

**CARACTERIZACIÓN DE LA ARQUITECTURA CORTICAL CON UN  
MARCADOR DE NEURONAS EN UN MODELO ANIMAL DE ISQUEMIA  
CEREBRAL EN RATAS EN TRATAMIENTO CON GLUCOSAMINA**

**DIANA CAROLINA SUAREZ ARIAS**

**UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
PROGRAMA DE QUÍMICA DE FARMACÉUTICA  
CALI  
2015**

**CARACTERIZACIÓN DE LA ARQUITECTURA CORTICAL CON UN  
MARCADOR DE NEURONAS EN UN MODELO ANIMAL DE ISQUEMIA  
CEREBRAL EN RATAS EN TRATAMIENTO CON GLUCOSAMINA**

**DIANA CAROLINA SUAREZ ARIAS**

**PROYECTO DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE QUIMICA  
FARMACÉUTICA**

**COTUTORAS:**

**JULIANA RENGIFO, MSc, PhD**

**PROFESORA DE LA UNIVERSIDAD ICESI**

**LINA BECERRA, MD, MSc**

**PROFESORA DE LA UNIVERSIDAD JAVERIANA – UNIVERSIDAD ICESI**

**UNIVERSIDAD ICESI**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**

**PROGRAMA DE QUÍMICA DE FARMACÉUTICA**

**CALI**

**2015**



Aprobado por:

---

**Julian Arbey González**

Evaluador

---

**Álvaro Barrera**

Evaluador

---

**Juliana Rengifo**

Director del Proyecto

---

**Lina Becerra**

Co- Director del Proyecto

Santiago de Cali, \_\_\_\_\_ de septiembre de 2015.

## **AGRADECIMIENTOS**

*Primero quiero agradecerle a Dios por haberme dado la fuerza en esta última etapa de mi vida universitaria. Le agradezco a mi tutora por su paciencia, motivación y sus conocimientos para finalizar este proyecto. A mi familia que me ha dado su apoyo incondicional, en especial a mi esposo y mi hija que han sido mi motor para finalizarlo.*

## Tabla de contenido

RESUMEN DEL PROYECTO .....	10
ABSTRACT .....	11
1. INTRODUCCIÓN .....	12
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO .....	14
2.1. Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia .....	14
2.2. Marco teórico y estado del arte: .....	15
2.3. Objetivos .....	24
2.3.1. Objetivo general: .....	24
2.3.2. Objetivos específicos: .....	24
2.4. Metodología utilizada .....	25
2.5. Matriz de marco lógico .....	30
2.6. Resultados .....	33
2.7. Discusión .....	39
2.8. Conclusiones: .....	48
2.9. Recomendaciones: .....	49
2.9. Bibliografía .....	50
3. Anexos: .....	53
3.1. Resultados fotográficos .....	53
3.2. Resultados estadísticos .....	60
3.3. Tinción con TCC .....	78
3.4. Distribución de la densidad neuronal en el neocortex .....	79
3.5. Carta de aprobación del comité de ética .....	80
3.6. Impacto ambiental .....	81

## Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de los grupos experimentales en corteza cerebral motora y sensitiva.....	26
Tabla 2. Anticuerpos primarios: .....	27
Tabla 3. Anticuerpos secundarios.....	27
Tabla 4. Matriz de marco lógico.....	30
Región supragranular corteza sensitiva	
Tabla 5 ANOVA para la región supragranular de la corteza sensitiva. ....	61
Tabla 6. Comparación entre los F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina).....	62
Tabla 7. Comparación entre los grupos B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) y D (tejido isquémico con tratamiento de glucosamina).....	62
Tabla 8. Comparación entre los F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina).....	63
Región infragranular corteza sensitiva	
Tabla 9. ANOVA para la región infragranular de la corteza sensitiva .....	66
Tabla 10. Comparación entre los F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina).....	67
Tabla 11. Comparación entre los grupos B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) y D (tejido isquémico con tratamiento de glucosamina).....	67
Tabla 12. Comparación entre los F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina).....	68
Región supragranular corteza motora	
Tabla 13. ANOVA para la región supragranular en la corteza motora.....	71
Tabla 14. Comparación entre los F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina).....	72
Tabla 15. Comparación entre los grupos B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) y D (tejido isquémico con tratamiento de glucosamina).....	72
Tabla 16. Comparación entre los F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina).....	73
Región infragranular corteza motora	
Tabla 17. Comparación entre los F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina).....	76
Tabla 18. Comparación entre los F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina).....	77
Tabla 19. Resultados de comparación entre los B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) y D (tejido isquémico con tratamiento de glucosamina).....	77

## Índice de figuras

Figura 1 Efecto de la disminución de ATP posterior a la fase hiperaguda de una isquemia cerebral y el efecto de una alta concentración de calcio .....	16
Figura 2. Mecanismos de formación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno y activación de leucocitos durante una lesión isquémica .....	17
Figura 3. Vías de señalización proapoptóticas y antiapoptóticas activadas por una isquemia cerebral.....	17
Figura 4. Áreas funcionales de la corteza cerebral .....	18
Figura 5. Esquema de las capas de la corteza cerebral .....	19
Figura 6. Número de neuronas detectados con el anticuerpo NeuN para la corteza sensitiva Comparación del F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina). .....	34
Figura 7. Número de neuronas detectados con el anticuerpo NeuN para la corteza motora Comparación del grupo F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina). .....	34
Figura 8. Número de neuronas detectados con el anticuerpo NeuN para la corteza sensitiva. Comparación del grupo sin tratamiento de glucosamina y con aplicación intraperitoneal de glucosamina media hora después de inducida la isquemia. ....	36
Figura 9. Número de neuronas detectados con el anticuerpo NeuN para la corteza motora. Comparación del grupo sin tratamiento de glucosamina y con aplicación intraperitoneal de glucosamina media hora después de inducida la isquemia. ....	36
Figura 10. Número de neuronas detectados con el anticuerpo NeuN para la corteza sensitiva. Comparación de F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina), .....	38
Figura 11. Número de neuronas detectados con el anticuerpo NeuN para la corteza motora. Comparación de F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina). .....	38
Figura 12. Corte coronal de la región frontal a 3,24mm del bregma .....	40
Figura 13. Descripción de la generación de la isquemia en el cerebro. ....	43
Figura 14. Fenómeno de neurogénesis por la acción de las células madre. ....	45
Figura 15. Prueba de normalidad para el promedio en el número de neuronas en la región supragranular de los cortes de la corteza sensitiva .....	60
Figura 16. Prueba de varianzas iguales para el promedio en el número de neuronas en la región supragranular de los cortes de la corteza sensitiva.....	61
Figura 17. Efectos principales para el promedio en el número de neuronas entre los grupos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) Y D (tejido isquémico con tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) .....	64
Figura 18. Interacciones de todos los grupos en el número de neuronas.....	64
Figura 19. Prueba de normalidad para el promedio en el número de neuronas en la región infragranular de los cortes de la corteza sensitiva .....	65
Figura 20. Prueba de varianzas iguales para el promedio en el número de neuronas en la región infragranular de los cortes de la corteza sensitiva.....	66

Figura 21. Efectos principales para el promedio en el número de neuronas de la región infragranular de corteza sensitiva .....	69
Figura 22. Interacciones de todos los grupos en el número de neuronas para la región infragranular de la corteza sensitiva . .....	69
Figura 23. Prueba de normalidad para el promedio en el número de neuronas en la región supragranular de los cortes de la corteza motora .....	70
Figura 24. Prueba de varianzas iguales para el promedio en el número de neuronas en la región supragranular de los cortes de la corteza motora .....	71
Figura 25. Efectos principales para región supragranular de corteza motora .....	73
Figura 26. Interacciones de todos los grupos en el número de neuronas de la región supragranular de corteza motora. ....	74
Figura 27. Prueba de normalidad para el promedio en el número de neuronas en la región infragranular de los cortes de la corteza motora .....	75
Figura 28. Prueba de varianzas iguales para el promedio en el número de neuronas en la región infragranular de los cortes de la corteza motora .....	76
Figura 29. Tamaño del infarto evaluado con TTC .....	78
Figura 30. Cantidad y distribución de neuronas bajo la señal de NeuN en ratas. .	79

### Índice de Imágenes

Imagen 1 Imágenes representativas de la señal de NeuN en la región supragranular para la corteza sensitiva y motora los individuos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina).....	33
Imagen 2. Imágenes representativas de la señal de NeuN en la región supragranular de la corteza sensitiva y motora de los individuos B (tejido isquémico sin tratamiento con glucosamina) y D (tejido isquémico con tratamiento con glucosamina).....	35
Imagen 3. Imágenes representativas de la señal de NeuN en la región supragranular de la corteza sensitiva y motora de los individuos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina).....	37
Imagen 4. Análisis inmunohistoquímico de la señal de NeuN en la población celular de neuronas para región supragranular de la corteza sensitiva de los individuos D (tejido isquémico con tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina). ....	53
Imagen 5. Análisis inmunohistoquímico de la de la señal de NeuN en la población celular de neuronas para región infragranular de la corteza sensitiva de los individuos D (tejido isquémico con tratamiento con glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento con glucosamina) .....	53
Imagen 6. Análisis inmunohistoquímico de la de la señal de NeuN en la población celular de neuronas para región supragranular de la corteza sensitiva de los individuos F(tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina). ....	54

Imagen 7. Análisis inmunohistoquímico de la de la señal de NeuN en la población celular de neuronas para región infragranular de la corteza sensitiva de los individuos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) .....	54
Imagen 8. Análisis inmunohistoquímico de la de la señal de NeuN en la población celular de neuronas para región supragranular de la corteza sensitiva de los individuos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina).....	55
Imagen 9. Análisis inmunohistoquímico de la de la señal de NeuN en la población celular de neuronas para región infragranular de la corteza sensitiva de los individuos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina).....	55
Imagen 10. Análisis inmunohistoquímico de la de la señal de NeuN en la población celular de neuronas para región supragranular de la corteza motora de los individuos D (tejido isquémico con tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) .....	56
Imagen 11. Análisis inmunohistoquímico de la de la señal de NeuN en la población celular de neuronas para región infragranular de la corteza motora de los individuos D (tejido isquémico con tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) .....	56
Imagen 12. Análisis inmunohistoquímico de de la señal de NeuN en la población celular de neuronas para región supragranular de la corteza motora de los individuos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) .....	57
Imagen 13. Análisis inmunohistoquímico de la de la señal de NeuN en la población celular de neuronas para región infragranular de la corteza motora de los individuos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) .....	57
Imagen 14. Análisis inmunohistoquímico de la de la señal de NeuN en la población celular de neuronas para región supragranular de la corteza motora de los individuos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina) .....	58
Imagen 15. Imágenes representativas de la señal de NeuN de la corteza sensitiva de los individuos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina) .....	59

## RESUMEN DEL PROYECTO

El cerebro es una compleja red biológica encargada de almacenar toda la información del entorno, otorgándole una personalidad única a la especie humana así como a otros animales. Está conformado por la corteza cerebral, la sustancia blanca o cuerpo caloso y los núcleos de la base.

En Colombia así como en muchas partes del mundo, se ha dado una búsqueda continua dirigida a entender las complejas conexiones neuronales propias de la corteza cerebral. Los estudios en tejidos isquémicos han permitido observar cambios en la morfología neuronal, homeostasis y en procesos apoptóticos y/o necróticos característicos de la isquemia. En la corteza cerebral se dan las principales señales sensoriales que provienen del núcleo talámico y que se conectan con otras regiones del cerebro, por lo cual procesos isquémicos pueden alterar su producción de ATP, la vasodilatación, microcirculación, despolarización, transducción de señales, etc. que pueden generar cambios en los procesos cognitivos, motores, sensoriales y asociativos.

En los últimos años se han encontrado sustancias que presentan un efecto citoprotector al intervenir en diferentes puntos de las cascadas necróticas y apoptóticas de un proceso isquémico de esta manera poder mejorar la supervivencia y reducir la lesión neuronal. Dentro de estos se encuentra que la glucosamina a partir de modificaciones postraduccionales de residuos de serina y treonina puede regular la transcripción, modificación proteica en el núcleo, señalización, degradación, transporte, además de disminuir los factores pro-apoptóticos y aumentar los factores anti-apoptóticos que se generan durante la muerte celular programada.

Con este proyecto se espera determinar si la glucosamina mejora la supervivencia celular en la zona de penumbra de la corteza cerebral en ratas wistar a las cuales se les practicó una cirugía experimental MCAO (Middle cerebral artery occlusion), con el fin de generar el conocimiento básico necesario para iniciar estudios clínicos en personas para mejorar su calidad de vida además de otorgarle a la región del Valle del Cauca competitividad e innovación en el estudio del funcionamiento del tejido cerebral.

Para determinar la citoprotección cortical, se emplearán una técnica de fluorescencia a partir del anticuerpo celular NeuN que permite marcar el núcleo, somas y dendritas en neuronas maduras con el fin de observar cambios en la densidad y en su morfología.

**Palabras claves:** isquemia, corteza cerebral, NeuN, Glucosamina, supragranular, infragranular.

## ABSTRACT

The brain is a complex biological network responsible for storing all information from the environment, giving a unique personality to the human species and other animals. It consists of the cerebral cortex, corpus callosum and white matter and basal ganglia.

In Colombia as in many parts of the world, there has been a continuous search aimed at understanding the complex neural connections of the cerebral cortex. Studies in ischemic tissues have reported changes in neuronal morphology, homeostasis and apoptotic processes and / or characteristic necrotic ischemia. The cerebral cortex receives major sensory signals from the thalamic nucleus and connect to other regions of the brain, ischemic processes may alter ATP production, vasodilation, microcirculation, depolarization, signal transduction, etc. which can cause changes in cognitive processes, motor, sensory and associative.

In recent years it has been reported that substances that have a cytoprotective effects intervene in different parts of the necrotic and apoptotic cascades of an ischemic process, improving survival and reducing neuronal injury. Among these substances is glucosamine which generates a posttranslational glycosilation modification of serine and threonine protein residues that can regulate transcription, protein modification in the nucleus, signaling, degradation, and transport, thus decreasing the pro-apoptotic factors and increasing the anti-apoptotic factors that are generated during programmed cell death.

This project is expected to determine whether glucosamine improves cell survival in the cerebral cortex of Wistar rats which have undergone an experimental surgery MCAO (Middle cerebral artery occlusion). The objective is to generate basic knowledge necessary to initiate clinical studies in people with ischemia in order to improve their quality of life. The project also grant region of Valle del Cauca competitiveness and innovation in the study of the functioning of the brain.

To determine the cortical cytoprotection, we used a technique of immunofluorescence using NeuN antibody to detect the nucleus, soma and dendrites of mature neurons in order to observe changes in cell number and morphology.

Keywords: ischemia, cerebral cortex, NeuN, Glucosamine, supragranular layer, infragranular layer.

## 1. INTRODUCCIÓN

Con el paso de los años, ha aumentado el número de casos de personas con lesiones cerebrales. Enfermedades cardíacas, diabetes, arterosclerosis además de malos hábitos como el tabaco, alcohol, sedentarismos, estrés, junto a la edad y los accidentes de tránsito son los principales factores de riesgo para padecer esta enfermedad

La isquemia cerebral es un tipo de lesión en donde ocurre una limitación de la cantidad de oxígeno que llega al cerebro a partir de la obstrucción de las arterias que lo irrigan, esto puede generar daño de manera irreversible o severa dependiendo del tiempo de exposición y de la gravedad de la lesión, afectando de esta manera el desarrollo cognitivo, motor y sensorial en el cerebro (Montaner, 2007).

En Colombia y el resto del mundo, una de las principales causas de muerte e incapacidad se atribuye este tipo de lesiones cerebrales, generando un alto costo social y económico. Estudios recientes han encontrado que esta reducción en la cantidad de oxígeno que llega al cerebro puede afectar las conexiones neuronales de la corteza cerebral. A partir de esto se ha visto la necesidad de encontrar mecanismos que disminuyan el daño ocasionado por la isquemia. Uno de los tratamientos que se ha venido trabajando es con la utilización de la glucosamina; estudios recientes han reportado que esta sustancia puede desarrollar resistencia al daño isquémico y mejorar la funcionalidad de las células de la zona de penumbra.

La isquemia cerebral está caracterizada por presentar dos regiones: una región central con alto daño isquémico en el cual las células tienen la imposibilidad de recuperar su funcionalidad y su capacidad de hacer sinapsis, renovar dendritas, etc. (plasticidad neuronal) llevando a la muerte. La segunda región también llamada zona de penumbra en el cual las células se encuentran intactas pero funcionalmente inactivas. Esta última región es la diana farmacológica en la que se espera que la glucosamina permita recuperar su plasticidad y aumenta la supervivencia celular en la corteza cerebral (Montaner, 2007).

La isquemia presenta varios cambios en la homeostasis celular, presentándose un incremento de la vasodilatación, la acidosis láctica y una supresión de la autorregulación y de la actividad metabólica así como una disminución de la viscosidad sanguínea y los mecanismos vasodilatadores neurogénicos. Cada uno de estos pasos está acompañado en una disminución del ATP y de una despolarización celular que conllevan finalmente a liberar sustancias que favorecen los mecanismos de muerte como la necrosis y la apoptosis (Arango Davila, Escobar Betancourt, Cardona Gomez , & Pimienta Jimenez , 2004).

La zona central se caracteriza por presentar una muerte por vía necrótica en el cual hay una pérdida en la homeostasis que libera material tóxico al medio extracelular liberando sustancias inflamatorias y la imposibilidad de recuperar la funcionalidad celular. En cambio, la zona de penumbra presenta una muerte organizada conocida como apoptosis necesitando un gasto extra de energía como el ATP (Montaner, 2007).

Se ha visto que la glucosamina genera modificaciones postraduccionales con enlaces tipo O-ligada N-acetilglucosamina (O-GlcNAc) en proteínas nucleares y citoplasmáticas ( Lazarus, Love, & Hanover, 2009). El efecto citoprotector de la glucosamina radica en regular la transcripción, señalización, degradación proteosómica, transporte de organelos, inmunomoduladores, antioxidativos, disminución de la expresión de proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2, Bax y Bad y la liberación de citocromo C, la tolerancia a peróxidos, disminución de los efectos del aumento de la concentración de calcio en el citoplasma, etc (Champattanachai, Marchase, & Chatham, 2008).

La corteza cerebral es la región cerebral con mayor complejidad en las conexiones neuronales, encargada de regular funciones excitatorias, inhibitorias, modulares, sensoriales, de asociación y motoras (Valverde, 2002). Se espera con este estudio que el efecto citoprotector que tiene la glucosamina se manifieste en la supervivencia de las células neurales de la corteza cerebral de ratas con isquemia y se puedan identificar las regiones de las láminas de la corteza cerebral que son más propensas al daño isquémico a partir de una tinción fluorescente con un marcador de NeuN, el cual ofrece la capacidad de analizar la funcionalidad de las células a partir de la antigenicidad de la proteína NeuN que se encuentra en el núcleo, citoplasma y el inicio de los axones en las células maduras (Dredge, 2011).

## **2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO**

### **2.1. Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia**

En los últimos años universidades del territorio colombiano han estado incursionando en la investigación de tejidos cerebrales con lesiones vasculares, siendo una de las primeras causas de muerte e incapacidades en la población mundial, generando altos costos sociales y económicos por parte de las entidades promotoras de salud. Estudios más recientes han encontrado que la reducción en la perfusión sanguínea cerebral por una isquemia afecta directamente las conexiones neuronales en la corteza, causando problemas cognitivos, motores, entre otros como irreversibles o severos. A partir de esto se ha visto la necesidad de encontrar mecanismos que eviten la formación de daños tisulares ya sea aumentando la resistencia al daño isquémico, la interferencia de los procesos propios de la isquemia o potenciando la capacidad de recuperar el tejido lesionado. La razón para realizar estos estudios de citoprotección neuronal con la glucosamina se debe a que se ha encontrado que esta sustancia estimula un proceso de modificación de proteínas análogo a la fosforilación, no sólo participa en las cascadas de transducción (transcripción y señalización) en enfermedades crónicas como el cáncer, neurodegenerativas, diabetes y coronarias sino que además la O-GlcNAc es indispensable para la supervivencia celular. A partir de esta tesis se puede realizar el siguiente cuestionamiento: ¿es posible que la administración de glucosamina en pacientes que padezcan una isquemia cerebral, puedan mejorar su calidad de vida?

Mediante herramientas estadísticas, se buscará evaluar el efecto de la glucosamina en un modelo animal de isquemia cerebral en ratas, empleando la técnica inmunohistoquímica con el marcador Neuronal nuclear antigen (NeuN) que en el caso de la corteza cerebral marca selectivamente el soma de células piramidales e interneuronas. Estos ensayos van a permitir evaluar los cambios en la morfología neuronal posterior a un evento isquémico debido a cambios necróticos y/o apoptóticos y definir si hay un mejoramiento o no con la administración de la glucosamina. A partir de esto, en un futuro se pondrán desarrollar fármacos que permitan recobrar parcial o totalmente la funcionalidad cerebral, fomentando un crecimiento investigativo y competitivo de la región a la par con otros países del mundo líderes en el conocimiento de estos temas.

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

### **Descripción de fisiopatología de la isquemia cerebral:**

Se define una isquemia cerebral como una limitación de la cantidad de oxígeno que llega al cerebro por una obstrucción del paso de sangre de las principales arterias que lo irrigan, causando un daño que generalmente no ocurre de manera homogénea y puede ser leve o severo dependiendo del tiempo de exposición y la gravedad de la lesión. Se pueden observar dos regiones características: una región central de alta densidad isquémica que a futuro evolucionará en un infarto y una región periférica de menor intensidad, también conocida como penumbra isquémica, en donde las células se encuentran intactas pero funcionalmente inactivas; esta última región va a presentar dos tipos de desenlace: la primera radica gracias a la plasticidad celular mejorar su estado funcional recuperando parte de su funcionamiento y segundo, en la que es imposible recuperar la plasticidad y por lo tanto se va a dar un proceso irreversible en donde hay muerte celular en la corteza. La progresión de la zona de penumbra dependerá entonces del grado de circulación arterial, duración de la isquemia y el estado funcional y metabólico previo de la célula. (Montaner, 2007).

