo a una isquemia cerebral aumentara los niveles de supervivencia neuronal, esto en base a investigaciones realizadas en el Grupo de Investigación en Fisiología Celular Animal de la Universidad Icesi a nivel de corteza cerebral en las que se ha reportado una disminución del volumen de infarto cerebral con tratamiento de glucosamina (Vera González, 2016).

Asimismo, para el grupo de comparación de isquemia-reperusión (B) vs isquemia-reperusión en tratamiento con glucosamina (D), los resultados muestran que la inducción de isquemia cerebral y posterior reperusión sanguínea después de la administración de glucosamina no aumentó significativamente los niveles de supervivencia neuronal. No obstante, como se puede observar en el gráfico 1, las barras del EEM no se traslapan, lo cual indicaría que existe una tendencia al aumento de los niveles de supervivencia neuronal en la isquemia-reperusión tras la administración de glucosamina, tendencia que podría aumentar al aumentar el n experimental. De igual manera, como se puede observar en el gráfico 2 las barras del EEM para las áreas CA1 y CA2+CA3 entre los grupos B y D no se traslapan, lo cual permitiría afirmar que existe una tendencia al aumento de la supervivencia neuronal en la isquemia-reperusión tras administración de glucosamina. Se esperaba que dichos niveles fueran superiores en base a estudios realizados utilizando el modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO), en los cuales se demostró que la administración de glucosamina incluso después de 3 horas post-reperusión sanguínea suprimió la expresión de proteínas proinflamatorias como IL-1b, TNF-a, iNOS y COX-2 a nivel de corteza cerebral (Hwang et al., 2010).

Adicionalmente, se puede inferir que no existe diferencia significativa en los grupos control sin isquemia ni tratamiento de glucosamina (F) vs el grupo de isquemia permanente (A), así como entre los grupos control sin isquemia ni tratamiento de

glucosamina (F) vs grupo de isquemia-reperfusión (B), lo cual indicaría que la inducción de isquemia cerebral no disminuyó de forma significativa los niveles de supervivencia celular. De igual manera, la comparación de los grupos F y B permitió determinar que los niveles de supervivencia celular no fueron significativamente disminuidos tras el evento de isquemia-reperfusión. A pesar de esto, en el gráfico 1 se puede apreciar que las barras del EEM de los grupos F y B no se traslapan, lo cual indica que existe una tendencia a la disminución de la supervivencia neuronal tras la inducción de isquemia cerebral-reperfusión, tendencia que podría convertirse en una diferencia significativa al aumentar el n experimental o el tiempo de sobrevida de los biomodelos empleados en el experimento, teniendo en cuenta reportes en la literatura en los cuales el tiempo de sobrevida es mayor y el daño neuronal hipocampal es apreciable. Dicho comportamiento puede explicarse en base a que el hipocampo no se relaciona de manera directa con el foco isquémico, sino que éste sufre daño a través de fenómenos exofocales. Dichos cambios incluyen la alteración en la liberación de factores neurotróficos, modificaciones en la expresión de receptores de neurotransmisores, incremento de excitabilidad y cambios en los patrones de conectividad cerebral. Un ejemplo de ello es la depresión propagada, o aumento de potasio extracelular desde el foco isquémico y traslado de éste a través de la red astrocítica a regiones distantes del foco isquémico (César A. Arango-Dávila et al., 2008). Un estudio realizado en el biomodelo de ratas Sprague-Dawley empleando el modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) durante un tiempo de 1 hora con el fin de examinar la degeneración celular presentada tras la inducción de isquemia cerebral en el hipocampo cerebral (fenómeno exofocal), determinó que la degeneración en el hipocampo se produce entre 12 horas y 7 días después del evento isquémico. Para ello fueron analizadas secciones cerebrales a las 6 horas, 12 horas, 1, 4, 7, 14 y 21 días (Tanya L Butler et al., 2002). De igual forma, investigadores de la Universidad del Valle evaluaron la respuesta del hipocampo ante la isquemia cerebral con el fin de determinar el efecto neuroprotector de los estrógenos en ratas hembras (César A. Arango-Dávila et al., 2008). En la investigación se observó una disminución en el número de neuronas vivas, ello empleando el marcador fluoro-jade para marcar células muertas, tres días después de la inducción de isquemia cerebral (César A. Arango-Dávila et al., 2008). Debido a esto, se puede decir entonces que el hipocampo cerebral presenta un daño secundario que puede observarse con mayor intensidad de manera tardía. Por tanto, la investigación de nuevas estrategias farmacológicas debe seguir siendo de importancia para el área de neurociencias. Teniendo en cuenta que en el presente estudio se utilizó un tiempo de sobrevida de 6 horas, futuras investigaciones que quieran estudiar los fenómenos exofocales deben realizarse ampliando dicho tiempo según lo reportado en la literatura para así poder observar un daño celular apreciable en el hipocampo y poder evaluar si la administración de glucosamina ejerce un efecto neuroprotector en esta región del cerebro a través del incremento de los niveles de glicosilación tipo O-GlcNAc.