El mecanismo de la isquemia se puede dividir en varios pasos. La primera se da en cambios fisiológicos con el fin de mantener la homeostasis durante la lesión con el incremento de la vasodilatación, de la acidosis láctica y una supresión de la autorregulación y de la actividad metabólica. Segundo, con el cese de la obstrucción, va a generar un aumento del flujo sanguíneo con más metabolitos vasoactivos, disminuyendo la viscosidad sanguínea y los mecanismos vasodilatadores neurogénicos (Arango Davila, Escobar Betancourt, Cardona Gomez , & Pimienta Jimenez , 2004). Posteriormente, sigue un periodo de prolongado de hipoperfusión post-isquémica por la obstrucción en la microcirculación y vasoparálisis. Cada uno de estos pasos viene acompañado de una disminución del ATP y de una despolarización celular como consecuencia de un incremento de los niveles de calcio, sodio y clorointracelular, liberando de esta manera sustancias que favorecen los mecanismos de muerte (Arango Davila, Escobar Betancourt, Cardona Gomez , & Pimienta Jimenez , 2004)

Se ha visto que en la zona central de la isquemia se presenta una muerte celular necrótica caracterizada por un mecanismo bioquímico desordenado en el que es imposible mantener un equilibrio homeostático, ocasionando finalmente la liberación de todo el material citoplasmático y de sustancias inflamatorias en la región. En cambio en la zona de penumbra, en donde las células se encuentran morfológicamente intactas, la cascada de transducción de señales favorecen una muerte celular programada conocida como apoptosis, este proceso a diferencia de la necrosis es ordenado y dependiente de ATP en donde se maximiza la activación de proteínas de las vías apoptóticas (intrínseca y extrínseca) bajo la

producción constante de caspasas, proteínas Bcl-2 y Anoikis (Becerra & Pimienta, 2009); todo esto con el fin de formar cuerpos apoptóticos que no activen factores inflamatorios y puedan ser degradados por fagocitosis sin dañar las células aledañas. Cabe anotar que durante la isquemia hay una disminución en la formación de ATP, por lo que dependiendo de la gravedad de la lesión, la cantidad de energía puede no ser suficiente para completar el gasto energético apoptótico y terminar con una muerte necrótica

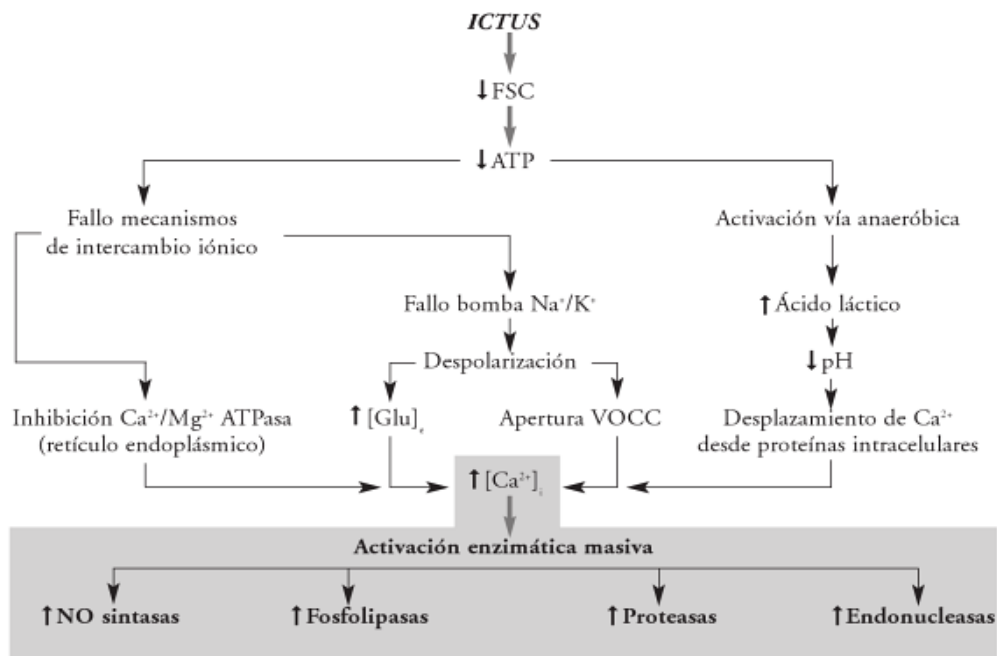


Figura 1 Efecto de la disminución de ATP posterior a la fase hiperaguda de una isquemia cerebral y el efecto de una alta concentración de calcio (Montaner, 2007)

Con la isquemia se van dando numerosas cascadas de transducción de señales que repercuten en la presencia de fenómenos excitotóxicos como glutamato- $\text{Ca}^{2+}$ , estrés oxidativo por radicales libres de NO sintasa y de fosfolipasa A2, inflamatorios por la liberación de leucocitos, señalización nuclear por mecanismos de transcripción y muerte neuronal mencionada anteriormente (Montaner, 2007).

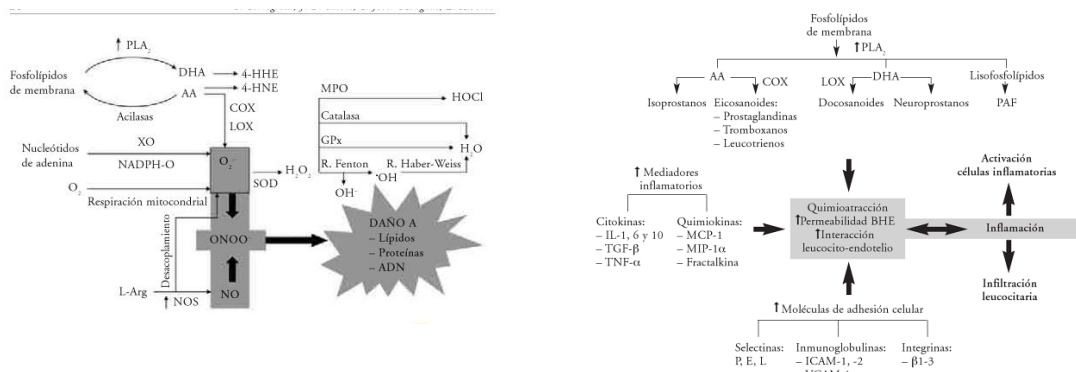


Figura 2. Mecanismos de formación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno y activación de leucocitos durante una lesión isquémica (Montaner, 2007)

Durante la isquemia cabe destacar los mecanismos que regulan las respuestas y la supervivencia celular como lo son la activación de factores de transcripción como MAPKs, proteín kinasa A (PKA), proteín kinasa B (PKB) y protein kinasa C (PKC) que fosforilan enzimas intracelulares, otros factores de transcripción, proteínas citosólicas y cascadas apoptóticas e inflamatorias. Como balance celular también deben activarse otras rutas antiapoptóticas y vías de señalización como PI3K/Akt y RAS-MAP que contribuyen a la proliferación y al crecimiento celular. Además de estos factores de transcripción también se encuentran las chaperonas moleculares conocidas como proteínas de shock térmico encargadas de regular la agregación, el ensamblaje, el transporte y el plegamiento de proteínas durante el crecimiento, el mantenimiento celular, la diferenciación, la señalización, la migración y la supervivencia neuronal. (Arango Davila, Escobar Betancourt, Cardona Gomez , & Pimienta Jimenez , 2004)

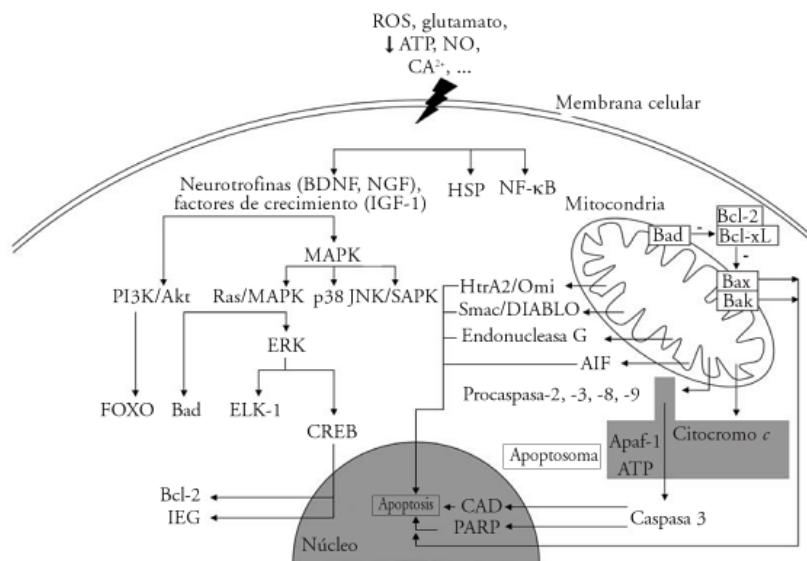


Figura 3. Vías de señalización proapoptóticas y antiapoptóticas activadas por una isquemia cerebral (Montaner, 2007)

## Descripción de la morfología y el funcionamiento de la corteza cerebral

Después de conocer el mecanismo de la isquemia cerebral se puede comprender la razón mediante el cual se afecta morfológicamente la red neuronal que se encuentra en la sustancia gris de la corteza cerebral. Para fines de esta investigación, es necesario entender el funcionamiento y la morfología de la corteza con el fin de identificar las regiones más susceptibles a un infarto. La corteza cerebral es una lámina gris que tiene alrededor de 5 mm de grosor y cubre los hemisferios cerebrales. Es capaz de regular funciones excitatorias, inhibitorias, modulares, sensoriales, de asociación y motoras. Esta estructura ha venido evolucionando con el pasar del tiempo y es lo que caracteriza al hombre en su capacidad de raciocinio y su relación con el entorno en comparación a otros animales.

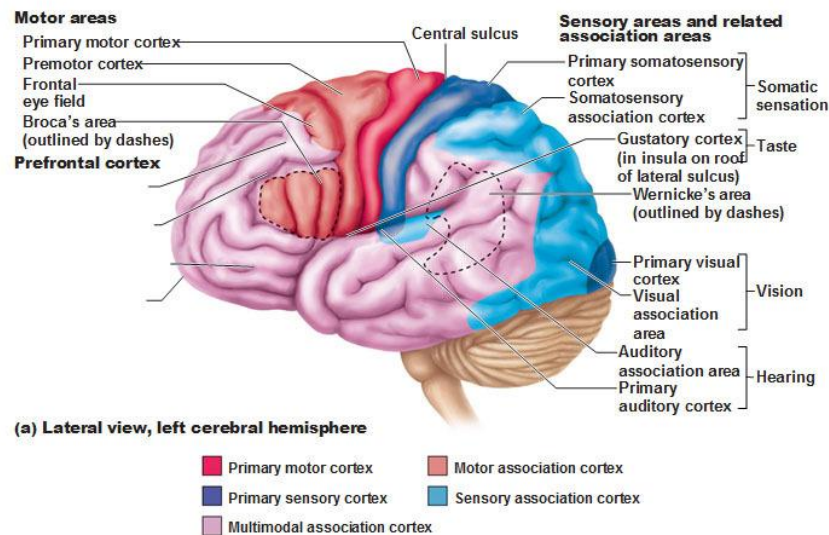


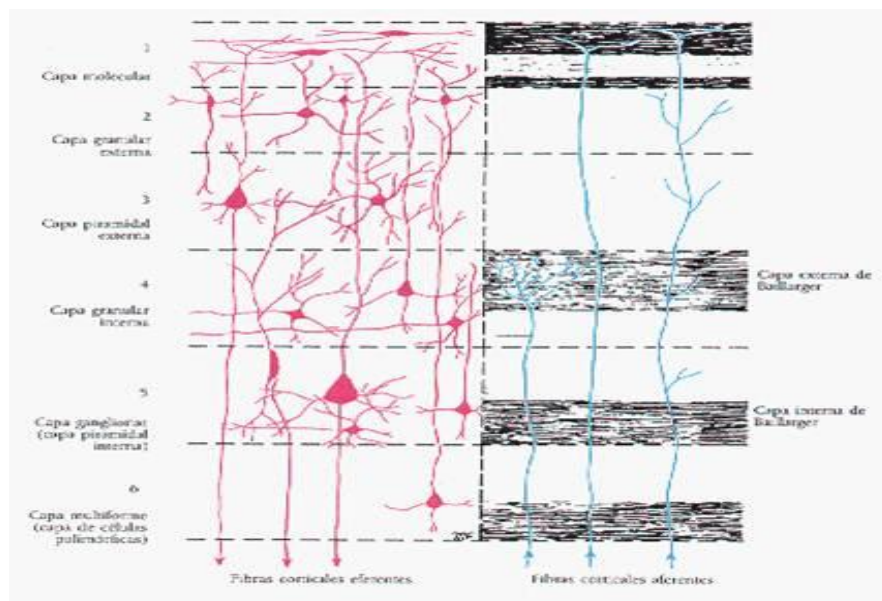
Figura 4. Áreas funcionales de la corteza cerebral (Antranik, 2011)

Esta corteza está conformada por dos regiones fundamentales: El isocortex o neocortex, como su palabra lo indicada es una región nueva a la que se le ha ido adicionando capas durante la evolución hasta llegar a seis laminas características que se pueden apreciar en la mayoría de animales. El aloccortex representado por el archicortex y el paleocortex y es la región más primitiva (Valverde, 2002)

El neocortex va a presentar fibras aferentes talamocorticales específicas e inespecíficas; Las fibras aferentes específicas traen señales sensoriales filtradas por estaciones de relevo en el núcleo talámico en la que sus fibras pueden hacer sinapsis con las células estrelladas de la capa IV de las áreas sensoriales, en la capa III de áreas asociativas y algunas hasta llegar a la capa VI. Las fibras aferentes inespecíficas provienen del núcleo intralaminar, estas generan proyecciones difusas en todas las láminas, pero principalmente se manifiesta en la

capa I y III. También se encuentra aferentes propias de la corteza como lo son fibras de asociación y comisurales, las primeras conectan un mismo hemisferio y las segundas conectan hemisferios diferentes a través del cuerpo caloso, suelen conectarse con eferentes tálamicos y subcorticales principalmente de la capa II y III. (Escobar & Pimienta , 2008)

La capa I, también conocida como plexiforme externa es caracterizada por una densidad baja de sinapsis por lo que se pueden encontrar las terminaciones de las dendritas y axones de células piramidales y células horizontales de Cajal. En la capa II o granular externa se ve muy diferenciada durante el desarrollo embrionario y está conformada por células piramidales pequeñas que presenta eferentes cortico-corticales con el mismo hemisferio o con hemisferios opuestos. La capa III también presenta eferentes cortico-corticales conformada por células piramidales medianas, esta capa es muy diferenciada en el ratón debido a que su gran tamaño está relacionado con los procesos motores. La capa IV o granular interna contiene células piramidales y células estrelladas que presentan fibras aferentes tálamicas debido a que esta lámina recibe las señales sensitivas con el entorno. La capa V está constituida por células piramidales medianas que se conectan con fibras eferentes cortico-subcorticales del tallo, núcleo y médula. Finalmente, la capa VI se encuentran células de forma irregular, fusiformes o polimorfas que se conectan con fibras eferentes cortico-tálamicas y subcorticales, las células piramidales van a presentar los axones más largo de la corteza debido a los lugares tan distantes a los que hace sinapsis.



*Figura 5. Esquema de las capas de la corteza cerebral (Papez)*

La corteza cerebral va a presentar dos tipos de células fundamentales, las células piramidales y las células intrínsecas:

Las células piramidales son las células fundamentales de la corteza debido a que estas ejecutan todos los procesos de memoria, aprendizaje y actividad sináptica de la corteza además de ser las únicas en extender sus axones hasta regiones muy alejadas como al cuerpo calloso, el tálamo y la medula espinal. Estas células son glutamatérgicas, es decir, de tipo excitatorio. Son más abundantes en las capas II-III y V-VI de la corteza. Están caracterizadas por poseer espinas dendríticas plásticas y móviles que aumentan el área superficial de contacto con otras células favoreciendo las interacciones excitatorias. Presenta dendritas basales que alcanzan distancias variables y dendritas apicales que en la mayoría de los casos llegan hasta la capa I. La mayoría de las espinas dendríticas tienen sinapsis con eferentes tálamo-corticales de las capas III, IV y V; eferentes subcorticales de la capa VI y eferentes cortico-subcortical en la capa V. (Valverde, 2002). Las espinas dendritas son las más afectadas durante un ictus isquémico por lo que tienden a desaparecer y reaparecen al cese de este.

Las células intrínsecas son también conocidas como Golgi tipo II por que no salen de la corteza. No presentan espinas dendríticas a excepción de las células estrelladas con espinas y presentan un axón y un soma pequeño. Dentro de esta clasificación se van a encontrar diferentes tipos principalmente GABAérgicas, es decir inhibitorias con dos excepciones (células bipolares y células estrelladas con espinas):

- Células con axones ramificados en la proximidad del cuerpo celular
- Células de axón ascendente
- Células con arcadas axonales recurrentes
- Células con axón formando cestos pericelulares
- Células multipolares
- Células en candelabro
- Células en ovillo
- Células bipenachadas
- Células bipolares
- Células estrelladas con espinas

La corteza motora se encuentra en la parte posterior del lóbulo frontal y se clasifica en corteza motora primaria, corteza premotora y suplementaria. Recibe órdenes de la corteza somatosensorial primaria y de las áreas de integración sensitiva de la corteza parietal. Dentro de las láminas de la corteza cerebral en la capa 5, los axones de las células piramidales de la corteza motora primaria se conectan con las motoneuronas las cuales se encargan de la destreza y ejecución del movimiento. La corteza suplementaria y premotora son las encargadas de la planificación del movimiento, especialmente de movimientos complejos como la

elaboración de planes de movimiento. La corteza premotora recibe aferencias de la corteza visual. (Gal Iglesias, Lopez, Marin, & Prieto, 2007). La corteza somatosensitiva es la encargada de percibir los cambios en el entorno; a diferencia de los seres humanos, la rata presenta una corteza sensitiva más desarrollada y con mayor cantidad de receptores sensitivos que le permiten distinguir peligros, comida, refugio etc. ( Silverthorn, 2008). Durante un ictus isquémico no es posible determinar qué corteza del cerebro se puede afectar más, ya que este fenómeno no se da de manera homogénea y depende del grado de la isquemia, obstrucción arterial y el tiempo de la lesión.

### **Descripción de la O-glicosilación**

Después de evaluar la estructura y el funcionamiento de la corteza cerebral, es necesario describir el papel que tiene la glucosamina a nivel bioquímico en el organismo. Esta sustancia funciona a partir de modificaciones postraduccionales con enlaces tipo O-ligada N-acetilglucosamina (O-GlcNAc), los cuales consisten en un proceso dinámico y reversible en la cual un monosacárido (N-acetil-D-glucosamina, O-GlcNAc) se une a residuos de serina y treonina de proteínas nucleares y citoplasmáticas. En los estudios iniciales de la O-glcNAc de proteínas se localizó que sus sustratos principales se localizaban en la envoltura nuclear y en las proteínas de los poros nucleares, aunque con la el avance en la proteómica se han evidenciado más de quinientas proteínas citoplasmáticas y nucleares. La complejidad en el entendimiento del mecanismo de la modificación de O-GlcNAc radica en que cada uno de estos sustratos participa en una variedad de procesos celulares como lo son la transcripción, traducción, respuesta al estrés, metabolismo, síntesis de proteínas y estructura celular. Interrupciones en el ciclo de la O-GlcNAc puede generar enfermedades como la diabetes, neurodegenerativas, cardiovasculares y respuestas al envejecimiento ( Lazarus, Love, & Hanover, 2009).

### **Mecanismos citoprotectores de la glucosamina**

El efecto citoprotector de la glucosamina en la que se basa este estudio, radica en evidencia científica que está relacionada con la patogénesis en enfermedades cardiovasculares, obesidad y diabetes. Se ha encontrado que la falla cardíaca causadas por la diabetes presenta anormalidades en el metabolismo intermedio, fibrosis cardíaca, función endotelial y células del musculo liso aunque los mecanismos como tal no son muy bien conocidos, a pesar de esto se ha encontrado que un aumento de los niveles de O-ligada N-acetilglucosamina (O-GlcNAc) en las proteínas hacen parte del mecanismo patogénico de la enfermedad. (McLarty, 2013). La O-GlcNAc cycling (OGT) controla la cantidad de nutrientes que entra a la células y por ende afectar la síntesis de glucógeno a través de la ruta de biosíntesis de la hexosamina. Se ha observado que este

precursor necesita la uridina -diphospho-Nacetylglucosamine (UDP-GlcNAc) como paso final en su etapa terminal. La cantidad de UDP-GlcNAc va a depender de la cantidad de nutrientes que contenga la célula así como de la cantidad de OGT. Se ha investigado de gran manera en la patogénesis de la diabetes y se ha encontrado una resistencia a la insulina posiblemente porque la UDP-GlcNAc es una sustancia que participa en la regulación de la vía de señalización de la insulina además de ser parte del vínculo entre exceso de nutrientes–insulina. Finalmente se ha visto que aumentando los niveles de O-GlcNAc con un inhibidor de OGA, o elevando los niveles de O-GlcNAc con glucosamina induce resistencia a la insulina en adipositos L1. El ciclo de O-GlcNAc tiene un papel multifacético en el control de las respuestas celulares a la glucosa. Su influencia se siente en la activación inicial del receptor, a través de las quinasas intermedias y a la activación de factores de transcripción sensibles a la insulina. En este caso se puede presentar un paradigma, en las vías de señalización de la insulina periférica hay una asociación con una resistencia a la insulina y la diabetes tipos 2, mientras que niveles bajo pueden estar relacionados con problemas neurodegenerativos. El efecto a nivel neuronal no se conoce a profundidad, solo que la cantidad de OGT es sumamente alta por lo que los sustratos en el cerebro son considerables. Dentro de los procesos bioquímicos que pueden darse a nivel cerebral se tienen ( Lazarus, Love, & Hanover, 2009):

- Regulación de la transcripción
- Señalización
- Degradación proteosómica
- Transporte de organelos

Uno de los mecanismos citoprotectores de la glucosamina, radica en que la sobreexpresión de OGT que cataliza la formación de O-GlcNAc reduce la lesión celular posiblemente al alterar las proteínas de la familia de Bcl-2, aumentando la toleración a la H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y atenuando la liberación del citocromo c de la mitocondria durante un proceso apoptótico. La familia BCL-2, son proteínas transmembranales que participan en la regulación de las cascadas de muerte celular intrínseca. Se pueden encontrar dos subdivisiones: un grupo antiapoptótico conformado por Bcl-2, CED-9, Bcl-xL y otro proapoptótico como Bax y Bad. Estas proteínas regulan la apoptosis a partir de la preservación o el rompimiento de la membrana de la mitocondria dando paso o no a la liberación del citocromo c al citosol. Estudios en células de mamíferos se ha encontrado que durante un estímulo de estrés isquémico en cardiomiocitos, la expresión de enlaces de tipo O-GlcNAc permite una disminución en la sensibilidad al estrés a partir de mecanismos de modificación proteica en el núcleo y el citoplasma además de una disminución de los efectos que genera un aumento de calcio, característico de la isquemia. (Champattanachai, Marchase, & Chatham, 2008)

La glucosamina además de presentar efectos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades isquémicas, también se ha visto un efecto terapéutico para procesos inmunomodulatorios, antioxidativos, antitumorales, anti-apoptóticos y antimicrobianos. Enfermedades como la artritis es caracterizada por dolor intenso en las articulaciones propias de la inflamación, los estudios experimentales han evidenciado que la glucosamina funciona como tratamiento al inducir la autofagia y la inhibición de la actividad de ciclooxigenasa-2 (COX-2), óxido nítrico sintasa, metaloproteasas y del factor nuclear kappa B. En enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer puede aumentar los procesos cognitivos en las ratas además de disminuir los niveles de citocinas, los cuales son aumentados por la microglia, monocitos, macrófagos. Funcionan muy bien como antioxidantes debido a su gran efecto quelante al atrapar radicales libres, de citoprotección en las macromoléculas (lípidos, proteínas, ADN) al evitar el daño oxidativo de los radicales hidroxilos ( $\text{OH}^\cdot$ ) (Khadijeh , Hamid, & Ghazaleh , September 2013).

El preconditionamiento isquémico se ha conocido desde hace dos décadas como un fenómeno de protección endógena generado al inducir una serie de isquemias cortas intercaladas con periodos de reperfusión, los cuales estimulan de manera no letal el miocardio con el fin de minimizar la muerte por necrosis en el tejido. Este mecanismo desencadena un aumento de ATP, disminución de AMP cíclico y de la entrada de calcio al miocito, generando de esta manera que el tejido cardíaco tenga mayor tolerancia a la isquemia con el fin de disminuir el tamaño de esta. (BELZITIMTSAC, 2007). Se ha evidenciado también que dentro de este preconditionamiento se incrementan la actividad O-GlcNAc con el aumento de glucosamina, sobreexpresión de O-GlcNAc transferasa la cual es la encargada de glicosilar los residuos de serina y treonina en las proteínas. (Vibjerg, Johnsen, Kristiansen, & Zachara, 2013).

Para poder caracterizar las regiones en la corteza cerebral en los tejidos de los cortes cerebrales, es necesario utilizar una técnica de fluorescencia con anticuerpos que marque las proteínas NeuN de manera selectiva. Este marcado detecta exclusivamente las neuronas post-mitóticas y detecta solo las células maduras. Al microscopio se van a poder evidenciar el soma, núcleo y la base del axón en las células neuronales funcionales de la corteza cerebral (piramidales y extrínsecos) además de evidenciar que zonas del modelo experimental posterior a la isquemia presenta cambios según la intensidad de la lesión, prediciendo el tipo de muerte neuronal en cada sector. (Dredge, 2011)

## **2.3. Objetivos**

### **2.3.1. Objetivo general:**

Identificar si la glucosamina funciona como citoprotector en la corteza cerebral de ratas sometidas a isquemia cerebral focal, en el transcurso del año 2015.