Posteriormente se realizó el conteo de células marcadas con glicosilación tipo O-GlcNAc (Gráfico 3.) y su análisis respecto a los grupos de comparación ($p < 0,05$). El resultado para la prueba múltiple de Kruskal Wallis permite inferir que el tratamiento con glucosamina no aumentó de manera significativa el promedio de células O-GlcNAc (p=0,4658). Teniendo en cuenta estudios realizados en cardiomiocitos sometidos a diversos factores de estrés celular como choque térmico, etanol, UV, hipoxia, entre otros, en los que se observó un aumento de los niveles de glicosilación tipo O-GlcNAc (Ngoh et al., 2010), se esperaba que el promedio de células marcadas con anti-O-GlcNAc fuera mayor tras la inducción de isquemia posterior a la administración de glucosamina. Estudios realizados empleando cardiomiocitos neonatales determinaron que la administración de glucosamina permite el aumento de la supervivencia celular durante la isquemia-reperfusión mediante el aumento de los niveles de células O-GlcNAc. En tal estudio los niveles de glicosilación fueron máximos a las 2 horas de perfusión, después de 4 horas de isquemia (Champattanachai et al., 2008). Por tal razón, las seis horas de sobrevivencia empleadas en el presente proyecto pueden no dar suficiente tiempo para que las células de hipocampo presenten estímulos de estrés, como lo reportado en la literatura para cultivos celulares de cardiomiocitos.

Una vez determinados los promedios de neuronas marcadas con anti-NeuN y las células marcadas con anti-O-GlcNAc se procedió a determinar el porcentaje de neuronas O-GlcNAc, lo cual permite determinar por un método de análisis de doble marcaje qué porcentaje de neuronas vivas se encuentran glicosiladas y en base a dichos resultados analizar los grupos de comparación ($p < 0,05$). Con respecto al porcentaje de neuronas O-GlcNAc de los grupos control sin isquemia ni glucosamina (F) vs isquemia permanente (A), tanto para las metodologías 1 y 2 no se observa una tendencia al aumento de neuronas O-GlcNAc sin el tratamiento de glucosamina. Asimismo, para el grupo con isquemia permanente (A) e isquemia permanente en tratamiento con glucosamina (C), tanto para las metodologías 1 (Gráfico 4.) y 2 (Gráfico 5.), no se evidenció un aumento significativo del porcentaje de neuronas O-GlcNAc tras la administración de glucosamina previo a la inducción de isquemia cerebral ($p = 0,9564$; $p = 0,8800$, respectivamente). De acuerdo a lo anterior, dicho resultado permite confirmar que el estímulo de estrés neuronal en el hipocampo no fue suficiente para permitir el aumento de neuronas O-GlcNAc, caso contrario a lo ocurrido a nivel de corteza cerebral, tal como lo muestran investigaciones en las que se utilizó el anticuerpo RL2 (anti-O-GlcNAc) y el modelo MCAO para la inducción de isquemia cerebral y se encontró un aumento de los niveles de glicosilación tipo O-GlcNAc (Shi et al., 2015).