### **2.3.2. Objetivos específicos:**

- Marcar las células neuronales de la corteza cerebral con NeuN
- Identificar qué región de corteza cerebral es más susceptible a un ictus isquémico.
- Reconocer el efecto de la glucosamina en los tejidos cerebrales como un factor en el mejoramiento de la morfología celular.

## **2.4. Metodología utilizada**

A continuación se describirá el procedimiento experimental que se llevó a cabo durante el desarrollo del presente proyecto, abarcando la realización de los cortes cerebrales de ratas, tinción de fluorescencia, el conteo de células y finalmente el análisis estadístico de los resultados obtenidos.

Para realizar el estudio experimental del efecto de la glucosamina como sustancia citoprotectora en un modelo de isquemia/reperfusión local y excitotoxicidad no isquémica en la corteza cerebral, fue necesario seleccionar debidamente los animales de estudio, para esto los sujetos experimentales deben ser ratas Wistar adultas machos con un peso entre 240 a 320 gramos y con 120 a 180 días de edad, con el fin de evitar hormonas que puedan afectar el estudio. Durante los procedimientos se realizará una evaluación continua de la función cardiorespiratoria y de la temperatura rectal manteniéndose esta última a 37 °C con una lámpara de calor.

El procedimiento de isquemia focal se realizó bajo una obstrucción en la arteria carótida media en el lado derecho del cuello con un nylon monofilamento 4-0 de 3.5 cm durante 90 minutos y el tratamiento con glucosamina en los grupos designados se aplicó media hora después de producir la isquemia por vía intraperitoneal con una dosis única de 200mg/Kg según protocolos anteriores (Hwang, y otros, 2010). Los tejidos cerebrales utilizados pertenecen a cortes de la corteza cerebral fronto-parietal derecha. Los cerebros de las ratas fueron perfundidos con formaldehído al 4% en tampón fosfato y almacenados en solución de PBS.

### **Diseño experimental**

Para definir el papel de la glicosilación de proteínas tipo O-GlcNAc en los mecanismos de supervivencia o muerte celular en lesiones experimentales de la lámina supra-granular e infragranular de la corteza motora y sensitiva en la isquemia cerebral focal, reperfusión y excitotoxicidad no isquémica se plantea la asignación de grupos experimentales, grupos control y grupos para evaluación conductual como sigue:

(B) Grupo sin tratamiento de glucosamina con isquemia, sobrevivida a 6 horas, n=3.

(D) Grupo con tratamiento de glucosamina con isquemia, sobrevivida a 6 horas, n=3.

(F) Grupo sin tratamiento de glucosamina sin isquemia, sobrevivida a 6 horas, n=3.

(E) Grupo con tratamiento de glucosamina sin isquemia, sobrevivida a 6 horas, n=3.

*Tabla 1. Clasificación de los grupos experimentales en corteza cerebral motora y sensitiva*

<b>Isquemia</b>	-		+	
<b>Glucosamina</b>	-	+	-	+
<b>Grupo</b>	F	E	B	D

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

Con el fin de obtener secciones homogéneas, se usó el vibrátomo leica 1000 B el cual permite obtener cortes de 50 micras en las muestras de cerebro de rata Wistar de los grupos experimentales ya seleccionados que han sido almacenadas previamente en solución anticongelante.

Según la guía de uso del vibrátomo en muestra de cerebro de rata, elaborada en el laboratorio de histología de la Universidad Icesi. Se procede a ubicar los cortes anterior, medio y posterior del cerebro en un placa metálica que será llevada y asegurada a un pozo con una solución de PBS (tejidos en suspensión), la cual va a proceder a ser cortada a lo largo por su mitad con una cuchilla menor ubicada en un porta cuchilla. Todos los cortes proceden a almacenarse en una solución anticongelante al 30% de sacarosa y 30% etilenglicol en PBS para los posteriores análisis de tinción.

### **Protocolo del lavado de muestra**

Los tejidos se lavaron 3 veces por diez minutos cada vez, en Buffer Fosfato Salino (PBS). Posteriormente se lavaron en PBS-Twin una vez durante 30 minutos con el fin de permeabilizar la membrana. Seguido nuevamente con PBS 3 veces por 5 minutos cada vez. La adhesión a antígenos inespecíficos será bloqueada con albumina en PBS, el cual se aplicará por 60 minutos. Después los tejidos se incuban con los anticuerpos primarios durante toda la noche a una temperatura de 4°C, los cuales estarán diluidos en PBS con Tritón al 0,5%.

Posteriormente, el tejido se lavaron con PBS, 3 veces por 5 minutos cada una. Las placas con el tejido se expusieron por 40 minutos con anticuerpo secundario. El tejido se laóo nuevamente 3 veces con PBS por 5 minutos.

Se montan en los cubreobjetos con la ayuda de un pincel. Se aplica una gota de glicerina para fijar el cubreobjetos previamente rotulado con el fin de eliminar burbujas de aire en el interior. Se debe tener mucho cuidado en el momento de poner el cubre objetos con el fin de que el tejido no se dañe y permanezca fijo.

Se aplica esmalte transparente alrededor del cubreobjetos para mantenerlo fijo y sea manipulado sin riesgo a dañar el tejido.

*Tabla 2. Anticuerpos primarios:*

Anticuerpo primario	Generado en	Concentración( $\mu$ L)	Dilución
AntiNeuN A60	Conejo	5	1:1000
Anti GfAPGA5	Ratón	5	1:1000

*Tabla 3. Anticuerpos secundarios*

Anticuerpo secundario	Reacciona con	Concentración ( $\mu$ L)	Dilución	Absorbancia (nm)	Emisión (nm)	Color
Alexafluor 488	Anti rabbit	5	1:1000	499	519	Verde
Alexafluor 555	Anti mouse	5	1:1000	553	568	rojo

Las imágenes de Fluorescencia fueron tomadas en un microscopio de fibra óptica bajo una longitud de onda de 519 nm para NeuN y 568 nm para GfAP, evaluando distribución y el número de neuronas con los objetivos 10X y 40X.

### **Tratamiento fotográfico**

Las evidencias fotográficas de las diferentes cortezas cerebrales fueron modificadas con la entrada de luz y el tiempo de exposición del microscopio con el fin de mejorar la resolución de estas. Posteriormente, las imágenes fueron tratadas mediante power point modificando el brillo y el contraste y desarrollando superposiciones.

Por último, para analizar los resultados obtenidos, se basó en anova y postanova los cuales permiten comparar entre todas las variables aquellas que presenten o

no variaciones significativas en el número de células teñidas con el marcador cual permite comparar la dispersión de los datos encontrados en los grupos experimentales de ratas. Para realizar este procedimiento se tiene en cuenta el conteo realizado desde power point para determinar el número de neuronas funcionales en la lámina supragranular e infragranular de la corteza motora y sensitiva. A pesar de haber manejado ImageJ para realizar los conteos, se prefirió hacer un conteo manual debido a complejidad del software generaba falsos positivos.

## Diseño experimental

Con los resultados obtenidos de la tinción inmunohistoquímica de fluorescencia de ratas Wistar con el marcador NeuN, se procedió a realizar una prueba ANOVA y una POST-ANOVA con Tukey con el fin de comparar las interacciones entre los diferentes grupos experimentales

Para poder realizar el ANOVA se deben cumplir dos supuestos:

1. Los datos presentan una distribución normal
2. Los datos presentan varianzas iguales

Se van a manejar tres tipos de hipótesis entre las interacciones entre las diferentes condiciones de los grupos experimentales para la región supragranular e infragranular de la corteza motora y sensitiva:

1.

**Hipótesis nula ( $H_0$ ):** el promedio en el número de neuronas no varía entre los grupos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina)

**Hipótesis alterna ( $H_a$ ):** el promedio en el número de neuronas si varía entre el grupos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina)

2.

**Hipótesis nula ( $H_0$ ):** el promedio en el número de neuronas no varía entre los grupos B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) y D (tejido isquémico con tratamiento de glucosamina)

**Hipótesis alterna ( $H_a$ ):** el promedio en el número de neuronas si varía entre los grupos B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) y D (tejido isquémico con tratamiento de glucosamina)

3.

**Hipótesis nula ( $H_0$ ):** el promedio en el número de neuronas no varía entre los controles F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina)

**Hipótesis alterna ( $H_a$ ):** el promedio en el número de neuronas si varía entre los controles F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina)

Las hipótesis nulas se plantean de acuerdo a los posibles efectos más representativos entre los grupos experimentales. No solo se espera ver si estadísticamente hay efecto en el tratamiento de la glucosamina, sino también poder observar si hay una disminución del número de neuronas después de un ictus isquémico lo cual por la literatura debería pasar. Cuando la hipótesis nula se rechaza, se acepta la hipótesis alterna y se corrobora que hay diferencia estadística entre los grupos experimentales. Para la ejecución de esta prueba se decide emplear un índice de confianza del 95%.

Estas hipótesis se pueden reescribir de la siguiente forma:

$$H_0: P \geq 0,05$$

$$H_a: P < 0,05$$

En donde P es la proporción de la población que cumple un criterio planteado.

## 2.5. Matriz de marco lógico

Tabla 4. Matriz de marco lógico.

<b>OBJETIVO GENERAL</b>			
Identificar si la glucosamina funciona como citoprotector en la corteza cerebral de ratas sometidas a isquemia cerebral focal, en el transcurso del año 2015.			
<b>Objetivo específico</b>	<b>Actividades</b>	<b>Indicador</b>	<b>supuestos</b>
Marcar las células neuronales de la corteza cerebral con NeuN	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaluación por parte del comité de ética animal la autorización del procedimiento experimental con ratas</li> <li>• Acondicionamiento de lugar de vivienda de las ratas (comida, agua, temperatura, luz)</li> <li>• Selección de las ratas de acuerdo al peso y la edad establecida</li> <li>• Adecuación de la sala de cirugía para el procedimiento quirúrgico de isquemia (personal, utensilios, anestesia)</li> <li>• Adecuación del sitio de vivienda para la recuperación de las ratas (comida, agua, temperatura, luz)</li> <li>• Equipos de monitorización para después de la cirugía</li> <li>• Tratamiento con glucosamina para los grupos designados</li> <li>• Mantenimiento de la</li> </ul>	Soma de las células neuronales marcadas con NEUN	<p>Se dispone la cantidad suficiente de ratas a las condiciones deseadas</p> <p>Disponibilidad de las instalaciones</p> <p>Disponibilidad de instrumentos y reactivos</p> <p>Disponibilidad del personal calificado</p> <p>Disponibilidad de la sala de cirugía</p>

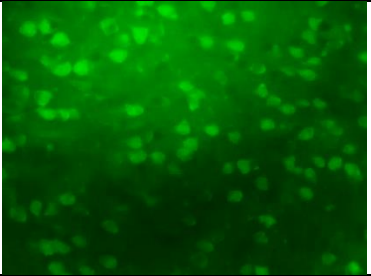
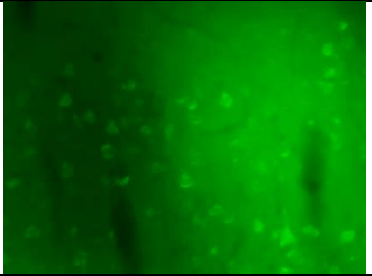
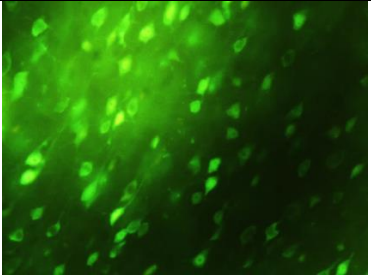
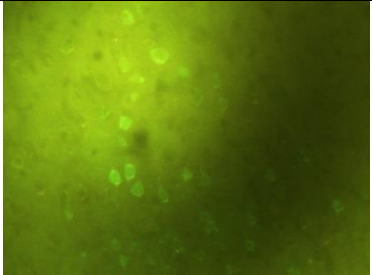
	<p>reperfusion para los grupos designados</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Adecuación de la sala de cirugía para la decapitación causando el menor sufrimiento (personal, utensilios, anestesia)</li> <li>• Realizar el procedimiento inmunohistoquímico con el marcador somático (NeuN)</li> </ul>		
<p>Identificar que región de la corteza cerebral es más propensa a cambios en su fisiología posterior a un ictus isquémico</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Decapitación de la rata</li> <li>✓ Selección de las regiones para el corte</li> <li>✓ Realización del corte</li> <li>✓ Poner los tejidos en portaobjetos y llevar al microscopio</li> <li>✓ Observar al microscopio los diferentes tejidos correspondiente a cada grupo de ratas que son parte del estudio</li> </ul>	<p>Diferenciar la región de procedencia del corte al visualizando con el microscopio</p> <p>Diferenciar las células neuronales marcadas con NeuN de cada tejido</p>	<p>diferencias entre las zonas de los tejidos de corteza cerebral</p> <p>Tejidos obtenidos a las 6 horas de isquemia</p>
<p>Reconocer el efecto de la glucosamina en los tejidos cerebrales como un factor en el mejoramiento de la morfología celular</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Realizar quirúrgicamente la isquemia</li> <li>✓ Dejar un nylon para reperfusion en los grupos correspondientes</li> <li>✓ Realizar tratamiento con glucosamina en los grupos de ratas designados</li> <li>✓ Realizar reperfusion en los grupos de ratas</li> </ul>	<p>Diferenciar las células neuronales marcadas con NEUN de cada tejido</p>	<p>Es posible evidenciar variaciones de las zonas por efecto de la glucosamina</p> <p>Tejidos obtenidos a las 6 horas de isquemia</p>

	designados ✓ Realizar la decapitación y congelamiento del cerebro		
--	---	--	--

## 2.6. Resultados

### Efecto de la isquemia generada por la cirugía experimental MCAO en el número de neuronas de la corteza cerebral

El efecto en la disminución del número de neuronas entre el grupo control sin tratamiento de glucosamina (grupo F) y el grupo con isquemia sin tratamiento de glucosamina (grupo B) al obstruir la arteria cerebral media de ratas adultas fue evidenciado con la prueba estadística post-anova de Tukey para la corteza sensitiva y motora.

	GRUPO CONTROL SIN ISQUEMIA Y SIN TRATAMIENTO DE GLUCOSAMINA (GRUPO F)	GRUPO CON ISQUEMIA SIN TRATAMIENTO DE GLUCOSAMINA (GRUPO B)
CORTEZA SENSITIVA		
CORTEZA MOTORA		

*Imagen 1 Imágenes representativas de la señal de NeuN en la región supragranular para la corteza sensitiva y motora los individuos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) respectivamente, bajo tinción Inmunohistoquímica de fluorescencia de ratas Wistar a las que se les ha inducido una isquemia por medio de la cirugía experimental MCAO (Middle cerebral artery occlusion). Las imágenes se obtienen bajo un microscopio de fluorescencia usando el objetivo de 40X.*

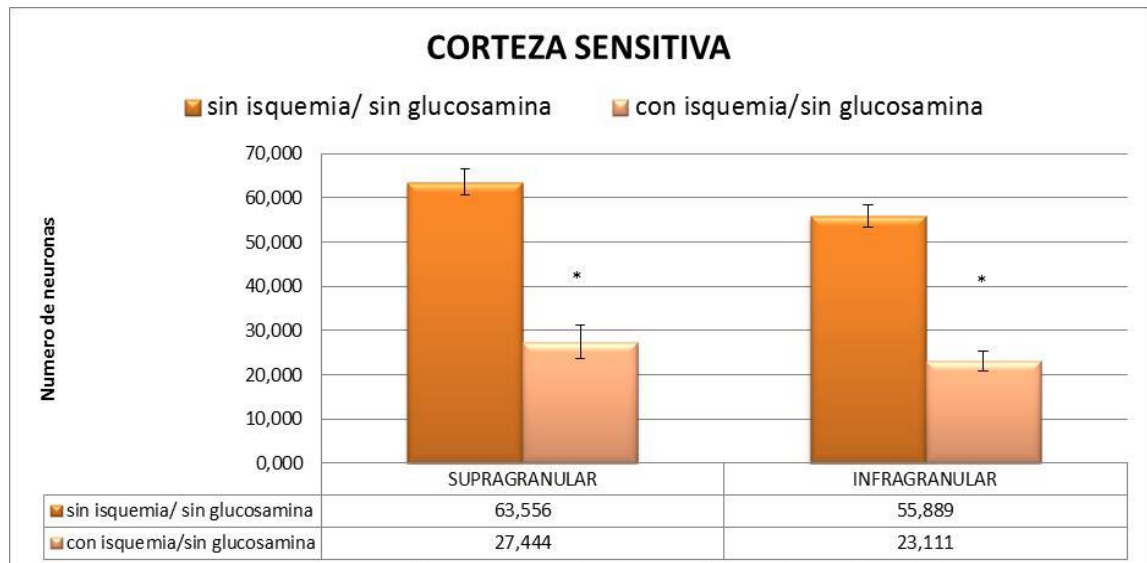


Figura 6. Número de neuronas detectados con el anticuerpo NeuN por medio de inmunohistoquímica de fluorescencia para la corteza cerebral sensitiva de ratas Wistar a las que se les ha inducido una isquemia por medio de la cirugía experimental MCAO (Middle cerebral artery occlusion). Comparación del F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) (media  $\pm$ EEM,  $n=9$ , \*  $p<0.05$  por la prueba post-anova de Tukey).

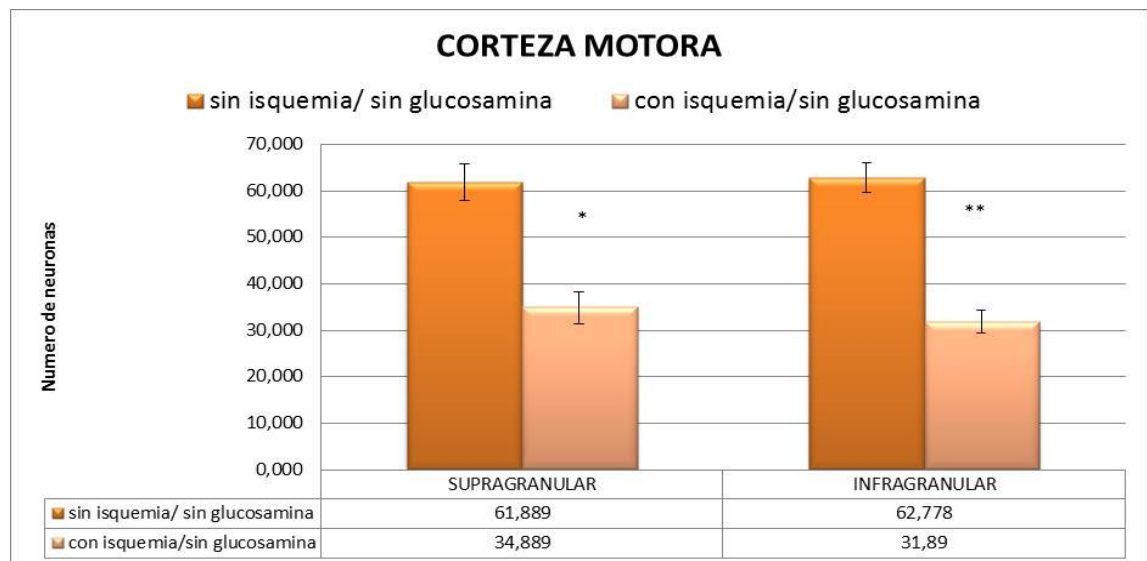


Figura 7. Número de neuronas detectados con el anticuerpo NeuN por medio de inmunohistoquímica de fluorescencia para la corteza cerebral motora de ratas Wistar a las que se les ha inducido una isquemia por medio de la cirugía

experimental MCAO (Middle cerebral artery occlusion). Comparación del grupo F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) (media  $\pm$ EEM, n=9, \*,  $p < 0.05$  por la prueba post-anova de Tukey, \*\*,  $p < 0.05$  por la prueba no paramétrica de kruskal wallis).

**Efecto del tratamiento de glucosamina en presencia de isquemia experimental en el número de neuronas de la corteza cerebral**

El efecto en la disminución del número de neuronas entre el grupo con isquemia sin tratamiento de glucosamina (grupo B) y el grupo con isquemia y con tratamiento de glucosamina (grupo D) al obstruir la arteria cerebral media de ratas adultas fue evidenciado con la prueba estadística post-anova de Tukey para la corteza sensitiva y motora.

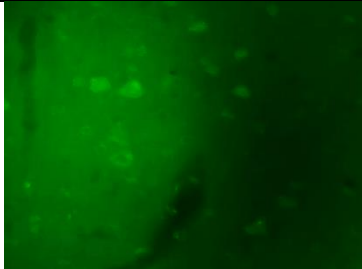
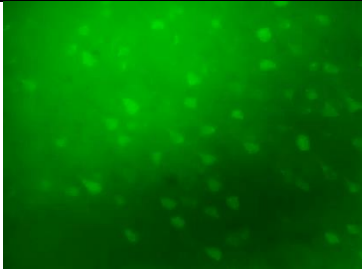
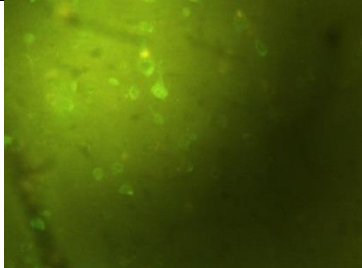
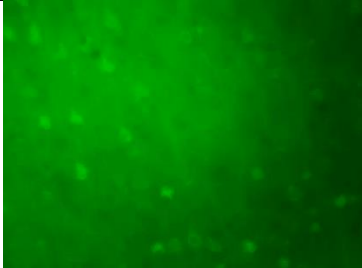
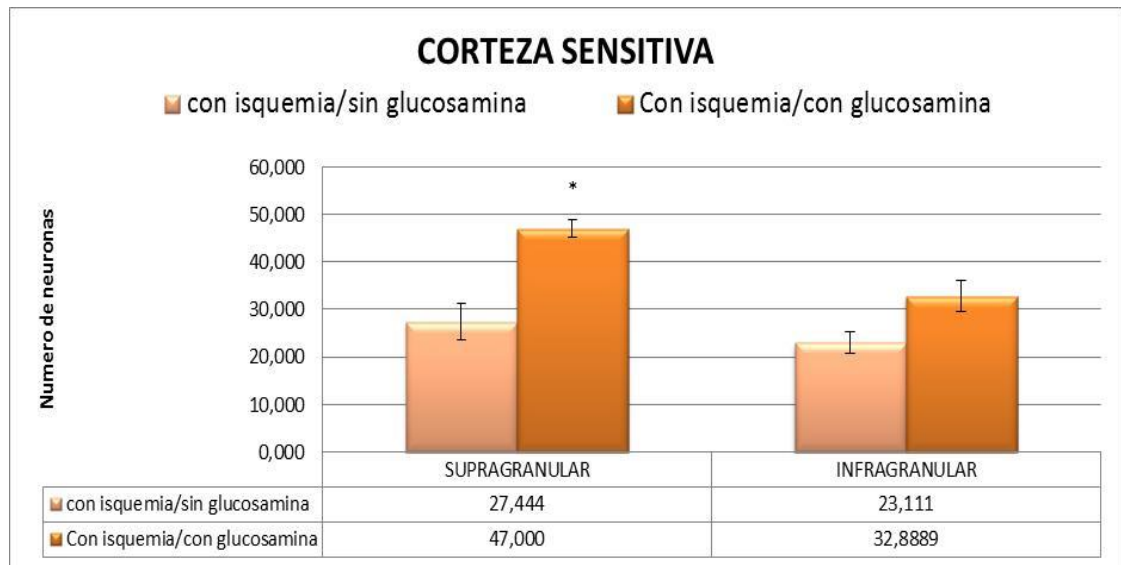
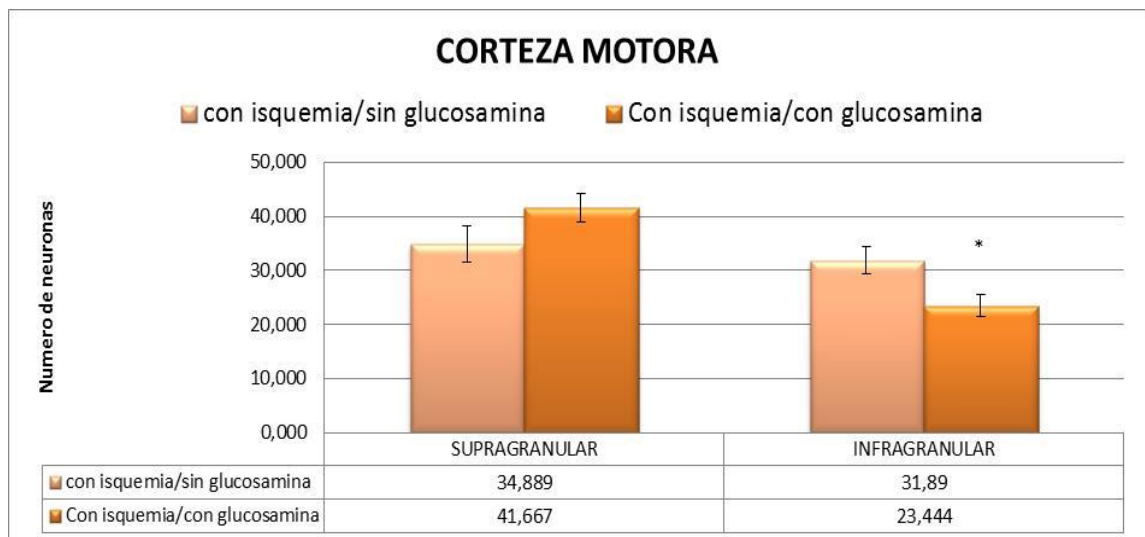
	GRUPO ISQUEMICO SIN TRATAMIENTO DE GLUCOSAMINA (GRUPO B)	GRUPO ISQUEMICO CON TRATAMIENTO DE GLUCOSAMINA (GRUPO D)
CORTEZA SENSITIVA		
CORTEZA MOTORA		

Imagen 2. Imágenes representativas de la señal de NeuN en la región supragranular de la corteza sensitiva y motora de los individuos B (tejido isquémico sin tratamiento con glucosamina) y D (tejido isquémico con tratamiento con glucosamina) respectivamente, de ratas Wistar a las que se les ha inducido una isquemia por medio de la cirugía experimental MCAO (Middle cerebral artery occlusion). Las imágenes se obtienen bajo un microscopio de fluorescencia usando el objetivo de 40X.