Con el fin de determinar cuál de las metodologías empleadas es más eficiente para el análisis de doble marcaje de neuronas O-GlcNAc se realizó una comparación entre ambas metodologías (Gráfico 6.) estadísticamente por medio de un test múltiple de Kruskal-Wallis a fin de evaluar si existe diferencia relevante en el

porcentaje de neuronas O-GlcNAcizadas detectadas por cada metodología ($p < 0,05$). Dicho test presentó como resultado que no existe diferencia significativa en el número de neuronas O-GlcNAcizadas para los grupos experimentales ($p = 0,3527$). No obstante, como se puede observar en la gráfica, el promedio de neuronas O-GlcNAcizadas detectadas son más elevados para la metodología 2 en todos los grupos de estudio, lo cual permitiría afirmar que dicha metodología presenta una mejor sensibilidad al conteo por doble marcaje y podría ser empleada en futuros estudios de doble marcaje donde se necesite una alta sensibilidad de análisis. Un caso particular es el porcentaje de neuronas O-GlcNAcizadas de los grupos control sin isquemia ni glucosamina (F) vs isquemia-reperfusión en tratamiento de glucosamina (D) usando la metodología 2, el cual presenta una tendencia al aumento de neuronas O-GlcNAcizadas tras la inducción de isquemia-reperfusión posterior a la administración de glucosamina, tendencia que no se observa empleando la metodología 1 de análisis. Asimismo, se realizó la comparación de las metodologías de análisis 1 y 2 en el conteo de células no neuronas O-GlcNAcizadas (Gráfico 7.) a fin de determinar si ambas metodologías presentan la misma sensibilidad de análisis en el conteo de neuronas y células no neuronas ($p < 0,05$). El test múltiple de Kruskal-Wallis para los grupos experimentales arrojó como resultado que no existe diferencia significativa en el promedio de células no neuronas O-GlcNAcizadas ($p = 0,9864$). Sin embargo, como se puede observar en la gráfica, el promedio de células no neuronas O-GlcNAcizadas fue mayor empleando la metodología 2 en los grupos experimentales, por lo que se puede decir que la metodología 2 ofrece una mejor sensibilidad en cuanto al conteo de células no neuronas, lo cual puede ser útil para futuras investigaciones.

Por otra parte, se determinó el promedio de intensidad de glicosilación tipo O-GlcNAc en neuronas hipocámpales (Gráfico 8.) para determinar diferencias en los grupos experimentales ($p < 0,05$). Para ello se realizó un test múltiple de Kruskal-Wallis, el cual determinó que no existe diferencia significativa en el promedio de intensidad de glicosilación tipo O-GlcNAc ($p = 0,6053$) en neuronas de hipocampo. En referente a los grupos control sin isquemia ni glucosamina (F) vs isquemia permanente (A), no se observa una tendencia al aumento de la intensidad de glicosilación tipo O-GlcNAc tras la inducción de isquemia cerebral, lo cual permite nuevamente inferir que el estímulo de estrés generado por la isquemia no fue suficiente para inducir el aumento de los niveles de glicosilación. En referente a los grupos isquemia permanente (A) vs isquemia permanente en tratamiento de glucosamina (C), se esperaba que el promedio de intensidad de O-GlcNAcización aumentara con el tratamiento de glucosamina previo al evento de isquemia. Esto en base a investigaciones realizadas en líneas celulares empleando células de riñón de mono COS-7, células HeLa de humanos, células de ovario de hámster chino CHO y células de neuroblastoma de ratón Neuro-2A, las cuales fueron sometidas a estímulos de estrés como cambios de temperatura y rayos UV, determinaron que los niveles de O-GlcNAcización aumentaron tras dichos estímulos de estrés en comparación con el grupo control sin estímulo estresante (Zachara et al., 2004). Sin

embargo, es posible que el tiempo de sobrevivida de 6 horas no fue suficiente para que las células hipocampales sufrieran un estímulo de estrés relevante que pudiese desencadenar un fenómeno exofocal. De igual forma, se puede inferir que al no existir diferencia entre los grupos B y D, el promedio de intensidad de O-GlcNAcilación no aumentó de forma relevante tras un evento de isquemia-reperusión posterior a la administración de glucosamina, por lo cual no se puede confirmar que la administración de glucosamina permita la recuperación de neuronas tras un evento de isquemia como lo reporta la literatura (Hwang et al., 2010).

Adicionalmente, con el fin de comparar la intensidad de fluorescencia de glicosilación tipo O-GlcNAc en neuronas y células no neuronas según grupo de análisis (Gráfico 9.) se realizó un test múltiple de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$), el cual arrojó como resultado que los niveles de glicosilación tipo O-GlcNAc son significativamente mayores en las neuronas hipocampales en comparación con las células no neuronas ($p = 0,0036$). Sin embargo, al realizar un test de Mann-Whitney para la comparación de intensidad de fluorescencia de glicosilación tipo O-GlcNAc en neuronas y células no neuronas según grupo de comparación, no se encontró diferencia significativa en dichos niveles de glicosilación, lo cual podría indicar que se debe de aumentar el n experimental a fin de lograr resultados más concluyentes. En la literatura se reporta que la glicosilación tipo O-GlcNAc es abundante a nivel cerebral y las células en las que se observan mayores niveles de O-GlcNAcilación son las neuronas hipocampales y las células de Purkinje, esto debido a que la expresión de las proteínas OGT y O-GlcNAcasa, proteínas que participan en la adición y retiro de la molécula de monosacárido en la vía de modificación post-traducciona O-GlcNAc, es mayor en dichos tipos celulares (Hwang et al., 2010), por lo que se esperaba que el nivel de glicosilación fuese mayor en neuronas hipocampales.

11. Conclusiones

El entendimiento de los fenómenos exofocales como mecanismo de degeneración del hipocampo cerebral es importante para el diseño de estudios en los que se busque evaluar el efecto de cambios post-traduccionales como la glicosilación tipo O-GlcNAc en la supervivencia neuronal. Por tanto es importante que en el diseño experimental de futuras investigaciones en el área de hipocampo se prolonge el tiempo de sobrevivida a fin de lograr un daño hipocampal apreciable y ello contribuya en la investigación de nuevos tratamientos con actividad neuroprotectora ante un daño exofocal generado por evento isquémico.

Los resultados obtenidos en estudios de doble marcaje para la determinación de neuronas O-GlcNAcizadas son dependientes de la metodología de análisis

empleada. En este estudio se logró describir una metodología de análisis de doble marcaje que puede tener una mayor sensibilidad para el conteo neuronal. lo cual es de importancia para futuros estudios.

12. Recomendaciones

Se recomienda ampliar el n experimental, así como el tiempo de sobrevida de los biomodelos empleados en estudios en los que se evalúe el efecto de tratamientos farmacológicos en la supervivencia neuronal hipocampal a fin de lograr un daño neuronal significativo y una mejor exposición celular a estímulos de estrés que puedan generar alteraciones en cambios post-traduccionales como la glicosilación tipo O-GlcNAc.

Se recomienda emplear marcadores como la proteína fibrilar acídica de la glía (GFAP) con el fin de detectar células gliales y obtener resultados más específicos en cuanto al conteo de células marcadas con anti-O-GlcNAc y poder diferenciarlas de las células neuronales.

13. Bibliografía

- A. Ngoh, G., J. Watson, L., T. Facundo, H., & P. Jones, S. (2011). O-GlcNAc Signaling in the Cardiovascular System. *Circulation Research*, *107*(2), 171–185. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.224675.O-GlcNAc>
- A. Ngoh, G., J. Watson, L., T. Facundo, H., & P. Jones, S. (2012). Augmented O-GlcNAc Signaling Attenuates Oxidative Stress and Calcium Overload in Cardiomyocytes. *Amino Acids*, *40*(3), 895–911. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0728-7.Augmented>
- Akimoto, Y., Comer, F., Cole, R., Kudo, A., Kawakami, H., Hirano, H., & Hart, G. (2003). Localization of the O-GlcNAc transferase and O-GlcNAc-modified proteins in rat cerebellar cortex. *Brain Research*, *966*(2), 194–205.
- Arango-Dávila, C. A., Escobar, M. I., Buriticá, E., & Pimienta, H. (2008). Cambios exofocales en la isquemia cerebral focal experimental: Una visión experimental y su correlato clínico. *Colombia Medica*, *39*(3 SUPPL.), 85–94.
- Arango-Dávila, C. A., Ospina, B. E. M., Castaño, D. M., Potes, L., & Prieto, J. U. (2016). Evaluación de la diáquisis transcallosa en un modelo de isquemia cerebral focal en ratas. *Colombia Medica*, *47*(2), 87–93.
- Arango-Davila, C., Escobar-Betancourt, M., Cardona-Gómez, G. P., & Pimienta-Jiménez, H. (2004). Fisiopatología de la isquemia cerebral focal: Aspectos básicos y proyección a la clínica. *Revista de Neurología*, *39*(2), 156–165.