*Figura 8. Número de neuronas detectados con el anticuerpo NeuN por medio de inmunohistoquímica de fluorescencia por zonas de la corteza cerebral sensitiva de ratas Wistar a las que se les ha inducido una isquemia por medio de la cirugía experimental MCAO (Middle cerebral artery occlusion). Comparación del grupo sin tratamiento de glucosamina y con aplicación intraperitoneal de glucosamina media hora después de inducida la isquemia (media  $\pm$ EEM, n=9, \*,  $p < 0.05$  por la prueba post-anova de Tukey).*

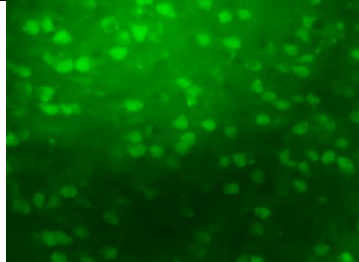
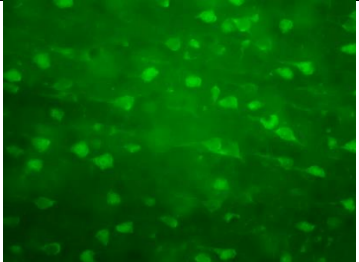
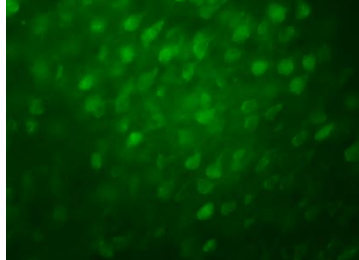
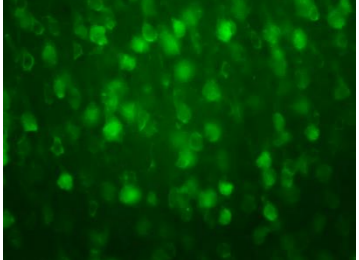


*Figura 9. Número de neuronas detectados con el anticuerpo NeuN por medio de inmunohistoquímica de fluorescencia por zonas de la corteza cerebral motora de ratas Wistar a las que se les ha inducido una isquemia por medio de la cirugía experimental MCAO (Middle cerebral artery occlusion). Comparación del grupo sin tratamiento de glucosamina y con aplicación intraperitoneal de glucosamina media*

hora después de inducida la isquemia (media  $\pm$ EEM, n=9, \*,  $p<0.05$  por la prueba no paramétrica kruskal wallis).

**Efecto del tratamiento de glucosamina en el número de neuronas de la corteza cerebral en los grupos control sin isquemia**

El efecto en la densidad neuronal en tejidos sanos entre el grupo sin isquemia sin tratamiento de glucosamina (grupo F) y el grupo sin isquemia y con tratamiento de glucosamina (grupo E) para la corteza sensitiva y motora.

	GRUPO NO ISQUEMICO SIN TRATAMIENTO DE GLUCOSAMINA (GRUPO F)	GRUPO NO ISQUEMICO CON TRATAMIENTO DE GLUCOSAMINA (GRUPO E)
CORTEZA SENSITIVA		
CORTEZA MOTORA		

*Imagen 3. Imágenes representativas de la señal de NeuN en la región supragranular de la corteza sensitiva y motora de los individuos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina) respectivamente, de ratas Wistar a las que se les ha inducido una isquemia por medio de la cirugía experimental MCAO (Middle cerebral artery occlusion). Las imágenes se obtienen bajo un microscopio de fluorescencia usando el objetivo de 40X.*

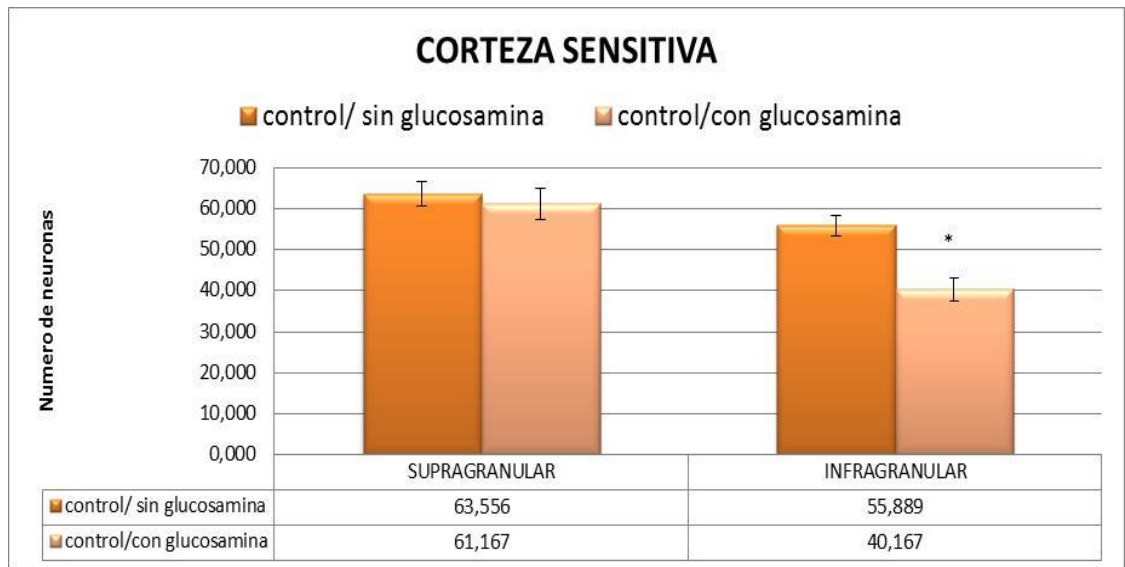


Figura 10. Número de neuronas detectados con el anticuerpo NeuN por medio de inmunohistoquímica de fluorescencia para la corteza cerebral sensitiva de ratas Wistar a las que se les ha inducido una isquemia por medio de la cirugía experimental MCAO (Middle cerebral artery occlusion). Comparación de los grupo sin inducción de isquemia sin tratamiento con glucosamina (grupo F) y a la que se le ha aplicado por vía intraperitoneal glucosamina (grupo E), respectivamente (media  $\pm$ EEM,  $n=9$ , \*,  $p<0.05$  por la prueba post-anova de Tukey).

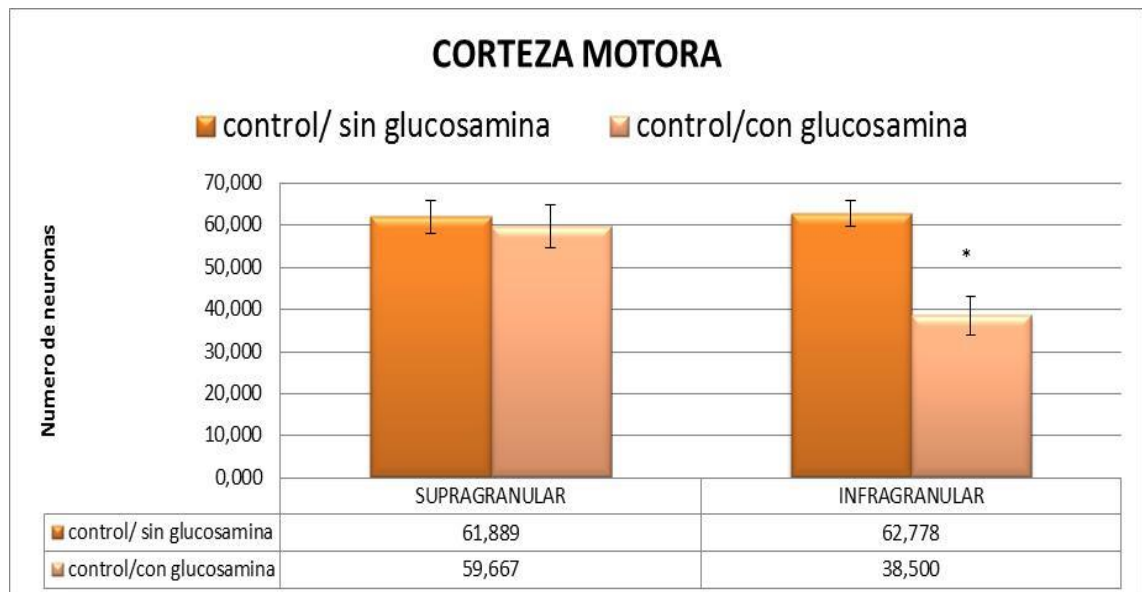


Figura 11. Número de neuronas detectados con el anticuerpo NeuN por medio de inmunohistoquímica de fluorescencia para la corteza cerebral motora de ratas Wistar a las que se les ha inducido una isquemia por medio de la cirugía

*experimental MCAO (Middle cerebral artery occlusion). Comparación de los grupo sin inducción de isquemia sin tratamiento con glucosamina (grupo F) y a la que se le ha aplicado por vía intraperitoneal glucosamina (grupo E), respectivamente (media  $\pm$ EEM, n=9, \*,  $p < 0.05$  por la prueba no paramétrica kruskal wallis).*

## **2.7. Discusión**

Durante el estudio de las fotografías tomadas en el microscopio de fluorescencia se aprecia una variación significativa en la población de células observadas. Según la literatura analizada el antígeno nuclear neuronal (NeuN) es una proteína específica de neuronas maduras que marca el citoplasma, el núcleo así como la zona basal de las dendritas. En las tinciones se observa con este tipo de marcación la morfología celular de los diferentes tipos de neuronas que se encuentran en la corteza cerebral, aunque también es inmunoreactivo para las células de Purkinje, neuronas del núcleo dentado en el cerebelo y neuronas del bulbo raquídeo (Lavezzi, Corna, & Matturri, 2013). Esta técnica marcó muchas células de las diferentes capas de la corteza cerebral, razón por la cual fue muy difícil identificar individualmente las diferentes láminas de la corteza cerebral. Sin embargo, sí se pudo distinguir la capa granular, que se caracteriza por tener una alta densidad de células más pequeñas. Se procedió a caracterizar los cortes en una región supragranular (constituida por las láminas I, II, III y IV) y una región infragranular (constituida por las láminas V y VII).

Se adaptó al microscopio de fluorescencia una cámara especializada con el fin de visualizar las imágenes en el computador. Obteniendo las tablas de resultados entre la comparación de los grupos experimentales

Al observar las características de la tinción con el anticuerpo antiNeuN, se observa que las neuronas presentan en general una mayor intensidad en el núcleo, esto se debe a que la proteína NeuN se encuentra en mayor cantidad en este sitio, generando una tinción más intensa en contraste con el citoplasma. Una característica del tejido que ha sufrido isquemia es la disminución de la cantidad de células marcadas con NeuN, junto con la disminución de la intensidad en el núcleo; ya que cuando una célula es dañada el NeuN nuclear se fragmenta y/o disminuye, manteniendo estable sólo el nivel en el citoplasma, por lo que la tinción no va a revelar mayor intensidad en el núcleo (Robertson, Puskar, Hoffman, Murphy, Saraswati, & Fiskum, 2006). Durante el conteo realizado en este proyecto en los grupos de control F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina) se observa claramente el núcleo de la mayoría de las células marcadas con NeuN (imagen 1 panel izquierda, imagen 3) en comparación al grupo experimental B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina). En los grupos experimentales isquémicos se observó principalmente células en donde no se alcanza a diferenciar el núcleo del

citoplasma (imagen 1 panel derecho, imagen 2 panel izquierdo), dejando en evidencia las consecuencias de la lesión.

Según la región anatómica del cerebro de la rata, los cortes se realizaron en el plano frontal observando en cortes longitudinales constituidos por ambos hemisferios. Este corte permite observar ambas cortezas, la corteza motora se encuentra en la región superior del lóbulo frontal y la corteza sensitiva en la región lateral. La isquemia se realizó con una obstrucción de la arteria cerebral media que irriga el hemisferio derecho.

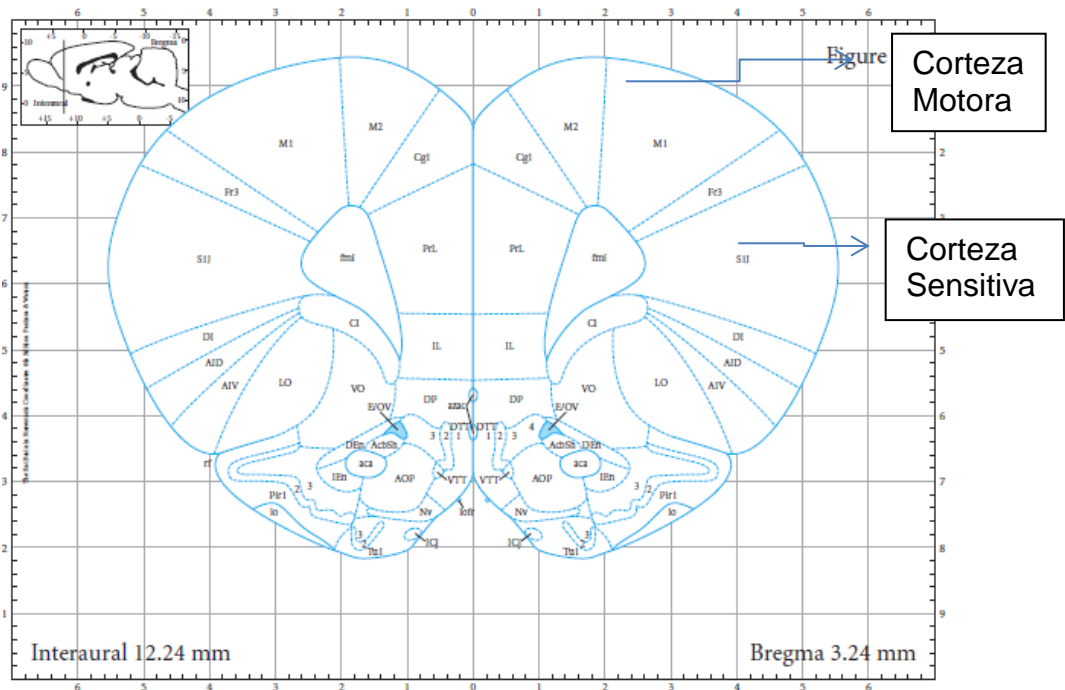


Figura 12. Corte coronal de la región frontal a 3,24mm del bregma (Paxinos & Watson, 2007)

A partir del promedio en el número de neuronas registradas durante el conteo se observa una disminución en el número de células de los sujetos a los cuales se les indujo la isquemia al obstruir la arteria cerebral media derecha (imagen 1 y 2, figura 6 y 7). El sistema de irrigación cerebral también conocido como círculo arterial cerebral está conformado por las arterias anterior y media. La arteria cerebral media entra en el surco lateral para irrigar las estructuras subcorticales, lóbulo frontal, parietal y occipital y las circunvoluciones superior y media. (Pérez P., 2001)

Estadísticamente se aplicó una prueba de ANOVA, cumpliéndose los dos supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza requeridos para realizar este tipo de prueba paramétrica para la región supragranular e infragranular de la corteza sensitiva y la región supragranular de la corteza motora. Para la región infragranular de la corteza motora, al cumplir sólo uno de los supuestos (figura 27, ver anexos 3.2) fue necesario aplicar una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis a partir del programa estadístico MINITAB.

### **Efecto de la isquemia generada por la cirugía experimental MCAO en el número de neuronas de la corteza cerebral**

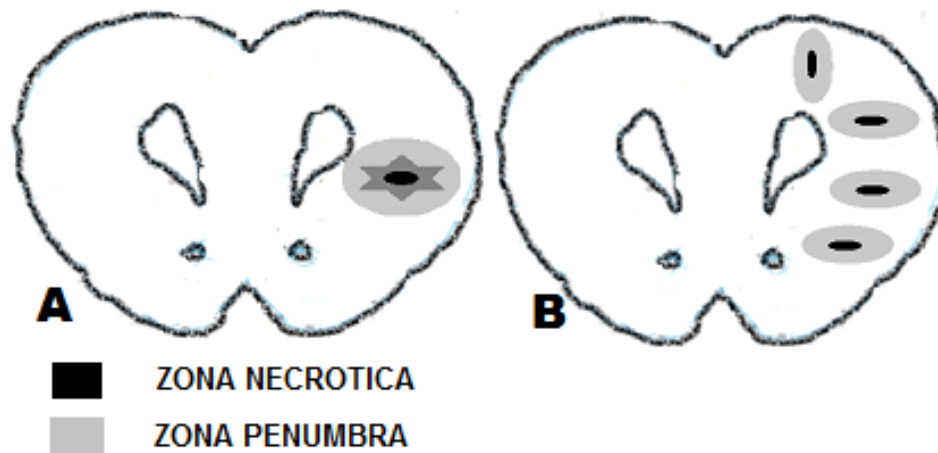
Al graficar los resultados de los promedios con sus respectivas barras de error de la región supragranular e infragranular de la corteza sensitiva y motora, se observa una disminución en el número de neuronas del grupo B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) a diferencia del grupo control F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) marcadas con el anticuerpo NeuN (figura 6 y 7). Al aplicar la prueba de post-anova de tukey y la prueba no paramétrica de kruskal-wallis se obtiene que la comparación entre ambos grupos de la corteza sensitiva y motora son estadísticamente diferentes, por lo que en un tiempo de 6 horas el daño celular debido a inducción de la isquemia por la obstrucción de la arteria cerebral media es tal que se genera una muerte celular considerable. La gráfica de los efectos principales (figura 21 y 25, ver anexos 3.2) evidencia al igual que la gráfica de barras evidencia este comportamiento.

A pesar de que la inducción de la isquemia se generó en la arteria cerebral media que irriga principalmente la corteza sensitiva, los mecanismos isquémicos no se van a generar específicamente alrededor del foco de la isquemia sino que se va a expandir a otras regiones del cerebro debido a las conexiones vasculares que irrigan el cerebro. Accidentes de tránsito, enfermedades cardíacas, trombosis, diabetes así como el consumo de alcohol, el tabaco y el sedentarismo pueden generar también la obstrucción de las arterias que irrigan el cerebro, que como consecuencia disminuyen la cantidad de oxígeno y alteran la homeostasis celular generada por la isquemia cerebral focal.

## **Efecto del tratamiento de glucosamina en presencia de isquemia experimental en el número de neuronas de la corteza cerebral**

La prueba de ANOVA aplicada determina que hay diferencias entre los grupos experimentales con isquemia y con tratamiento de glucosamina. Al realizar la prueba post anova de tukey con un nivel de confianza del 95% en la corteza sensitiva, se obtiene que si hay un efecto de la glucosamina en la supervivencia celular (imagen 2 y figura 8) al estrés isquémico en comparación a los grupos que no recibieron tratamiento sólo para la región supragranular y no para la región infragranular entre los grupos B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) y D (tejido isquémico con tratamiento de glucosamina). En la literatura se puede evidenciar que la región supragranular conformada por las láminas I, II, III y IV tiene una capacidad de generar conexiones sinápticas que permiten a la corteza adaptarse a cambios en el ambiente además de mejorar la plasticidad en otras capas (Huang, Armstrong-James, Rema, Diamond, & Ebner, 1998). Observando el número de neuronas con el tratamiento de glucosamina (figura 8), se da claramente que el número de neuronas aumenta para la región infragranular, posiblemente con influencia del aumento de conexiones generadas por la región supragranular, sin embargo no se da un aumento considerable para que el tratamiento de glucosamina sea significativo estadísticamente en la región infragranular para rechazar la hipótesis nula.

Es común que se represente la formación de la isquemia como un proceso homogéneo (figura 13) caracterizado por la concentración de la zona isquémica en una sola región en el cerebro y por una zona de penumbra que bordea toda la región necrótica. A partir de los resultados obtenidos por el Laboratorio de Fisiología Celular Animal de la Universidad Icesi, se ha observado que la generación de la isquemia en el modelo MCAO no está caracterizada por darse de manera homogénea, en cambio se origina como un crecimiento de parches de zonas necróticas rodeada por su respectiva penumbra, lo que hace más difícil diferenciar las partes características de la isquemia. Es importante resaltar que el registro fotográfico tomado bajo el objetivo de 40X se realizó en las mismas zonas de la corteza sensitiva y motora tal como se muestra en la figura 12, esto con el fin de disminuir los errores experimentales en el conteo celular por parte del investigador y mantener una consistencia en las zonas de muestreo entre los diferentes cortes. Debido a esto último, junto con el número y la distribución de parches pueden no presentarse en el mismo sitio para todos los tejidos, pudo haber una repercusión en los resultados obtenidos en la supervivencia celular de la región infragranular del grupo D, tomando las fotografías en la zona necrótica y no en la zona de penumbra con el fin de evaluar el efecto de la glucosamina en la corteza sensitiva.



*Figura 13. Descripción de la generación de la isquemia en el cerebro. A la izquierda (A) Generación del infarto con una sola zona necrótica. A la derecha (B) Generación del infarto con varias zonas necróticas que genera una apariencia de parches de la isquemia distribuida en la zona del cerebro que se queda sin irrigación.*

La proteína GAP-43 ha sido asociada al crecimiento de los conos de los axones durante la axonogénesis y la regeneración. Se ha encontrado a partir de ensayos que esta proteína se encuentran en proporciones mayores en la corteza cerebral, el tabique y el hipocampo. Durante una lesión electrolítica como mecanismo de la isquemia se puede dar una sobre-expresión de GAP-43 inducida por las neuronas en el cerebro adulto principalmente en la región supragranular. Esta fosfoproteína es sustrato de la proteinquinasa C (PKC) y se expresa principalmente durante el crecimiento en sinapsis inmaduras del feto y después del nacimiento, aunque se ha visto que no desaparece del todo en la etapa adulta manteniendo unos niveles basales. La fosforilación de GAP-43 por la PKC modula el metabolismo de fosfatidilinositol, la generación de norepinefrina y la liberación de neurotransmisores, además de ser un factor de plasticidad celular intrínseca en las terminaciones presinápticas moduladas por PKC. (Naffah-Mazzacoratti, Funke, Sanabria, & Cavalheiro, 1999). La glucosamina favorece la activación translocación de las diferentes isoformas de PKC generando la aceleración de la degradación de proteínas por la PKC- $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , and  $\zeta$  con la regulación de los niveles de fosfatasa PP1- $\beta$  and PP1- $\gamma$  y la actividad antiapoptótica por la acción de PKC- $\alpha$  y PKC- $\epsilon$  con la fosforilación de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y / o la fosforilación de la Raf-1 y la inactivación de la proteína pro-apoptótica BAD y Bax (Matthews, 2006) que se generan durante la isquemia, además de aumentar la afinidad con el sustrato GAP-43 para acelerar los procesos de axonogénesis en las células maduras de la región supragranular.

Con los resultados estadísticos obtenidos con la prueba de Tukey para la región supragranular y la prueba de Kruskal-Wallis para la región infragranular en la corteza motora, el efecto de la glucosamina no es significativo estadísticamente ya que se acepta la hipótesis nula de que las medias de los grupos B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) y D (tejido isquémico con tratamiento de glucosamina) son iguales. A partir de la figura 9 se observa un aumento en la densidad de neuronas marcadas con NeuN en la región supragranular, pero las barras de error son muy similares entre sí, debido a que los promedios son muy similares lo que finalmente se manifiesta en la prueba de tukey y en las gráficas de los efectos principales y de interacciones (figura 21 y 22, ver anexos 3.2). En cuanto a la región infragranular, estadísticamente se presentan diferencias entre los grupos B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) y D (tejido isquémico con tratamiento de glucosamina), como resultado del tratamiento de glucosamina, hay una disminución en el número de neuronas de los sujetos experimentales del grupo D.

Se esperaría que en la corteza motora el efecto de la glucosamina fuera notorio con el aumento en el número de neuronas marcadas con el anticuerpo NeuN así como se presenta en la región supragranular de la corteza sensitiva. Esto se debe al sitio en donde se produjo la generación de la isquemia de los cortes obtenidos con la obstrucción de la arteria cerebral media ya que está ubicada lateralmente e irriga la región sensitiva analizada (Pop, Manisor, Beaujeux, Marescaux, Wolff, & Simu, 2014). Posiblemente la glucosamina tiene un mayor efecto en el área de penumbra más cercana al centro de la isquemia. Sin embargo la isquemia cerebral no sólo se da en la región sensitiva ya que los procesos de apoptosis, regulación, etc., se dan en toda el hemisferio derecho como se evidencia en la disminución significativa en el número de neuronas de la corteza sensitiva y motora del grupo experimental B (grupo isquémico sin tratamiento de glucosamina) (Imagen 1 y 2).

Se ha encontrado a partir de estudios con cloruro de trifeniltetrazolio TTC, que el tratamiento de glucosamina aplicado 3 horas después de la reperusión de la isquemia en cerebros de rata, aumenta los niveles de O-GlcNAc generando una mejoría en la supervivencia celular al regular los niveles de OGT, la actividad enzimática de O-GlcNAcase, etc (Hwang, y otros, 2010). En los estudios experimentales realizados por el Laboratorio de Fisiología Celular Animal de la Universidad Icesi se observa este mismo comportamiento en el aumento de la supervivencia celular y por lo tanto en una disminución del tamaño del infarto con el tratamiento de glucosamina (figura 29, ver anexo 3.3) por lo que es evidente que la glucosamina es segura y no tiene la capacidad de inducir o promover la muerte celular en estos tejidos por lo que los resultados estadísticos obtenidos para la región infragranular con el tratamiento de glucosamina es incoherente. Se ha visto que la baja toxicidad de la glucosamina ha hecho que sea usada comúnmente para el tratamiento de enfermedades inflamatorias como la artrosis.

En el cerebro ocurre un proceso de renovación celular conocido como neurogénesis, el cual está caracterizado por la capacidad del cerebro vertebrado adulto en generar nuevas células de forma periódica. Este fenómeno se debe a la acción de la multipotencialidad y de autorrenovación de las células madres de la zona subventricular y del hipocampo para convertirse en células gliales y neuronales (Arce, Catalina, & Mallo, 2006) en respuesta a cambios en el ambiente, stress, hormonales etc.

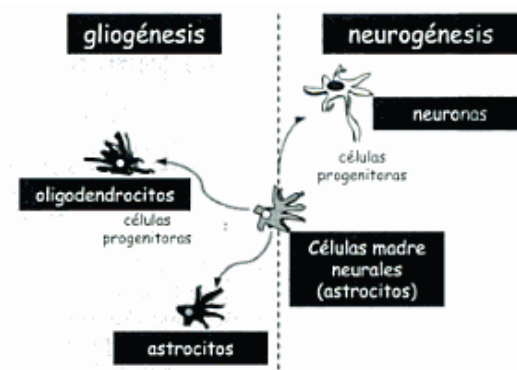


Figura 14. Fenómeno de neurogénesis por la acción de las células madre. (Arce, Catalina, & Mallo, 2006)

Esta nueva plasticidad se encontró en la década del 60 y dio un giro al dogma de la ciencia en que se creía que los cerebros adultos no tenían la capacidad de generar nuevas neuronas. Bajo esta teoría la glucosamina puede mejorar este nuevo tipo de plasticidad celular (acción de células madre) más no disminuir la supervivencia celular.

Otra posible razón que explica el comportamiento de la región infragranular de la corteza motora con el tratamiento de glucosamina del grupo D, se debe a la diferencia en la densidad neuronal con la región supragranular. Según estudios de fluorescencia con NeuN la región supragranular está caracterizada por células muy pequeñas principalmente en la lámina 4 y 3 representando el mayor número de neuronas del neocortex, en cambio la región infragranular presenta un menor volumen de las grandes células piramidales principalmente en la lámina 5 (Meyer, Wimmer, Oberlaender, Kock, Sakmann, & Helmstaedter, 2010). Durante la realización de las fotografías bajo el microscopio con el objetivo de 40X de la región supragranular, se concentró en obtener los resultados en la lámina 5, afectando así que los resultados estadísticos con el tratamiento con glucosamina fuera menor para la región infragranular.

Además el daño cerebral producido por la isquemia es un proceso que no se genera de manera homogénea alrededor de la zona de penumbra, ya que irrigación sanguínea comunica regiones que pueden estar alejadas de la zona obstruida (figura 12) (Kempinski, Plesnila, Staub, & Baethmann, 1996). Debido a lo anterior y junto a la técnica aplicada que generó mucha interferencia en la tinción

bajo el objetivo de 40X, fue muy difícil para el investigador hacer el conteo con el microscopio de fluorescencia específicamente en la zona de penumbra de la isquemia.

### **Efecto del tratamiento de glucosamina en el número de neuronas de la corteza cerebral en los grupos control sin isquemia**

Según los resultados obtenidos con la prueba post-anova de Tukey, no hay diferencias significativas entre los grupos experimentales de la región supragranular F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina) tanto de la corteza motora como la sensitiva (imagen 3, figura 10 y 11). Al observar los resultados de las gráficas de interacciones de los controles (figura 18 y 26, ver anexo 3.2) se observa que el cambio en el número de neuronas es muy pequeño, por lo que el tratamiento de glucosamina no va a aumentar el número de neuronas en un tejido sano.

En cambio para la región infragranular de la corteza sensitiva y motora (figura 10 y 11) si se observa estadísticamente que la glucosamina disminuye el número de neuronas, lo cual es un resultado sorprendente. Se esperaría el mismo comportamiento que en la región supragranular, es decir, aceptar la hipótesis nula en que las medias del número de neuronas de los grupos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina) son iguales.

En cuanto a los resultados estadísticos obtenidos con la prueba de Tukey y de Kruskal-wallis, en el cual la glucosamina disminuye el número de células entre los sujetos experimentales, no se han evidenciado estudios en donde el tratamiento con esta sustancia tenga efectos nocivos en las células neuronales a las concentraciones manejadas durante los ensayos, y por otro lado los resultados con TTC muestran todo lo contrario al mantener la supervivencia de las células de los grupos que han sufrido isquemia con el tratamiento de glucosamina (Hwang, y otros, 2010). Al comparar los resultados fotográficos entre el grupo F, se observa bajo el objetivo de 10X la misma densidad neuronal que el grupo E, por lo que no se presentan daños morfológicos por los cambios en la tinción del núcleo con el anticuerpo NeuN o por la generación de parches (imagen 15, ver anexos 3.1) al aplicar el tratamiento con glucosamina. La reducción en el número de neuronas comportamiento esta fuera de lo esperado ya que la glucosamina no genera daño en el tejido y es un tratamiento seguro (imagen 29, ver anexo 3,3,). Este comportamiento se puede explicar con la variación neuronal que hay entre individuos, la cual no va a ser la misma en entre los sujetos y en los hemisferios cerebrales (Ramírez, 2014).

Uno de los inconvenientes presentados con esta tinción de fluorescencia, fue la presencia de mucho ruido o background, lo que imposibilitó la distinción de la señal de NeuN. Esto generó que el número de fotos (n) para el grupo E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina) no fuera el mismo que los demás grupos. Por lo que como recomendación se debería hacer otras tinciones de otros cortes que permitan completar el material fotográfico faltante, con el fin de que la comparación estadística fuera más significativa.

Cabe decir también que el hecho de que la cantidad de neuronas varíe entre la región supragranular de la infragranular, también puede estar relacionado con la observación de una disminución en el número de células para el grupo control E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina) tal como se explicó para la región infragranular de la corteza motora. Para este grupo también se tomaron las fotografías en la lámina 5, caracterizada por poseer principalmente células grandes y en menor cantidad que las observadas en la región supragranular bajo el objetivo de 10X (imagen 29, ver anexo 3.3.). Esto puede generar que la foto a 40X haya quedado al azar en una zona con menor número de células dentro de la lámina 5.

A partir de los resultados estadísticos para el análisis de la corteza sensitiva, se observa un efecto con el tratamiento de glucosamina en la región próxima a la isquemia causada por la obstrucción de la arteria cerebral media. La técnica de la tinción de fluorescencia permite observar la morfología de las neuronas que caracterizan la corteza cerebral, permitiendo ver un cambio en la densidad celular a partir de la evidencia fotográfica.

A pesar de que la región infragranular es más susceptible a cambios morfológicos, señalización, perfusión, etc. relacionados con la isquemia y que la región supragranular tiene mejor plasticidad, se debe entender que el cerebro es una red muy compleja en la cual todas las células están conectadas entre sí, por lo que un cambio en una parte del cerebro, va a generar un efecto en otros sitios.

## 2.8. Conclusiones:

- ✓ La tinción de fluorescencia permite marcar el soma, dendritas y el núcleo de las neuronas con el anticuerpo NeuN, lo que permite observar cambios en la morfología celular en los tejidos con isquemia que no recibieron tratamiento de glucosamina, ya que en estos no era posible diferenciar el núcleo del soma de la neurona.
- ✓ A partir de la literatura y los resultados obtenidos de la corteza sensitiva y motora, la región de la corteza cerebral que es más susceptible a cambios homeostáticos es la región infragranular.
- ✓ Se observa un efecto citoprotector en la plasticidad neuronal a partir del tratamiento de glucosamina para la región supragranular de la corteza sensitiva en las ratas sometidas a la obstrucción de MCAO para la generación de la isquemia. En el grupo D (tejido isquémico con tratamiento de glucosamina) hay mayor intensidad de la señal de NeuN en el núcleo que en el citoplasma, por lo que la glucosamina tiene un efecto en mantener o mejorar la morfología celular.

## 2.9. Recomendaciones:

- Debido a que se manejó un stock de anticuerpos de NeuN que estaban en el Laboratorio de Fisiología Celular Animal desde hace más de un año, se recomienda para los próximos estudios Estandarizar el protocolo de experimentación con el fin de mejorar la proporción señal/ruido por la tinción inespecífica que tiene la técnica fluorescencia.
- Comparar los resultados con otras técnicas como microscopia con focal
- Para el grupo experimental E (grupo no isquémico con tratamiento de glucosamina) no se pudo contar con  $n=9$ , debido al background que genera la tinción, afectando los resultados con la comparación del grupo F (grupo no isquémico sin tratamiento de glucosamina). Se recomienda para próximos estudios aumentar el número de fotos de la región infragranular que tiene una densidad celular más baja.

## 2.9. Bibliografía

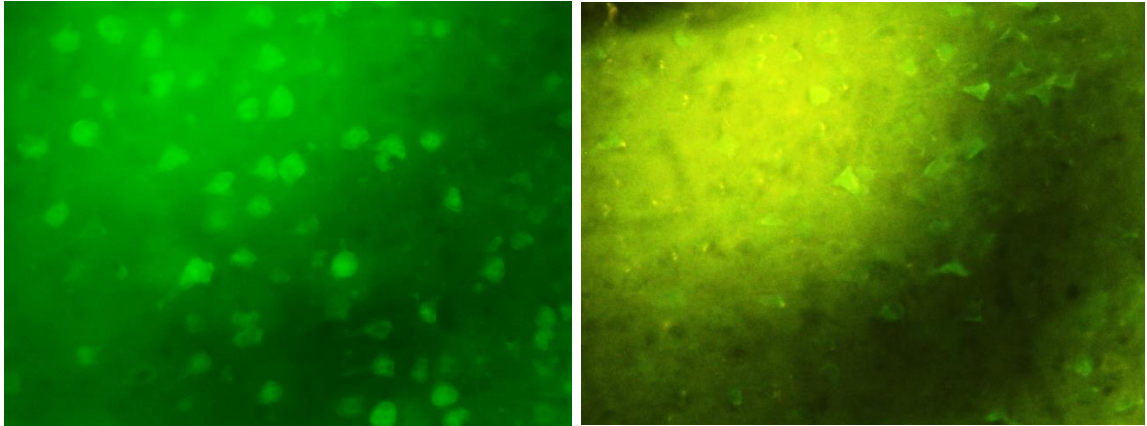
- Huang, W., Armstrong-James, M., Rema, V., Diamond, M., & Ebner, F. (1998). Contribution of Supragranular Layers to Sensory Processing and Plasticity in Adult Rat Barrel Cortex. *Journal Neurophysiology*, 80, 3261-3271.
- Lavezzi, A., Corna, M., & Matturri, L. (2013). Neuronal nuclear antigen (NeuN): A useful marker of neuronal immaturity in sudden unexplained perinatal death. *Journal of the Neurological Sciences*, 329, 45-50.
- Lazarus, B., Love, D. C., & Hanover, J. A. (2009). O-GlcNAc cycling: Implications for neurodegenerative disorders. *The International Journal of Biochemistry* 41, 2134–2146.
- Silverthorn, D. U. (2008). *Fisiología Humana. Un enfoque integrado* (4 ed.). madrid : Panamericana.
- Antranik. (2011, 11 19). *antranik.org*. Retrieved 11 11, 2014, from <http://antranik.org/functional-areas-of-the-cerebral-cortex/>
- Arango Davila, C., Escobar Betancourt, M., Cardona Gomez , G., & Pimienta Jimenez , H. (2004). Fisiopatología de la isquemia cerebral focal: aspectos básicos y proyección a la clínica. *Revista Neurológica No.39*, 156-165.
- Arce, V., Catalina, P., & Mallo, F. (2006). *Endocrinología*. Coruña, España: Universidad Santiago de Compostela.
- Becerra, L. V., & Pimienta, H. J. (2009). Apoptosis neuronal: la diversidad de señales y de tipos celulares Vol 40 No.1. *colombia médica*.
- BELZITIMTSAC, C. A. (2007). Precondicionamiento isquémico. *Revista Argentina de Cardiología*, 75(5), 341-342.
- Champattanachai, V., Marchase, R. B., & Chatham, J. (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.
- Defelipe, J., Mankram, H., & Wasensberg, J. (2007). *Paisajes Neuronales*. Madrid: CSIC.
- Dredge, B. K. (2011). NeuN/Rbfox3 Nuclear and Cytoplasmic Isoforms Differentially Regulate Alternative Splicing and Nonsense-Mediated Decay of Rbfox2. *Plos ONE*, 6(6), 1-12.

- Escobar, M., & Pimienta, H. (2008). *SISTEMA NERVIOSO*. Cali: Universidad del Valle.
- Flurhr, J. (2011). *Practical Aspects of Cosmetic Testing*. Berlin: Springer.
- Gal Iglesias, B., Lopez, M., Marin, A. I., & Prieto, J. (2007). *Bases de la fisiología* (2da ed.). España: Tebar.
- Hwang, S., Shin, J., Hwang, J., Song-Yi, K., Eok-Soo, O., Seikwan, O., et al. (2010). Glucosamine exerts a neuroprotective effect via suppression of inflammation in rat brain ischemia/reperfusion injury. *Glia*, 58(15), 1881-92.
- Kempski, O., Plesnila, N., Staub, F., & Baethmann, A. (1996). *Mechanisms of Secondary Brain Damage in Cerebral Ischemia and Trauma*. Nueva Deli: Springer Science & Business Media.
- Khadijeh, J., Hamid, R. S., & Ghazaleh, M. (September 2013). Glucosamine alleviates scopolamine induced spatial learning and memory deficits in rats. *Pathophysiology Volume 20, Issue 4*, 263–267.
- Matthews, J. (2006). Investigation of the effects of increased levels of OGIcNAC protein modification on protein kinase C. *Graduate Theses and Dissertations*. University of South Florida.
- McLarty, J. L. (2013). Post-translational protein modification by O-linked N-acetylglucosamine: Its role in mediating the adverse effects of diabetes on the heart. *Life Sciences*, 92(11), 621-627.
- Meyer, H., Wimmer, V., Oberlaender, M., Kock, C., Sakmann, B., & Helmstaedter, M. (2010). Number and Laminar Distribution of Neurons in a Thalamocortical Projection Column of Rat Vibrissal Cortex. *Cercor*, 20, 2277-2286.
- Montaner, J. (2007). *Fisiopatología de la isquemia cerebral*. Barcelona: MARCE MEDICAL BOOKS.
- Naffah-Mazzacoratti, M., Funke, M., Sanabria, E., & Cavalheiro, E. (1999). Growth-associated phosphoprotein expression is increased in the supragranular regions of the dentate gyrus following pilocarpine-induced seizures in rats. *Neurociencia*, 91(2), 485-492.
- Papez, J. W. (n.d.). [sites.google.com/site/cerebrohumanoycalculoracional](https://sites.google.com/site/cerebrohumanoycalculoracional). Retrieved 11 11, 2014, from <https://sites.google.com/site/cerebrohumanoycalculoracional/el-cerebro-humano/estructura-cerebral/neocorteza/corteza-cerebral-y-areas-funcionales>

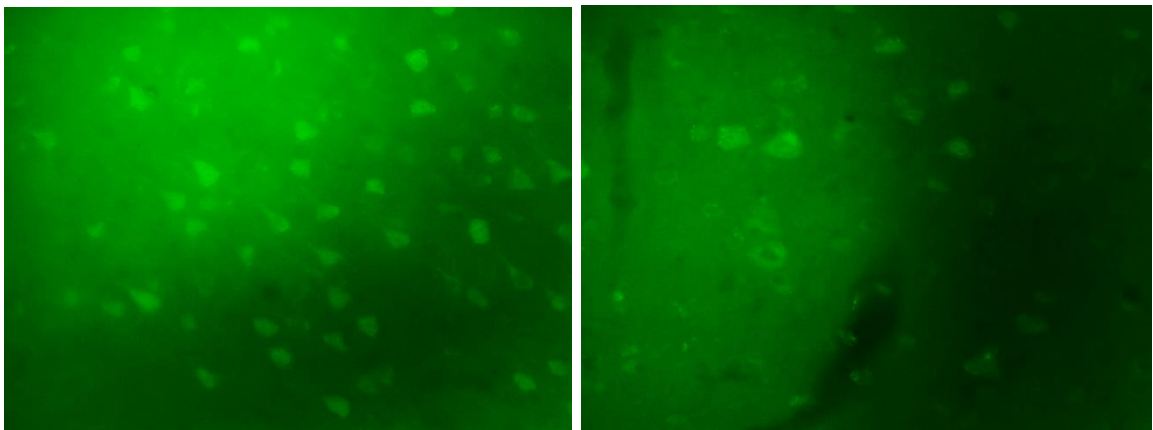
- Paxinos, J., & Watson, C. (2007). *THE RAT BRAIN. In stereotaxic coordinates* (sexta edición ed.). Amsterdam: Elsevier.
- Pérez P., V. (2001). *Atlas del sistema arterial con variantes anatómicas*. México: Noriega Editores.
- Pop, R., Manisor, M., Beaujeux, R., Marescaux, C., Wolff, V., & Simu, M. (2014). REGIONAL ANGIOGRAPHIC EVALUATION OF COLLATERAL CIRCULATION PREDICTS INFARCTION DURING ENDOVASCULAR PROCEDURES FOR MIDDLE CEREBRAL ARTERY STROKE. *Romanian Journal of Neurology*, 13(3), 133-150.
- Ramírez, N. M. (2014). Densidad Asimétrica Neuronal Inter-Hemisférica de la Corteza Insular en Ratones FMR1 Knock-Out. 32(4), 1377-1382.
- Robertson, C., Puskar, A., Hoffman, G., Murphy, A., Saraswati, M., & Fiskum, G. (2006). Physiologic progesterone reduces mitochondrial dysfunction and hippocampal cell loss after traumatic brain injury in female rats. *Experimental Neurology*, 197, 235-243.
- Valverde, F. (2002). ESTRUCTURA DE LA CORTEZA CEREBRAL: organización intrínseca y análisis comparativo del neocórtex. *Revisión en neurociencia* 34, 758-780.
- Vector Laboratories . (n.d.). Retrieved 11 14, 2014, from <http://www.vectorlabs.com/uk/catalog.aspx?catID=28>
- Vibjerg, R., Johnsen, J., Kristiansen, S., & Zachara, N. E. (2013). Ischemic preconditioning increases myocardial O-GlcNAc. *Scandinavian Cardiovascular Journal*, 47, 168–174.

### 3. Anexos:

#### 3.1. Resultados fotográficos



*Imagen 4. Análisis inmunohistoquímico de la señal de NeuN en la población celular de neuronas para región supragranular de la corteza sensitiva de los individuos D (tejido isquémico con tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) respectivamente, en ratas Wistar a las que se les ha inducido una isquemia por medio de la cirugía experimental MCAO (Middle cerebral artery occlusion). Las imágenes se obtienen bajo un microscopio de fluorescencia usando el objetivo de 40X.*



*Imagen 5. Análisis inmunohistoquímico de la de la señal de NeuN en la población celular de neuronas para región infragranular de la corteza sensitiva de los individuos D (tejido isquémico con tratamiento con glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento con glucosamina) respectivamente, de ratas Wistar a las*

que se les ha inducido una isquemia por medio de la cirugía experimental MCAO (Middle cerebral artery occlusion). Las imágenes se obtienen bajo un microscopio de fluorescencia usando el objetivo de 40X.