- Badiola Nahuai Benito. (2008). *Estudio de los mecanismos moleculares implicados en la muerte apoptótica en un modelo de isquemia cerebral in vitro*. Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Bodemer, C., Smahi, A., Courtois, G., Rabia, S. H., & Do, R. (2002). The NF- κ B signalling pathway in human diseases : from incontinentia pigmenti to ectodermal dysplasias and immune-deficiency syndromes, *11*(20), 2371–2375.
- Bustamante Zuleta, E. (2007). *El sistema nervioso : desde las neuronas hasta el cerebro humano* (1st ed.). Medellín, Colombia: Editorial Universidad de Antioquia.
- Butler, T. L., Kassed, C. A., Sanberg, P. R., Willing, A. E., & Pennypacker, K. R. (2002). Neurodegeneration in the rat hippocampus and striatum after middle cerebral artery occlusion, *929*, 252–260.
- Butler, T. L., Kassed, C. a, Sanberg, P. R., Willing, a E., & Pennypacker, K. R. (2002). Neurodegeneration in the rat hippocampus and striatum after middle cerebral artery occlusion. *Brain Research*, *929*(2), 252–60. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)03371-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)03371-6)
- Cardozo Hernández, C. F. (2017) Laboratorio de Fisiología Animal, Universidad Icesi.
- Cardozo Hernández, C. F. (2013). *O-GlcNAcilación en excitotoxicidad no isquémica en ratas sometidas a isquemia cerebral focal*. Universidad del Valle.
- Carmelo, E., Zurita, A. ., González, A. ., Martínez, E., & Valladares, B. (2006). Proteínas de choque térmico en parásitos : la Hsp70 y el sistema inmune. *Sociedad Española de Parasitología (SEP)*, *66*(1–4), 39–46.
- Champattanachai, V., Marchase, R. B., & Chatham, J. C. (2007). Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein-associated O -GlcNAc, *5*, 178–187. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00162.2006>.
- 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>
- Collins, T. . (2007). ImageJ for microscopy. *Biotechniques*, *43* (1), 25-30. *Biotechniques*, *43*(1), 25–30. <https://doi.org/10.2144/000112505>
- Dávila, C. A. A., Escobar, M. I., & Buriticá, E. (2017). Cambios exofocales en la

isquemia cerebral focal experimental : una visión experimental y su correlato clínico, 39(3), 1–9.

Díaz, M. F. (2016). Accidente cerebrovascular isquémico Stroke Attack. *Rev Argent Cardiol*, 83, 2015. <https://doi.org/10.7775/rac.v84.i2.8331>

Egido, J. A., Casado, I., Ribó, M., Dávalos, A., Masjuan, J., Leci, M. A. De, ... Maestre, J. (2014). Guía para el tratamiento del infarto cerebral agudo, 29(2), 102–122. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2011.09.012>

Escobar, M., & Pimienta, H. (2006). *Sistema Nervioso* (Segunda). Cali, Colombia.

Férez, S. M., Márquez, M. F., & Peña, M. A. (2016). Daño miocárdico por reperfusión, 57(Supl 1), 9–21. <https://doi.org/10.1157/13067415>

Fernández-Gómez, F. J., Hernández, F., Argandoña, L., Galindo, M. F., Segura, T., & Jordán, J. (2008). Pharmacology of neuroprotection in acute ischemic stroke. *Revista de Neurologia*, 47(5), 253–260. Retrieved from <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L352362718%5Cnhttp://www.neurologia.com/pdf/Web/4705/ba050253.pdf>

Fuentes, B., Gállego, J., Gil-Nuñez, A., Morales, A., Purroy, F., Roquer, J., ... Vivancos, J. (2014). Guía para el tratamiento preventivo del ictus isquémico y AIT (II). Recomendaciones según subtipo etiológico. *Neurologia*, 29(3), 168–183. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2011.06.003>

González, R. P., Luis, G., Miranda, H., & Caridad, Y. De. (2015). Caracterización clínica-epidemiológica de la enfermedad cerebrovascular en el adulto mayor Clinical and epidemiological characterization of cerebrovascular disease in the elderly, 19(6), 996–1005.