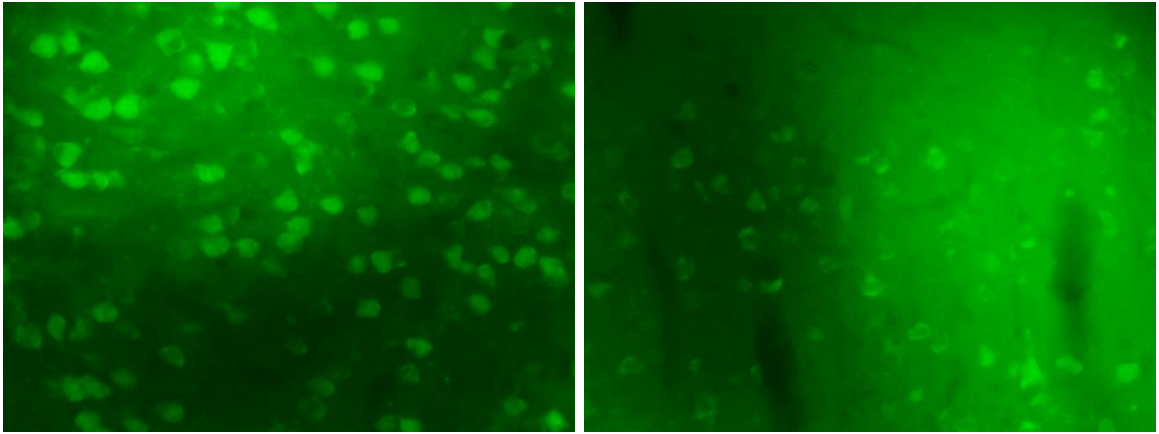


Imagen 6. Análisis inmunohistoquímico de la de la señal de NeuN en la población celular de neuronas para región supragranular de la corteza sensitiva de los individuos F(tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) respectivamente, bajo tinción Inmunohistoquímica de fluorescencia de ratas Wistar a las que se les ha inducido una isquemia por medio de la cirugía experimental MCAO (Middle cerebral artery occlusion). Las imágenes se obtienen bajo un microscopio de fluorescencia usando el objetivo de 40X.

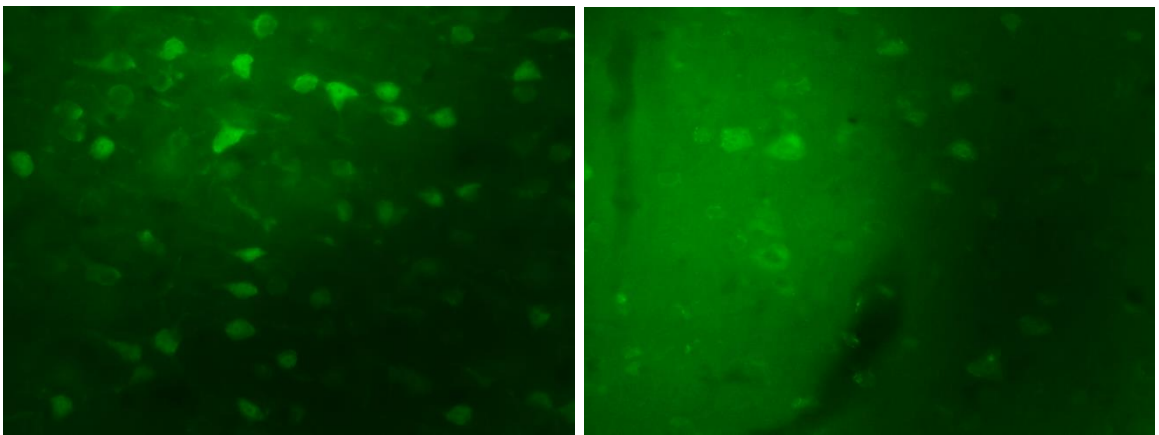


Imagen 7. Análisis inmunohistoquímico de la de la señal de NeuN en la población celular de neuronas para región infragranular de la corteza sensitiva de los individuos F(tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) respectivamente, bajo tinción Inmunohistoquímica de fluorescencia de ratas Wistar a las que se les ha inducido

una isquemia por medio de la cirugía experimental MCAO (Middle cerebral artery occlusion). Las imágenes se obtienen bajo un microscopio de fluorescencia usando el objetivo de 40X.

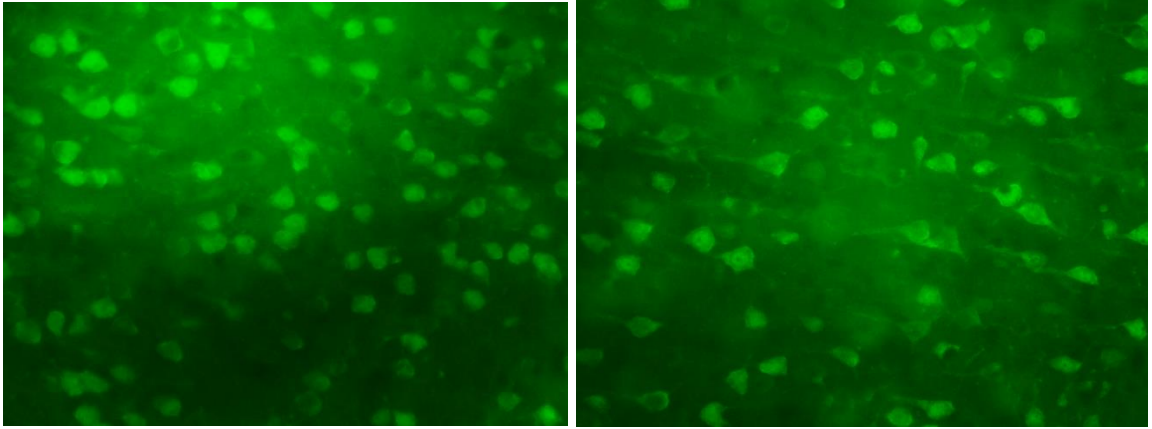


Imagen 8. Análisis inmunohistoquímico de la de la señal de NeuN en la población celular de neuronas para región supragranular de la corteza sensitiva de los individuos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina) respectivamente, bajo tinción Inmunohistoquímica de fluorescencia de ratas Wistar a las que se les ha inducido una isquemia por medio de la cirugía experimental MCAO (Middle cerebral artery occlusion). Las imágenes se obtienen bajo un microscopio de fluorescencia usando el objetivo de 40X.

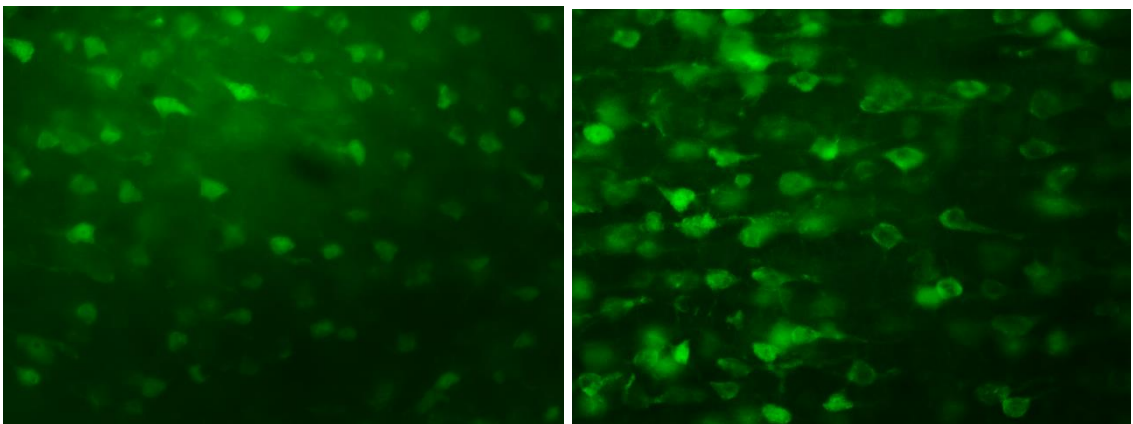


Imagen 9. Análisis inmunohistoquímico de la de la señal de NeuN en la población celular de neuronas para región infragranular de la corteza sensitiva de los individuos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina) respectivamente, bajo tinción Inmunohistoquímica de fluorescencia de ratas Wistar a las que se les ha inducido

una isquemia por medio de la cirugía experimental MCAO (Middle cerebral artery occlusion). Las imágenes se obtienen bajo un microscopio de fluorescencia usando el objetivo de 40X

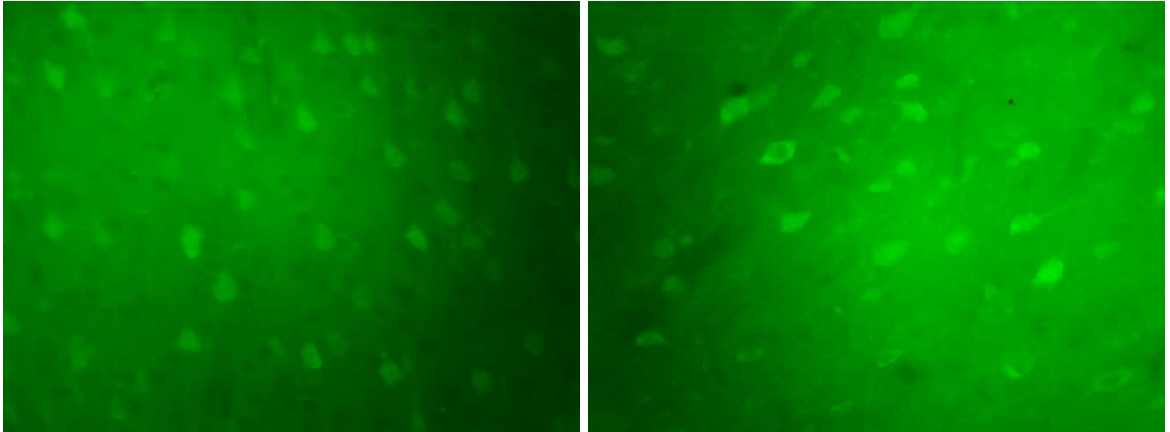


Imagen 10. Análisis inmunohistoquímico de la de la señal de NeuN en la población celular de neuronas para región supragranular de la corteza motora de los individuos D (tejido isquémico con tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) respectivamente, bajo tinción inmunohistoquímica de fluorescencia de ratas Wistar a las que se les ha inducido una isquemia por medio de la cirugía experimental MCAO (Middle cerebral artery occlusion). Las imágenes se obtienen bajo un microscopio de fluorescencia usando el objetivo de 40X

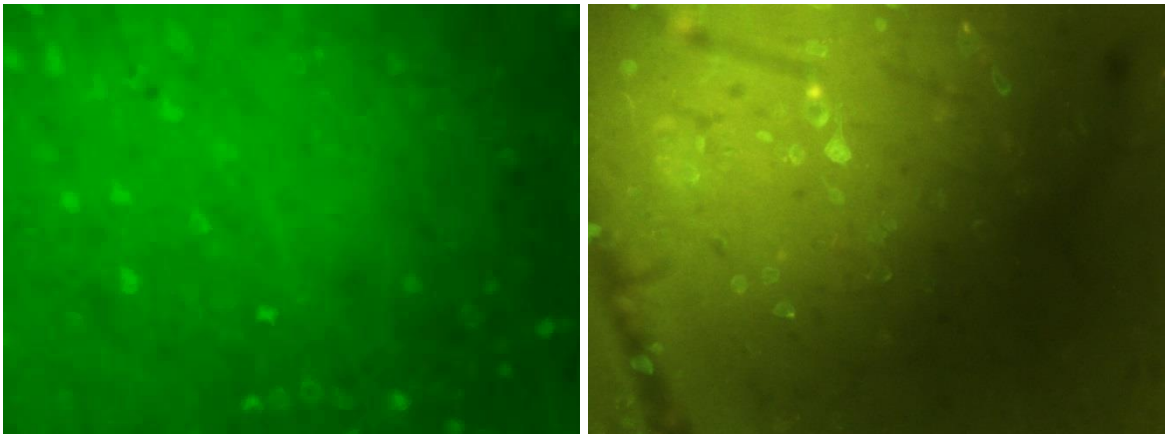
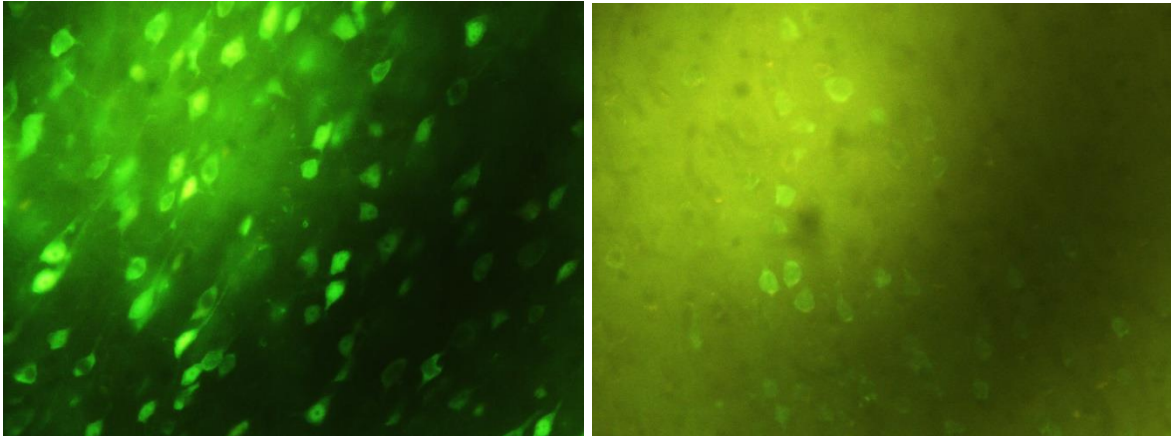
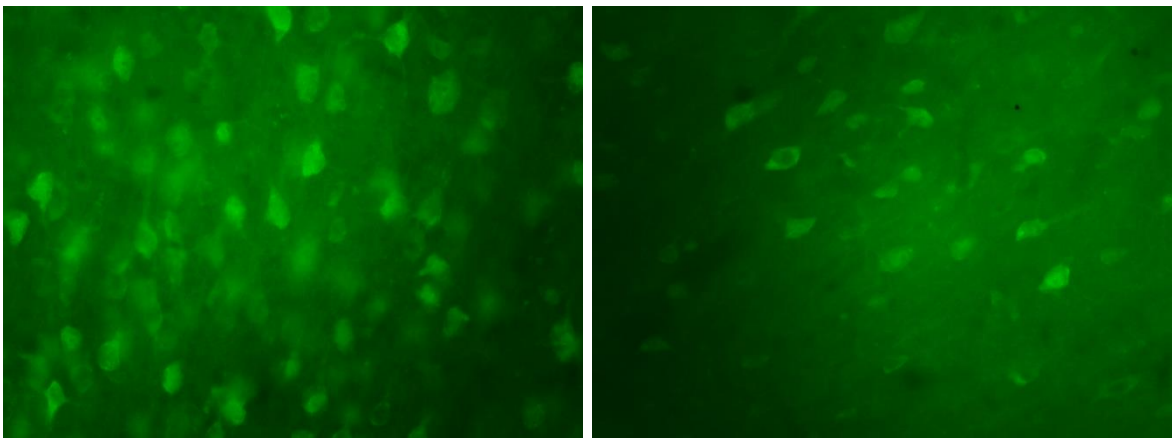


Imagen 11. Análisis inmunohistoquímico de la de la señal de NeuN en la población celular de neuronas para región infragranular de la corteza motora de los individuos D (tejido isquémico con tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) respectivamente, bajo tinción

*inmunohistoquímica de fluorescencia de ratas Wistar a las que se les ha inducido una isquemia por medio de la cirugía experimental MCAO (Middle cerebral artery occlusion). Las imágenes se obtienen bajo un microscopio de fluorescencia usando el objetivo de 40X*

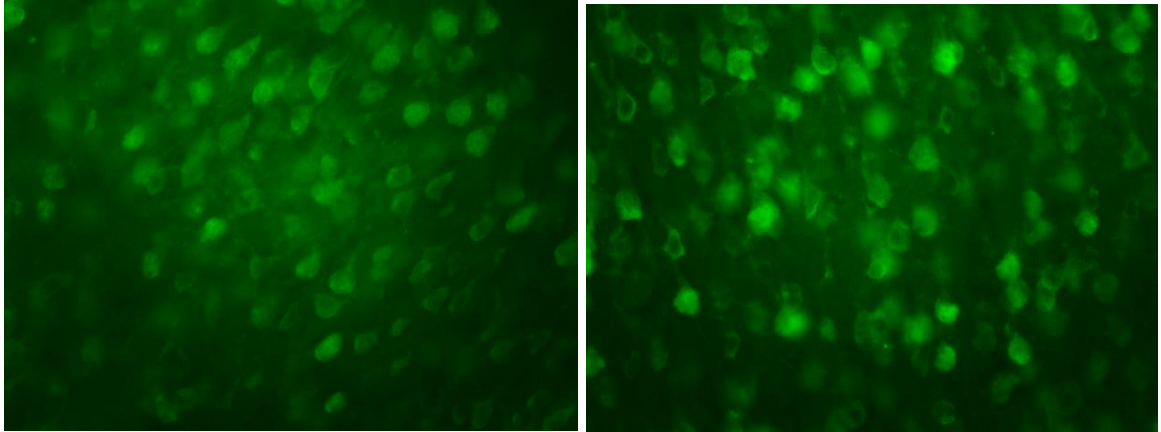


*Imagen 12. Análisis inmunohistoquímico de de la señal de NeuN en la población celular de neuronas para región supragranular de la corteza motora de los individuos F(tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) respectivamente, bajo tinción Inmunohistoquímica de fluorescencia de ratas Wistar a las que se les ha inducido una isquemia por medio de la cirugía experimental MCAO (Middle cerebral artery occlusion). Las imágenes se obtienen bajo un microscopio de fluorescencia usando el objetivo de 40X*

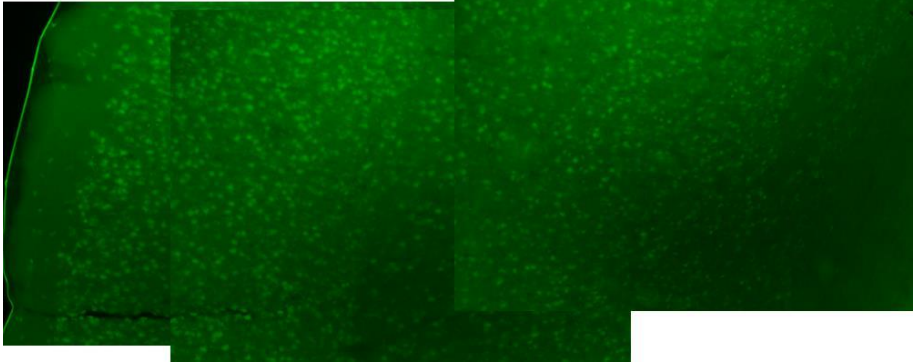
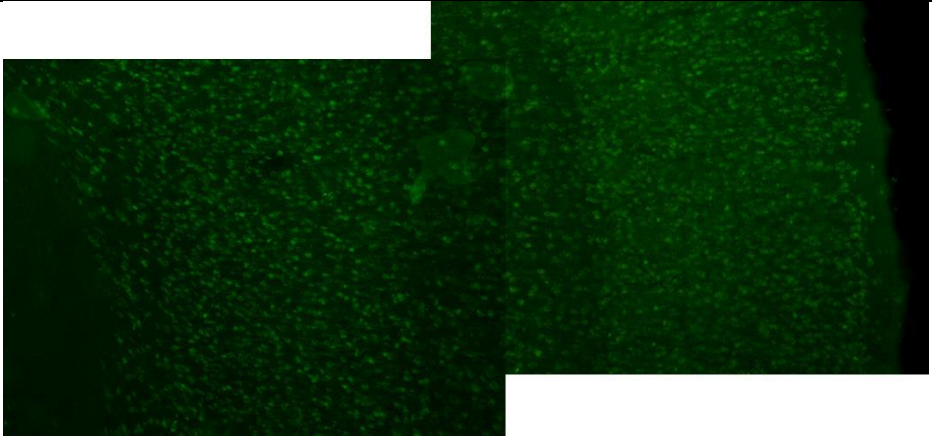


*Imagen 13. Análisis inmunohistoquímico de la de la señal de NeuN en la población celular de neuronas para región infragranular de la corteza motora de los individuos F(tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido*

*isquémico sin tratamiento de glucosamina) respectivamente, bajo tinción Inmunohistoquímica de fluorescencia de ratas Wistar a las que se les ha inducido una isquemia por medio de la cirugía experimental MCAO (Middle cerebral artery occlusion). Las imágenes se obtienen bajo un microscopio de fluorescencia usando el objetivo de 40X*



*Imagen 14. Análisis inmunohistoquímico de la de la señal de NeuN en la población celular de neuronas para región supragranular de la corteza motora de los individuos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina) respectivamente, bajo tinción Inmunohistoquímica de fluorescencia de ratas Wistar a las que se les ha inducido una isquemia por medio de la cirugía experimental MCAO (Middle cerebral artery occlusion). Las imágenes se obtienen bajo un microscopio de fluorescencia usando el objetivo de 40X.*

	<p>GRUPO CONTROL SIN ISQUEMIA Y SIN TRATAMIENTO DE GLUCOSAMIN A (GRUPO F)</p>
	<p>GRUPO CONTROL SIN ISQUEMIA Y CON TRATAMIENTO DE GLUCOSAMIN A (GRUPO E)</p>

*Imagen 15. Imágenes representativas de la señal de NeuN de la corteza sensitiva de los individuos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina) respectivamente, bajo un microscopio de fluorescencia usando el objetivo de 10X.*

### 3.2. Resultados estadísticos

- Resultados estadísticas para la región supragranular de la corteza sensitiva:

Supuestos:

Ho: los residuos de modelo de regresión lineal tienen una distribución normal.

Ha: los residuos de modelo de regresión lineal no tienen una distribución normal.

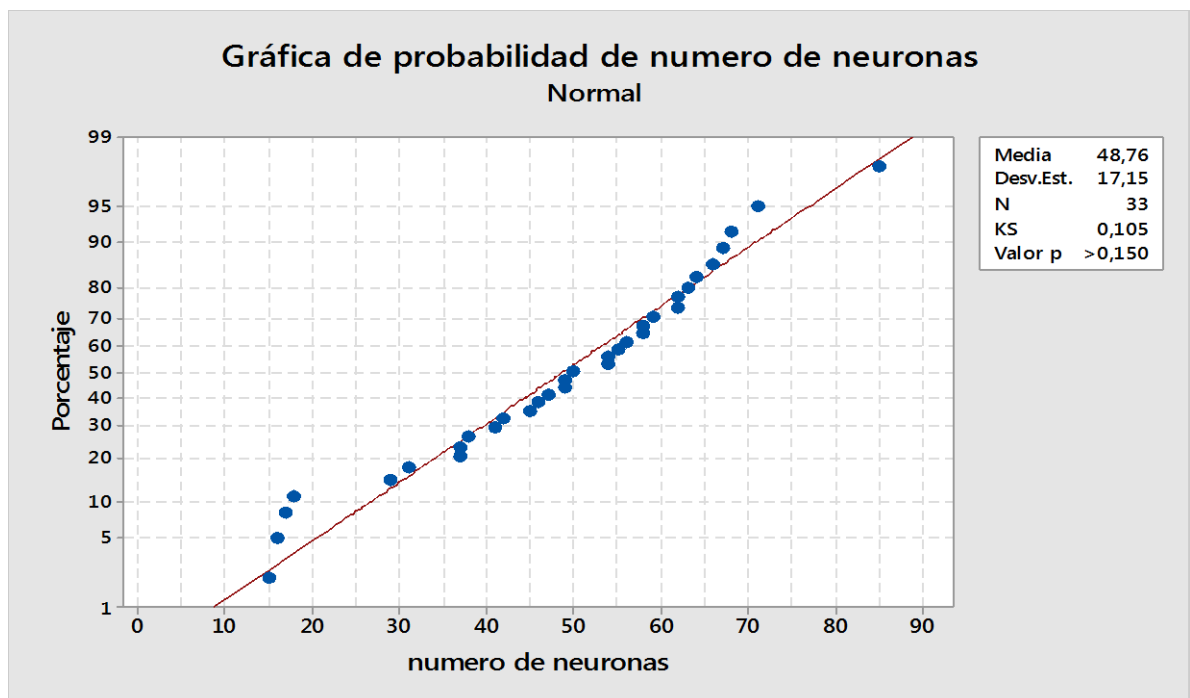
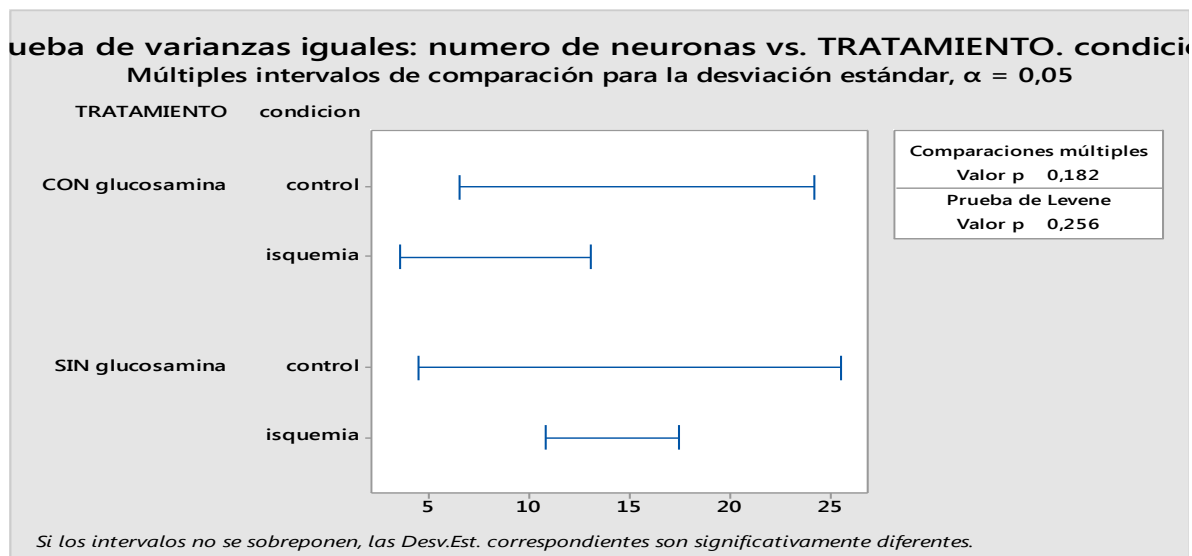


Figura 15. Prueba de normalidad para el promedio en el número de neuronas en la región supragranular de los cortes de la corteza sensitiva

Ho: Los residuos del modelo lineal tienen todos la misma varianza

Ha: la varianza de los residuos del modelo lineal no presenta la misma varianza



**Figura 16.** Prueba de varianzas iguales para el promedio en el número de neuronas en la región supragranular de los cortes de la corteza sensitiva

Al evaluar los resultados de los supuestos de normalidad y homogeneidad para la región supragranular de la corteza sensitiva, se observa que el valor P es mayor al compararlo el valor de significancia. Esto indica que se aceptan ambas hipótesis nulas, por lo tanto los residuos del modelo determinado presentan una distribución normal y tiene varianzas iguales.

**Tabla 5** Resultados análisis de varianza para la región supragranular de la corteza sensitiva.

Anova						
Factor	Tipo	Niveles	Valores			
TRATAMIENTO	Fijo	2	CON glucosamina. SIN glucosamina			
Condición	Fijo	2	control. isquemia			
Análisis de Varianza						
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p	
TRATAMIENTO	1	589,4	589,39	7,11	0,012	
Condición	1	5055,7	5055,71	61,01	0,000	
TRATAMIENTO*condición	1	963,1	963,12	11,62	0,002	
Error	29	2403,3	82,87			
Total	32	9414,1				
Resumen del modelo						
	S R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)			
9,10339	74,47%	71,83%	66,87%			

*Tabla 6. Resultados de comparación entre los F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina)*

Ho: las medias son iguales entre los grupos experimentales F y B  
 Ha: las medias son diferentes entre los grupos experimentales F y B

condición = control restado a:

condición	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
isquemia	-25,14	3,219	-7,811	0,0000

Condición	N	Media	Agrupación
Control	15	62,3611	A
Isquemia	18	37,2222	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

La comparación entre los grupos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) son diferentes, ya que P es menor a 0,05 de significancia, por lo que se rechaza la hipótesis nula.

*Tabla 7. Resultados de comparación entre los grupos B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) y D (tejido isquémico con tratamiento de glucosamina)*

Ho: las medias son iguales entre los grupos experimentales D y B  
 Ha: las medias son diferentes entre los grupos experimentales D y B

TRATAMIENTO = CON glucosamina restado a:

TRATAMIENTO	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
SIN glucosamina	-8,583	3,219	-2,667	0,0124

TRATAMIENTO	N	Media	Agrupación
CON glucosamina	15	54,0833	A
SIN glucosamina	18	45,5000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

La comparación entre los grupos B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) y D (tejido isquémico con tratamiento de glucosamina) son diferentes ya que P es menor a 0,05 de significancia, por lo que se rechaza la hipótesis nula.

*Tabla 8. Resultados de comparación entre los F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina)*

Ho: las medias son iguales entre los grupos experimentales F y E						
Ha: las medias son diferentes entre los grupos experimentales F y E						
condición = control y TRATAMIENTO = CON glucosamina restado a:						
		Diferencia				
TRATAMIENTO	condicion	de medias	SE de	Valor T	Valor P	
SIN glucosamina	control	2,39	4,798	0,498	0,9589	
TRATAMIENTO*condición		N	Media	Agrupación		
SIN glucosamina	control	9	63,5556	A		
CON glucosamina	control	6	61,1667	A		

La comparación entre los grupos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina) son iguales ya que P es mayor a 0,05 de significancia, por lo que se acepta la hipótesis nula.

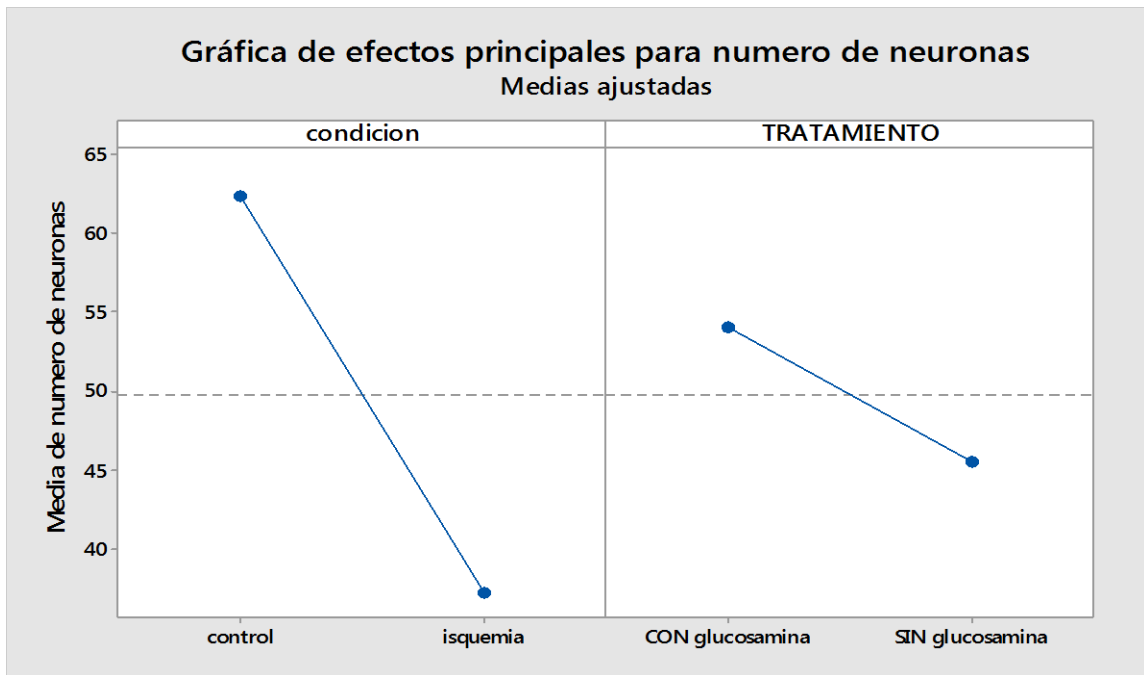


Figura 17. Efectos principales para el promedio en el número de neuronas entre los grupos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) Y D (tejido isquémico con tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina)

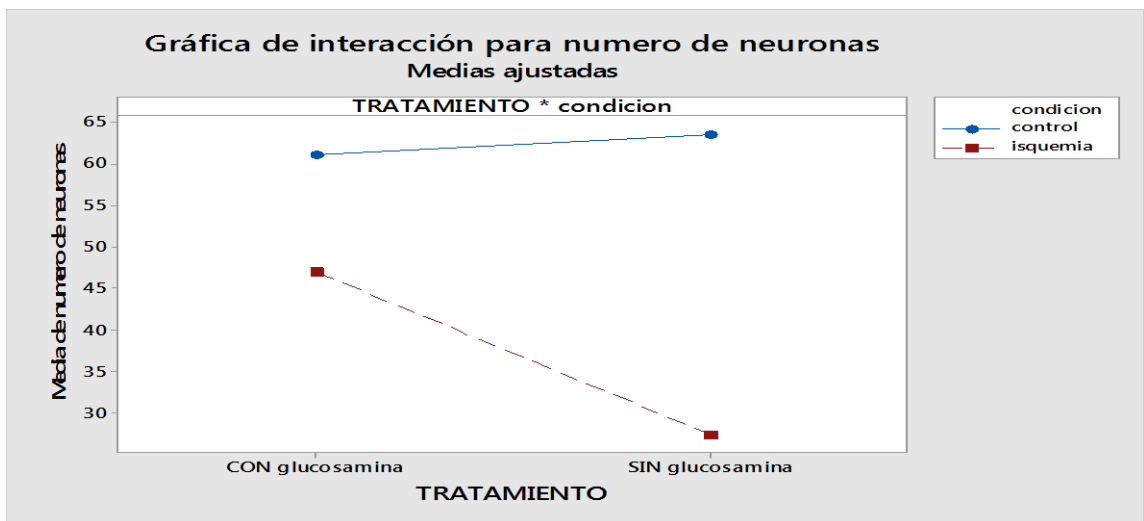


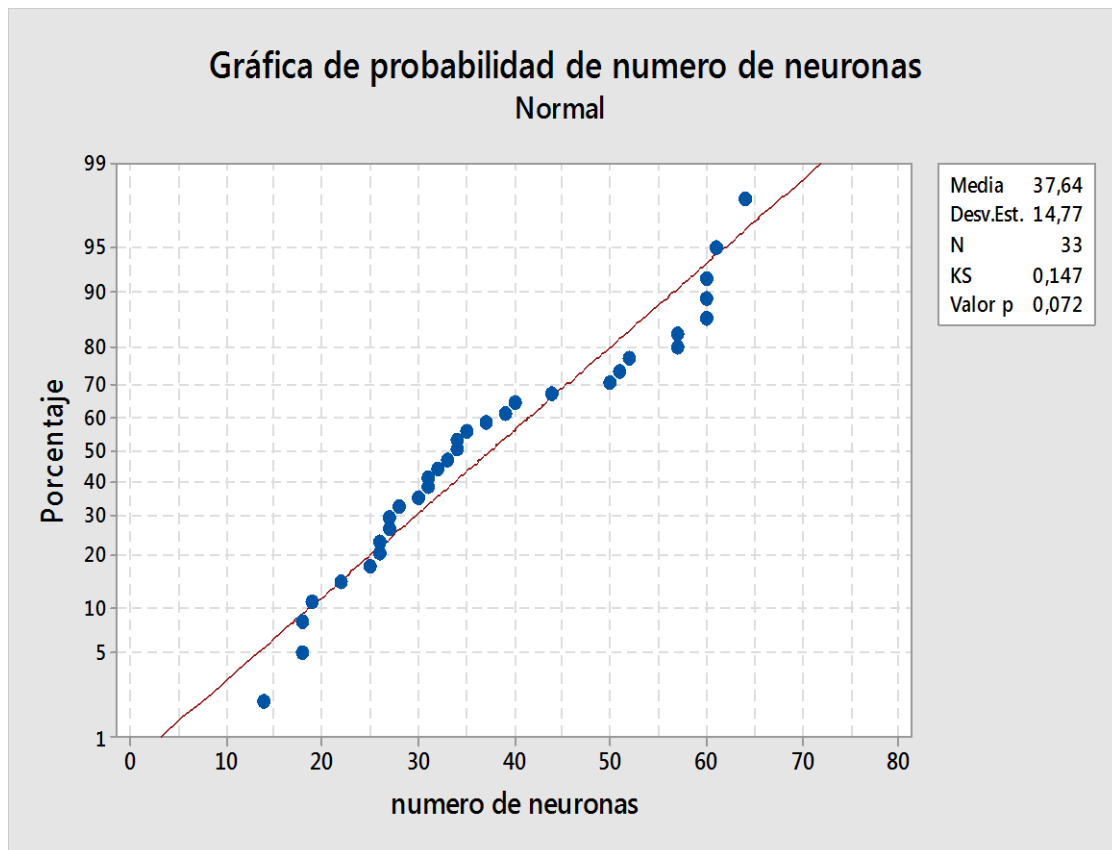
Figura 18. Interacciones de todos los grupos en el número de neuronas.

- Resultados estadísticas para la región infragranular de la corteza sensitiva:

Supuestos:

Ho: los residuos de modelo de regresión lineal tienen una distribución normal.

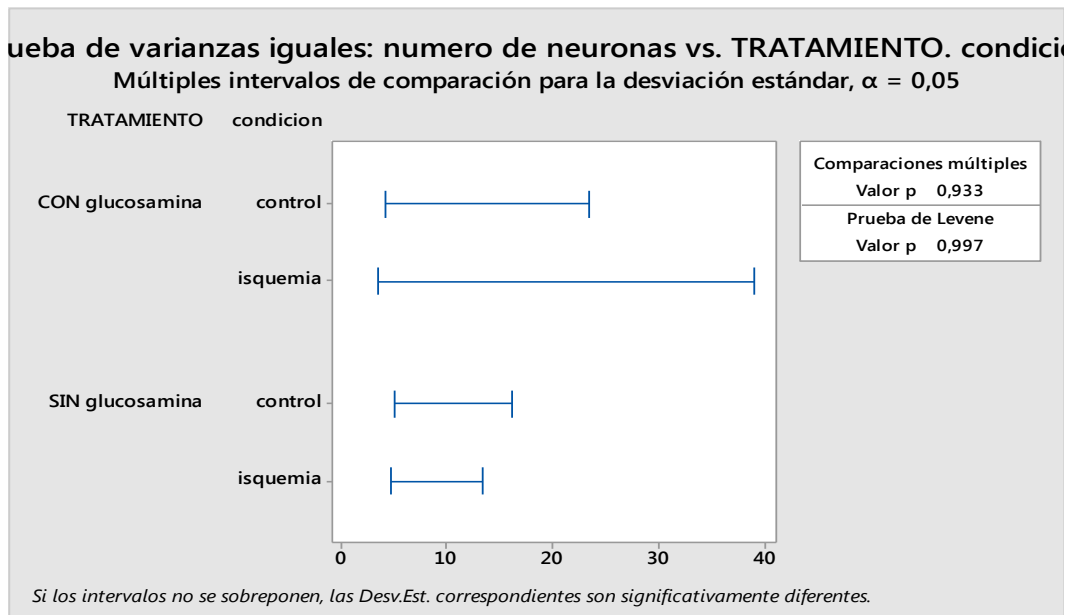
Ha: los residuos de modelo de regresión lineal no tienen una distribución normal.



*Figura 19. Prueba de normalidad para el promedio en el número de neuronas en la región infragranular de los cortes de la corteza sensitiva*

Ho: Los residuos del modelo lineal tienen todos la misma varianza

Ha: la varianza de los residuos del modelo lineal no presenta la misma varianza



*Figura 20. Prueba de varianzas iguales para el promedio en el número de neuronas en la región infragranular de los cortes de la corteza sensitiva*

Al evaluar los resultados de los supuestos de normalidad y homogeneidad para la región infragranular de la corteza sensitiva, se observa que el valor P es mayor al compararlo el valor de significancia. Esto indica que se aceptan ambas hipótesis nulas, por lo tanto los residuos del modelo determinado presentan una distribución normal y tiene varianzas iguales.

*Tabla 9. Análisis de varianza para la región infragranular de la corteza sensitiva*

Análisis de Varianza						
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p	
TRATAMIENTO	1	96,45	96,45	1,50	0,231	
condicion	1	3050,67	3050,67	47,37	0,000	
TRATAMIENTO*condicion	1	1404,50	1404,50	21,81	0,000	
Error	29	1867,50	64,40			
Total	32	6981,64				
Resumen del modelo						
	S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)		
	8,02475	73,25%	70,48%	65,46%		

**Tabla 10. Resultados de comparación entre los F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina)**

Ho: las medias son iguales entre los grupos experimentales F y B  
 Ha: las medias son diferentes entre los grupos experimentales F y B

condición = control restado a:

condición	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
isquemia	-19,53	2,837	-6,883	0,0000

condición	N	Media	Agrupación
control	15	47,5278	A
isquemia	18	28,0000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

La comparación entre los grupos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) son diferentes, ya que P es menor a 0,05 de significancia, por lo que se rechaza la hipótesis nula.

**Tabla 11. Resultados de comparación entre los grupos B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) y D (tejido isquémico con tratamiento de glucosamina)**

Ho: las medias son iguales entre los grupos experimentales B y D  
 Ha: las medias son diferentes entre los grupos experimentales B y D

TRATAMIENTO = CON glucosamina restado a:

TRATAMIENTO	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
SIN glucosamina	3,472	2,837	1,224	0,2309

TRATAMIENTO	N	Media	Agrupación
SIN glucosamina	18	39,5000	A
CON glucosamina	15	36,0278	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparación entre los grupos D (tejido isquémico con tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) son iguales, ya que P es mayor a 0,05 de significancia, se acepta la hipótesis nula.

*Tabla 12. Resultados de comparación entre los F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina)*

Ho: las medias son iguales entre los grupos experimentales F y E					
Ha: las medias son diferentes entre los grupos experimentales F y E					
condicion = control y TRATAMIENTO = CON glucosamina restado a:					
condicion	TRATAMIENTO	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
control	SIN glucosamina	16,72	4,229	3,954	0,0024
TRATAMIENTO*condicion	N	Media	Agrupación		
SIN glucosamina control	9	55,8889	A		
CON glucosamina control	6	39,1667	B		
-----	-----	-----	-----	-----	-----

La comparación entre los grupos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina) son diferente ya que P es menor a 0,05 de significancia, por lo que se rechaza la hipótesis nula.

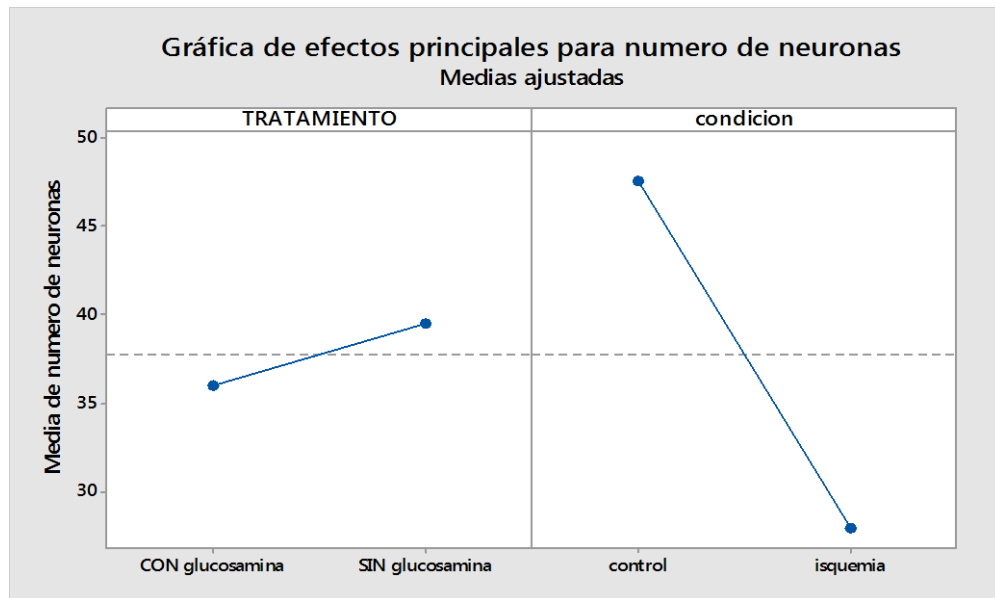


Figura 21. Efectos principales para el promedio en el número de neuronas entre los grupos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) Y D (tejido isquémico con tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina)

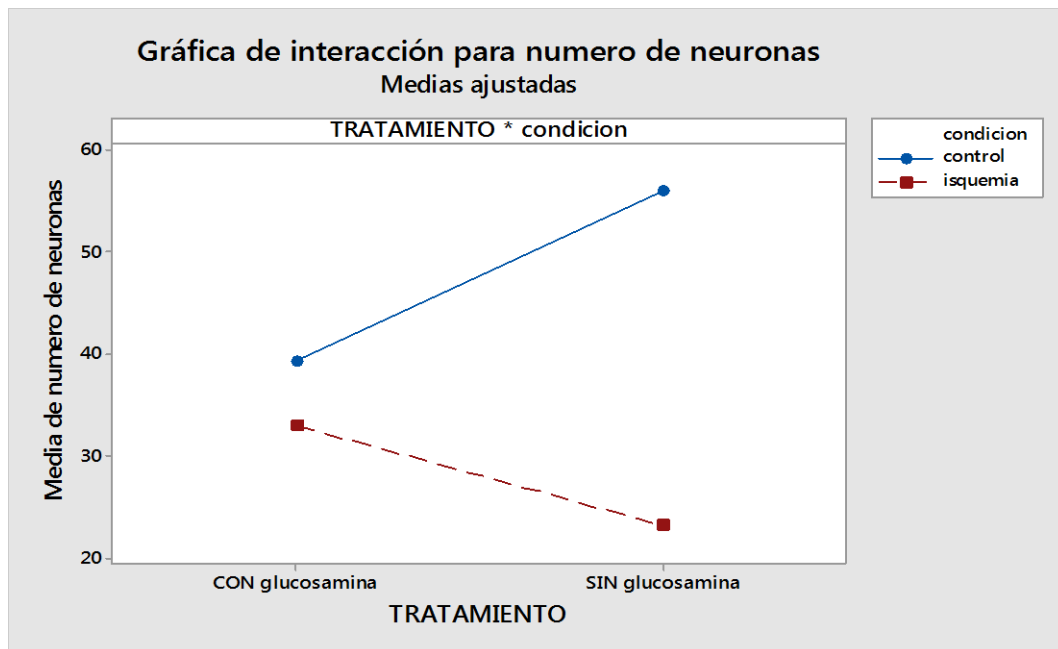


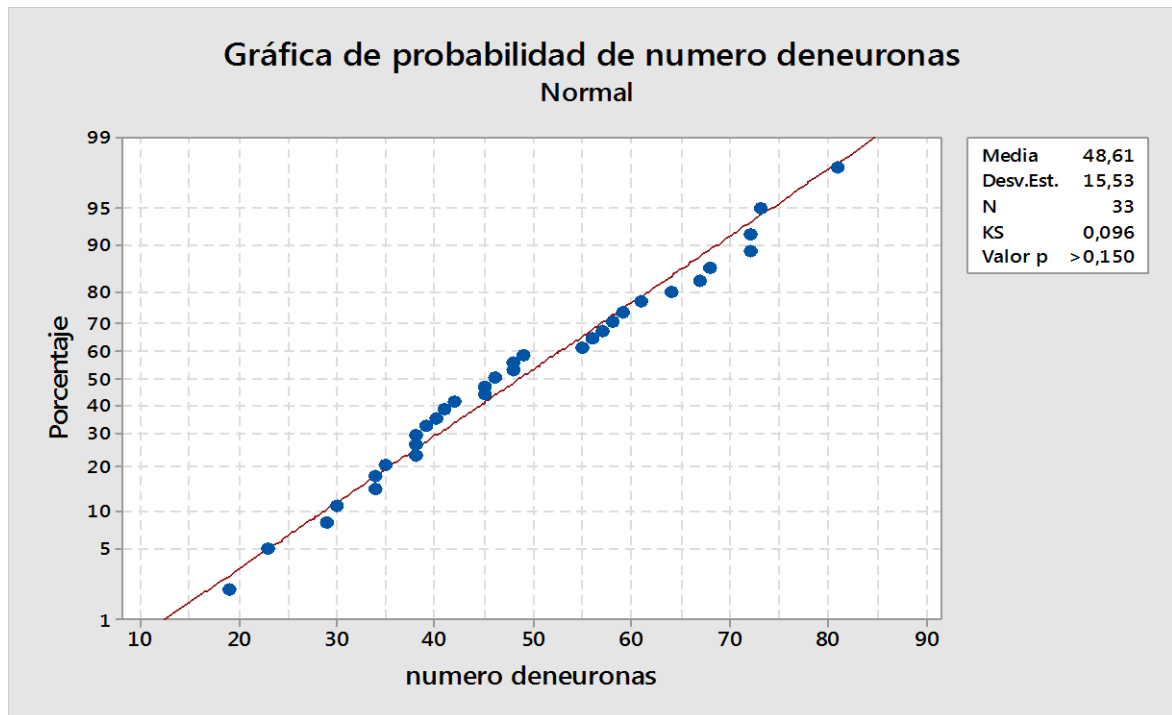
Figura 22. Interacciones de todos los grupos en el número de neuronas. El tejido isquémico sin glucosamina presenta la menor cantidad de células. El tratamiento con glucosamina del tejido isquémico presenta una mayor recuperación celular.