Herculano-Houzel, S. (2005). Isotropic Fractionator: A Simple, Rapid Method for the Quantification of Total Cell and Neuron Numbers in the Brain. *Journal of Neuroscience*, 25(10), 2518–2521. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4526-04.2005>

Hernández, S. (2010). El modelo animal en investigaciones biomédicas. *Centro de Ciencias Biomédicas de La Universidad de Montevideo*, 2(3), 205–266.

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>

ImageJ. (2017). Color Image Processing. Retrieved June 23, 2017, from https://imagej.net/Color_Image_Processing

López Hernández, E., & Solís, H. (2012). Epilepsia del lóbulo temporal y las

neuronas hipocampales de las áreas CA1 y CA3, 16–25.

- Matilde, L., Mcgrath, H., & Gaviria, M. (2007). Manifestaciones neuropsiquiátricas en accidentes cerebrovasculares, *45*(2), 129–140.
- Medina, A., & Escobar, M. I. (2010). EFECTOS DE LA ISQUEMIA FOCAL SOBRE LA INTERACCION GLIA - NEURONA : UN ANALISIS BASADO EN LA EXPRESION DE INTERNEURONAS CORTICALES. *Revista Salud UIS*, *37*(1).
- Miller, A. H., Maletic, V., & Raison, C. L. (2010). La inflamación y sus desencantos: Papel de las citocinas en la fisiopatología de la depresión mayor. *Psiquiatria Biologica*, *17*(2), 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.psiq.2010.04.001>
- Moyano V, Á. (2010). El accidente cerebrovascular desde la mirada del rehabilitador. *Revista Hospital Clínico Universidad de Chile*, (21), 348–355.
- Ngoh, G. A., Facundo, H. T., Zafir, A., & Jones, S. P. (2010). O-GlcNAc signaling in the cardiovascular system. *Circulation Research*, *107*(2), 171–185. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.224675>
- O-GlcNAc (RL2): sc-59624. (n.d.), 59624. Oh-hora, M., Yamashita, M., Hogan, P. G., Sharma, S., Chung, W., Prakriya, M., ... Rao, A. (2009). Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. *Nature Immunology*, *9*(4), 432–443. <https://doi.org/10.1038/ni1574>.Dual
- Olivares, J. D., Juárez, E., & García, F. (2015). El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje. *Revista Médica de La Universidad Veracruzana*, *15*, 20–28. Retrieved from https://www.uv.mx/rm/num_anteriores/revmedica_vol15_num1/articulos/el_hipocampo.pdf
- Osuna-Zazueta, M. A., Ponce-Gómez, J. A., & Pérez-Neri, I. (2015). Mecanismos neuroprotectores de los cannabinoides en la isquemia cerebral y las enfermedades neurodegenerativas. *Investigacion Clinica (Venezuela)*, *56*(2), 188–200.
- Paola, A., Shubach, J., & Galindo, A. M. (2015). Regulación de la familia de proteínas BCL-2 en células infectadas con *Chlamydia trachomatis*. *NOVA*, *13*(24), 83–92.
- Ramaswamy, K. (2014). What the rodent brain can teach us about associative learning. Retrieved June 22, 2017, from <https://indiabioscience.org/news/2014/what-the-rodent-brain-can-teach-us-about-associative-learning>

- Samaniego, R. (2009). Aplicaciones de la microscopia confocal. *Gastroenterología Y Hepatología Continuada*, 8, 115–119. <https://doi.org/10.1081/E>
- Sánchez Chávez, J. J. (1999). El área de penumbra. *Revista de Neurología*, 28(537), 810–816.
- Sayeski, P. P., & Kudlow, J. E. (1996). Glucose metabolism to glucosamine is necessary for glucose stimulation of transforming growth factor- α gene transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 271(25), 15237–15243. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.25.15237>
- Shi, J., Gu, J., Dai, C., Gu, J., Jin, X., & Sun, J. (2015). O-GlcNAcylation regulates ischemia-induced neuronal apoptosis through AKT signaling. *Nature Publishing Group*, 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep14500>
- Silva, F. a, Zarruk, J. G., Quintero, C., Arenas, W., & Silva, S. Y. (2006). Enfermedad cerebrovascular en Colombia. *Revista Colombiana de Cardiología*, 13(2), 85–89.
- Solís, H., & López Hernández, E. (2009). Neuroanatomía funcional de la memoria, 14(3), 176–187.
- Sosa, I., Mengana, Y., García, J. D., Subiros, N., Cruz, J., Muñoz, A., ... García, J. C. (2008). La eritropoyetina humana recombinante como terapia para la neuroprotección en la isquemia cerebral. *Biotecnología Aplicada*, 25(3), 216–229.
- Subirós Martínez, N., Coro Antich, R. M., Pérez Saad, H., Berlanga Acosta, J. A., Rodríguez Salgueiro, S., & García del Barco Herrera, D. (2012). Establecimiento de un modelo de isquemia cerebral focal permanente en dos líneas de ratas para evaluación de posibles agentes neuroprotectores. Retrieved June 22, 2017, from <http://www.morfovvirtual2012.sld.cu/index.php/morfovvirtual/2012/paper/viewFile/238/602>
- Traystman, R. J. (2003). Animal Models of Focal and Global Cerebral Ischemia. *ILAR Journal*, 44(2), 85–95.
- Unda Velazco, S. (2015). Plasticidad hipocampal y funciones cognitivas. *Revista Ciencia In Situ*, 1(1), 24–27.
- 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). Escuela de Ciencias Básicas. Universidad del Valle.
- Zachara, N. E., Donnell, N. O., Cheung, W. D., Mercer, J. J., Marth, J. D., & Hart, G. W. (2004). Dynamic O- GlcNAc Modification of Nucleocytoplasmic Proteins

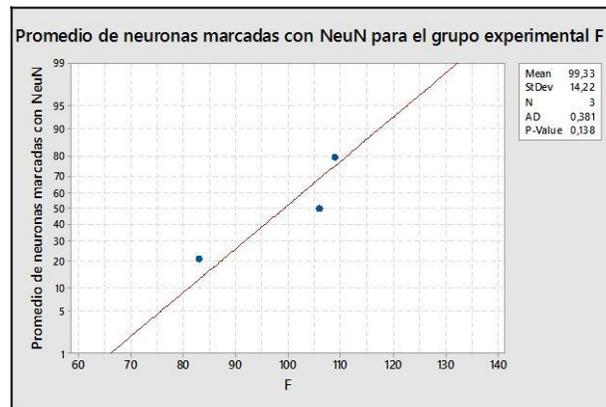
in, 279(29), 30133–30142. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403773200>

Zhu-mauldin, X., Marsh, S. A., Zou, L., Marchase, R. B., & Chatham, J. C. (2012). Modification of STIM1 by O-linked N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) Attenuates Store-operated Calcium Entry in Neonatal Cardiomyocytes. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 287(46), 39094–39106. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.383778>

Zilágyi, T. S., Is, K. O. R., & Orvath, E. M. Ó. K. E. H. (2011). Morphological identification of neuron types in the rat hippocampus, 52(1), 15–20.

14. Anexos

Anexo 1. Prueba de normalidad para el promedio de células marcadas con anti-NeuN.



Anexo 2. Prueba Kruskal-Wallis para el promedio de neuronas marcadas con anti-NeuN.

Kruskal-Wallis test	
P value	0.2342
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	6
Kruskal-Wallis statistic	6.822

Anexo 3. Prueba de Kruskal-Wallis para el número de neuronas marcadas con anti-NeuN según región de hipocampo.

Kruskal-Wallis test		Kruskal-Wallis test	
P value	0.4349	P value	0.1650
Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns	P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	No	Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	No
Number of groups	6	Number of groups	6
Kruskal-Wallis statistic	4.846	Kruskal-Wallis statistic	7.844

(A) Region CA1. (B) Región CA2+CA3.

Anexo 4. Prueba Kruskal-Wallis para el promedio de células marcadas con anti-O-GlcNac.

Kruskal-Wallis test	
P value	0.4658
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	6
Kruskal-Wallis statistic	4.606

Anexo 5. Test de Kruskal-Wallis para el porcentaje de neuronas O-GlcNAcizadas según metodología 1.

Kruskal-Wallis test	
P value	0.9564
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	6
Kruskal-Wallis statistic	1.073

Anexo 6. Test de Kruskal-Wallis para el porcentaje de neuronas O-GlcNAcizadas según metodología 2.

Kruskal-Wallis test	
P value	0.8800
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	6
Kruskal-Wallis statistic	1.770

Anexo 7. Test de Kruskal-Wallis para la comparación de metodologías 1 y 2 en conteo de neuronas O-GlcNAcizadas.

Kruskal-Wallis test	
P value	0.3527
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	No
Number of groups	12
Kruskal-Wallis statistic	12.15

Anexo 8. Test de Kruskal-Wallis para la comparación de metodologías 1 y 2 en conteo de células no neuronas O-GlcNaciladas.

Kruskal-Wallis test	
P value	0.9864
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	No
Number of groups	12
Kruskal-Wallis statistic	3.283

Anexo 9. Test de Kruskal-Wallis para el promedio de intensidad de glicosilación tipo O-GlcNAc en neuronas hipocampales según grupo de análisis.

Kruskal-Wallis test	
P value	0.6053
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	6
Kruskal-Wallis statistic	3.620

Anexo 10. Test de Kruskal-Wallis para la comparación de intensidad de en fluorescencia de glicosilación tipo O-GlcNAc neuronas y células no neuronas según grupo de análisis.

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0036
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	**
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	12
Kruskal-Wallis statistic	27.68

Anexo 11. Test de Mann-Whitney para la comparación de intensidad de en fluorescencia de glicosilación tipo O-GlcNAc neuronas y células no neuronas según grupo de comparación.

Table Analyzed	Unpaired t test data	Table Analyzed	Unpaired t test data	Table Analyzed	Unpaired t test data
Column A	N	Column A	N	Column A	N
vs	vs	vs	vs	vs	vs
Column B	NN	Column B	NN	Column B	NN
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	0.1000	P value	0.1000	P value	0.1000
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns	P value summary	ns	P value summary	ns
Are medians signif. different? (P < 0.05)	No	Are medians signif. different? (P < 0.05)	No	Are medians signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	15 , 6	Sum of ranks in column A,B	15 , 6	Sum of ranks in column A,B	15 , 6
Mann-Whitney U	0.0000 A	Mann-Whitney U	0.0000 B	Mann-Whitney U	0.0000 C
Table Analyzed	Unpaired t test data	Table Analyzed	Unpaired t test data	Table Analyzed	Unpaired t test data
Column A	N	Column A	N	Column A	N
vs	vs	vs	vs	vs	vs
Column B	NN	Column B	NN	Column B	NN
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	0.1000	P value	0.1000	P value	0.1000
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns	P value summary	ns	P value summary	ns
Are medians signif. different? (P < 0.05)	No	Are medians signif. different? (P < 0.05)	No	Are medians signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	15 , 6	Sum of ranks in column A,B	15 , 6	Sum of ranks in column A,B	15 , 6
Mann-Whitney U	0.0000 D	Mann-Whitney U	0.0000 E	Mann-Whitney U	0.0000 F

(A) Grupo F. (B) Grupo E. (C) Grupo B. (D) Grupo D. (E) Grupo A. (F) Grupo C.

Anexo 12. 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,

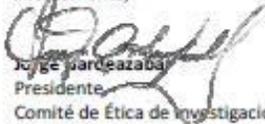
Respecto de la solicitud realizada al Comité de Ética de Investigaciones en Animales Experimentales para evaluar los siguientes estudios:

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 LESION CEREBRAL INDUCIDA POR ISQUEMIA EN UN MODELO EXPERIMENTAL.
3. USO DE LA SOLUCIÓN SALINA HIPERTÓNICA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA CEREBRAL EN RATAS: REDUCCIÓN DE LA PENUMBRA ISQUÉMICA Y DEL DAÑO SECUNDARIO.

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

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

Aterramente,


Jorge Pardeazaba
Presidente
Comité de Ética de Investigaciones en Animales Experimentales

Anexo 13. Presupuesto del proyecto.

RUBROS	FUENTES		
	<u>CONTRAPARTIA EN ESPECIE</u>	SOLICITADO A LA CONVOCATORIA	TOTAL
PERSONAL	\$ 30'000.000		\$ 30'00.000
IMAGENES DE <u>INMUNOHISTOQUIMICA</u> DE FLUORESCENCIA TOMADAS CON MICROSCOPIO CON FOCAL	\$10.000.000		\$10.000.000
SOFTWARE (<u>ImageJ</u>)	\$0		\$0
BIBLIOGRAFIA	\$0		\$0
TOTAL	\$40.000.000		\$40.000.000