- Resultados estadísticas para la región supragranular de la corteza motora:

Supuestos

Ho: los residuos de modelo de regresión lineal tienen una distribución normal.

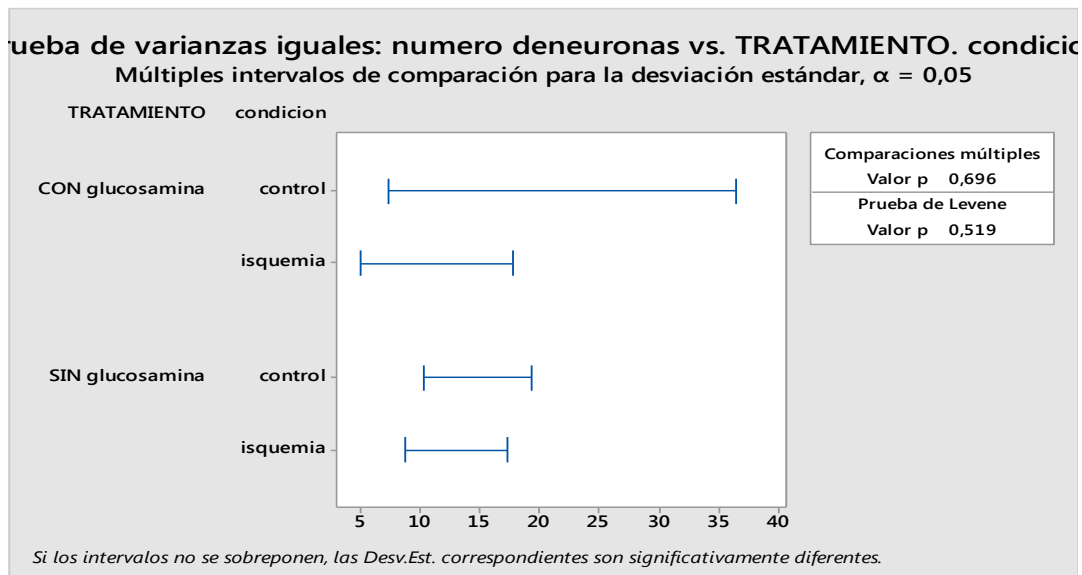
Ha: los residuos de modelo de regresión lineal no tienen una distribución normal.



*Figura 23. Prueba de normalidad para el promedio en el número de neuronas en la región supragranular de los cortes de la corteza motora*

Ho: Los residuos del modelo lineal tienen todos la misma varianza

Ha: la varianza de los residuos del modelo lineal no presenta la misma varianza



*Figura 24. Prueba de varianzas iguales para el promedio en el número de neuronas en la región supragranular de los cortes de la corteza motora*

Al evaluar los resultados de los supuestos de normalidad y homogeneidad para la región supragranular de la corteza motora, se observa que el valor P es mayor al compararlo el valor de significancia. Esto indica que se aceptan ambas hipótesis nulas, por lo tanto los residuos del modelo determinado presentan una distribución normal y tiene varianzas iguales.

*Tabla 13. Análisis de varianza (ANOVA) para la región supragranular en la corteza motora.*

Información del factor						
Factor	Tipo	Niveles	Valores			
TRATAMIENTO	Fijo	2	CON glucosamina. SIN glucosamina			
condicion	Fijo	2	control. isquemia			
Análisis de Varianza						
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p	
TRATAMIENTO	1	41,51	41,51	0,37	0,549	
condicion	1	4050,00	4050,00	35,91	0,000	
TRATAMIENTO*condicion	1	162,00	162,00	1,44	0,240	
Error	29	3271,11	112,80			
Total	32	7719,88				
Resumen del modelo						
	S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)		
	10,6206	57,63%	53,24%	44,63%		

*Tabla 14. Resultados de comparación entre los F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina)*

Ho: las medias son iguales entre los grupos experimentales F y B  
 Ha: las medias son diferentes entre los grupos experimentales F y B

condicion = control restado a:

condicion	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
isquemia	-22,50	3,755	-5,992	0,0000

condicion	N	Media	Agrupación
control	15	60,7778	A
isquemia	18	38,2778	B

La comparación entre los grupos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) son diferentes, ya que P es menor a 0,05 de significancia, por lo que se rechaza la hipótesis nula.

*Tabla 15. Resultados de comparación entre los grupos B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) y D (tejido isquémico con tratamiento de glucosamina)*

Ho: las medias son iguales entre los grupos experimentales D y B  
 Ha: las medias son diferentes entre los grupos experimentales D y B

TRATAMIENTO = CON glucosamina restado a:

TRATAMIENTO = CON glucosamina restado a:

TRATAMIENTO	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
SIN glucosamina	-2,278	3,755	-0,6066	0,5488

TRATAMIENTO	N	Media	Agrupación
CON glucosamina	15	50,6667	A
SIN glucosamina	18	48,3889	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

La comparación entre los grupos B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) y D (tejido isquémico con tratamiento de glucosamina) son iguales ya que P es mayor a 0,05 de significancia, por lo que se acepta la hipótesis nula.

Tabla 16. Resultados de comparación entre los F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina)

Ho: las medias son iguales entre los grupos experimentales F y E  
 Ha: las medias son diferentes entre los grupos experimentales F y E

condición = control y TRATAMIENTO = CON glucosamina restado a:

TRATAMIENTO	condicion	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
SIN glucosamina	control	2,22	5,598	0,397	0,9784

TRATAMIENTO*condicion	N	Media	Agrupación
SIN glucosamina control	9	61,8889	A
CON glucosamina control	6	59,6667	A

La comparación entre los grupos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina) son iguales ya que P es mayor a 0,05 de significancia, por lo que se acepta la hipótesis nula.

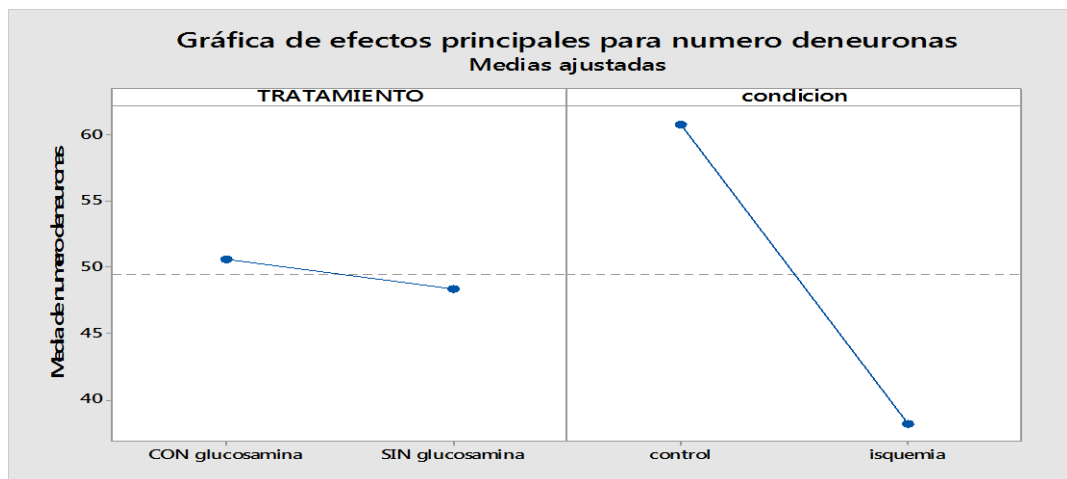
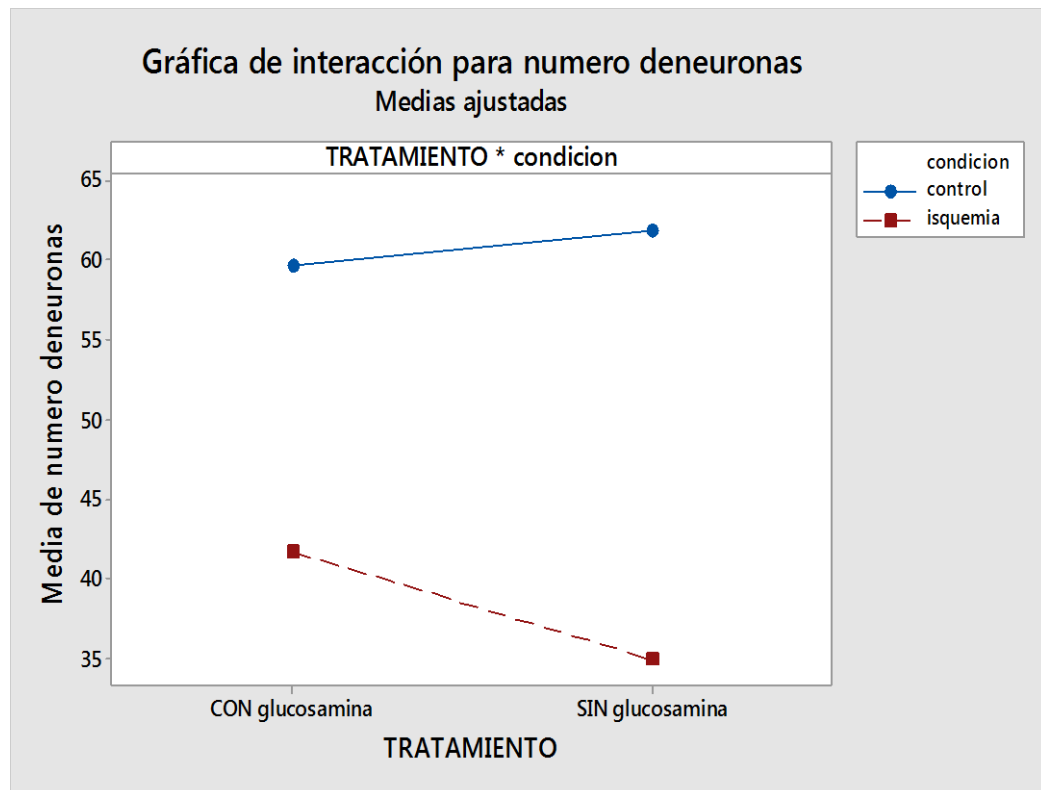


Figura 25. Efectos principales para el promedio en el número de neuronas entre los grupos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) Y D (tejido isquémico con tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina)



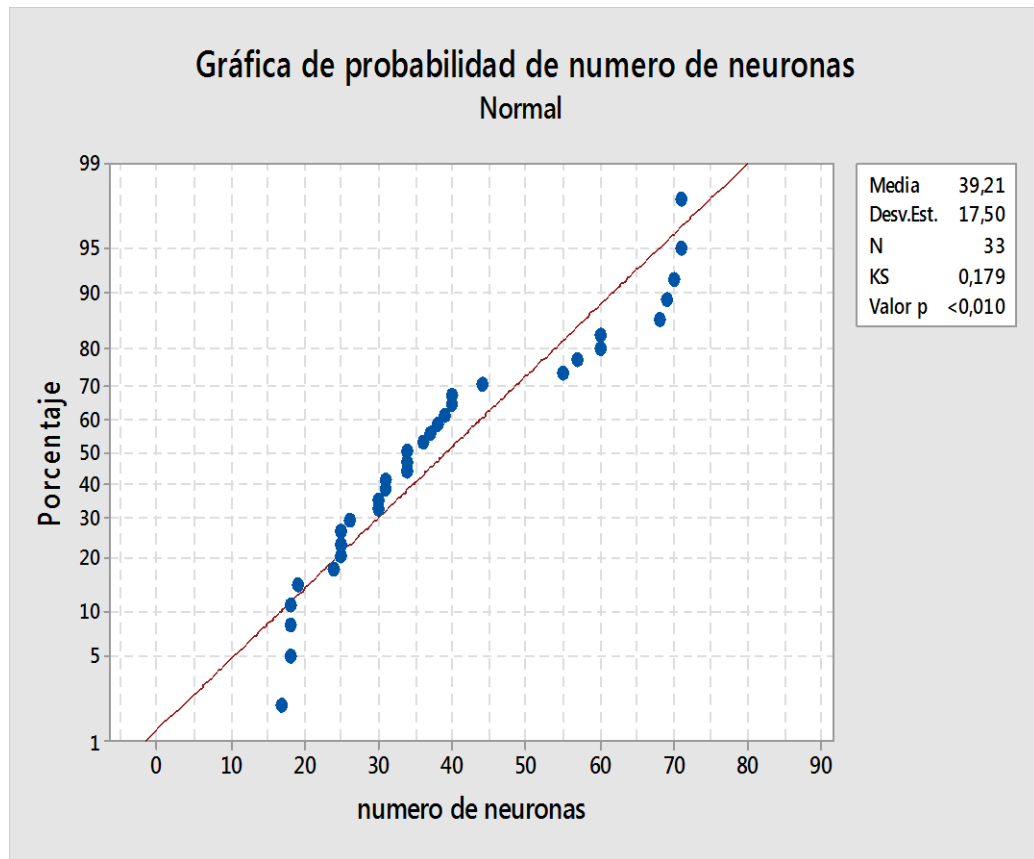
*Figura 26. Interacciones de todos los grupos en el número de neuronas. Los tejidos con isquemia presentan la menor cantidad de células, en comparación con los controles.*

- Resultados estadísticas para la región infragranular de la corteza motora:

Supuestos

Ho: los residuos de modelo de regresión lineal tienen una distribución normal.

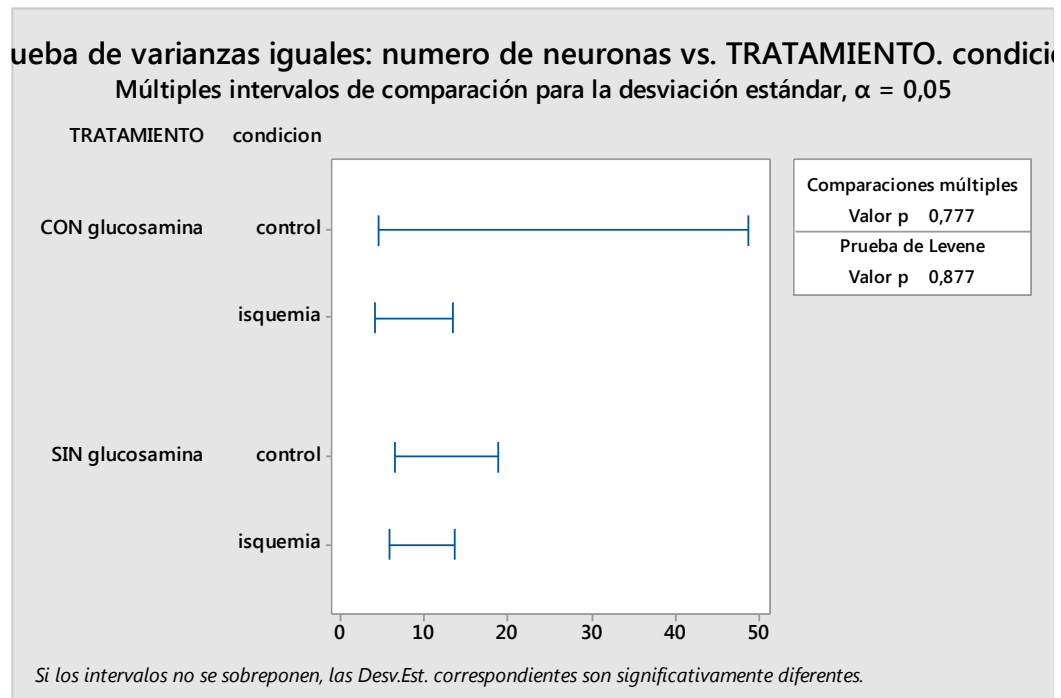
Ha: los residuos de modelo de regresión lineal no tienen una distribución normal.



*Figura 27. Prueba de normalidad para el promedio en el número de neuronas en la región infragranular de los cortes de la corteza motora*

Ho: Los residuos del modelo lineal tienen todos la misma varianza

Ha: la varianza de los residuos del modelo lineal no presenta la misma varianza



*Figura 28. Prueba de varianzas iguales para el promedio en el número de neuronas en la región infragranular de los cortes de la corteza motora*

Al evaluar los resultados de los supuestos de normalidad y homogeneidad para la región supragranular de la corteza motora, se observa que el valor P es menor para la prueba de normalidad. Esto indica que sólo se cumple la prueba de homogeneidad de varianza, cumpliéndose solo uno de los supuestos.

*Tabla 17. Resultados de comparación entre los F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina)*

Ho: las medias son iguales entre los grupos experimentales B y F				
Ha: las medias son diferentes entre los grupos experimentales B y F				
condición	N	Mediana	Clasificación del promedio	Z
control	9	68,00	14,0	3,58
isquemia	9	34,00	5,0	-3,58
General	18		9,5	
H = 12,79 GL = 1 P = 0,000				
H = 12,80 GL = 1 P = 0,000 (ajustados para los vínculos)				

Como el valor H es mayor al valor P es menor a 0,05, se rechaza la hipótesis nula, por lo que las medias entre el grupo B (tejido isquémico sin tratamiento de

glucosamina) y grupos F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) son diferentes.

*Tabla 18. Resultados de comparación entre los F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina)*

Ho: las medias son iguales entre los grupos experimentales F y E				
Ha: las medias son diferentes entre los grupos experimentales F y E				
TRATAMIENTO	N	Mediana	Clasificación del promedio	Z
CON glucosamina	6	35,00	4,1	-2,77
SIN glucosamina	9	68,00	10,6	2,77
General	15		8,0	
H = 7,67 GL = 1 P = 0,006				
H = 7,70 GL = 1 P = 0,006 (ajustados para los vínculos)				

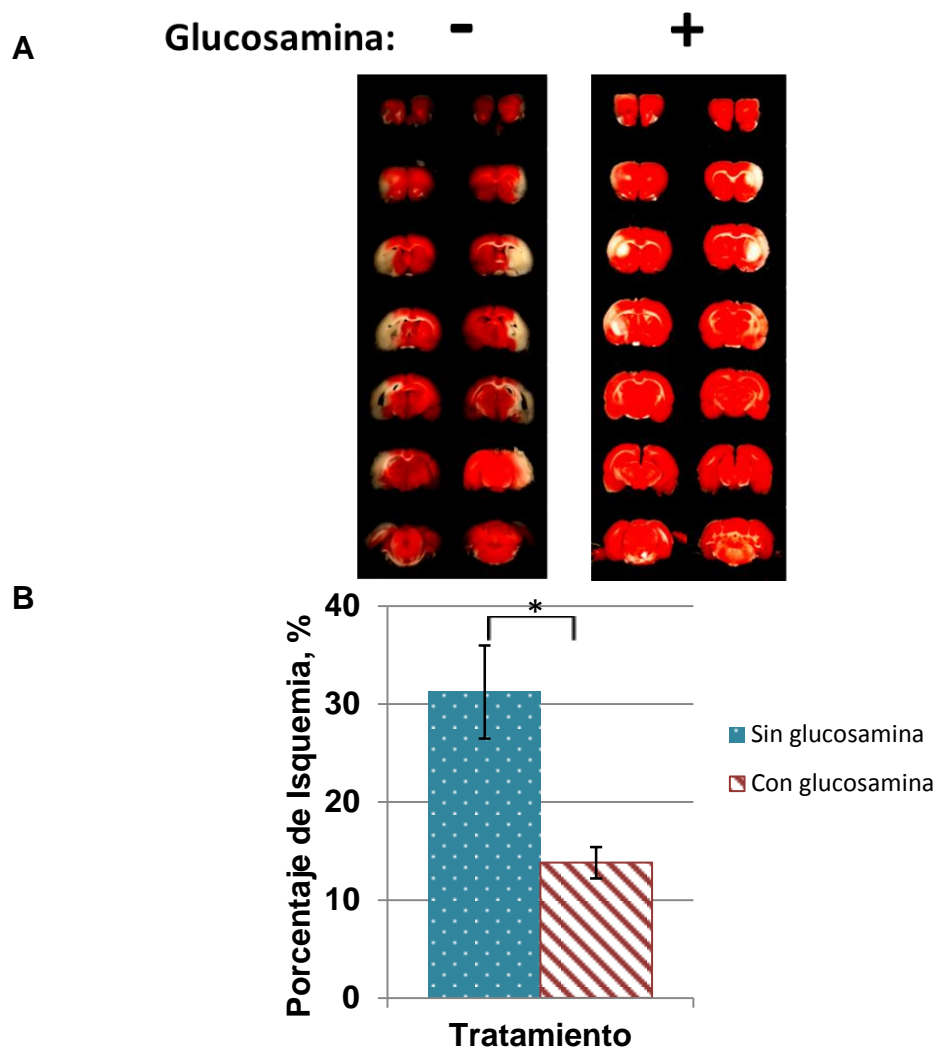
Como el valor H es mayor al valor P es menor a 0,05 se rechaza la hipótesis nula, por lo que las medias entre el grupo F (tejido no isquémico sin tratamiento de glucosamina) y grupo E (tejido no isquémico con tratamiento de glucosamina) son diferentes.

*Tabla 19. Resultados de comparación entre los B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) y D (tejido isquémico con tratamiento de glucosamina)*

Ho: las medias son iguales entre los grupos experimentales B y D				
Ha: las medias son diferentes entre los grupos experimentales B y D				
TRATAMIENTO	N	Mediana	del promedio	Z
CON glucosamina	9	25,00	6,6	-2,30
SIN glucosamina	9	34,00	12,4	2,30
General	18		9,5	
H = 5,27 GL = 1 P = 0,022				
H = 5,32 GL = 1 P = 0,021 (ajustados para los vínculos)				

Como el valor H es mayor al valor P es menor a 0,05 se rechaza la hipótesis nula, por lo que las medias entre el grupo B (tejido isquémico sin tratamiento de glucosamina) y grupo D (tejido isquémico con tratamiento de glucosamina) son diferentes.

### 3.3. Tinción con TTC



**Figura 29.** Tamaño del infarto evaluado con TTC, reactivo con el que se destaca en blanco el tejido muerto que no se tiñe de rojo, a las 24 horas de inducida la isquemia en el modelo de isquemia cerebral focal en ratas Wistar MCAO (Middle cerebral artery occlusion). (A) Tinción con TTC de cortes coronales de cerebro de rata a la que se le induce una isquemia con reperusión, sin tratamiento de glucosamina y con aplicación intraperitoneal de glucosamina media hora después de inducida la isquemia. (B) Comparación del tamaño del infarto medido como porcentaje del volumen del cerebro en los grupos sin tratamiento y con glucosamina (media  $\pm$ EEM,  $n=4$ , \*,  $p<0.05$  por la prueba de  $t$ -student).

### 3.4. Distribución de la densidad neuronal en el neocortex

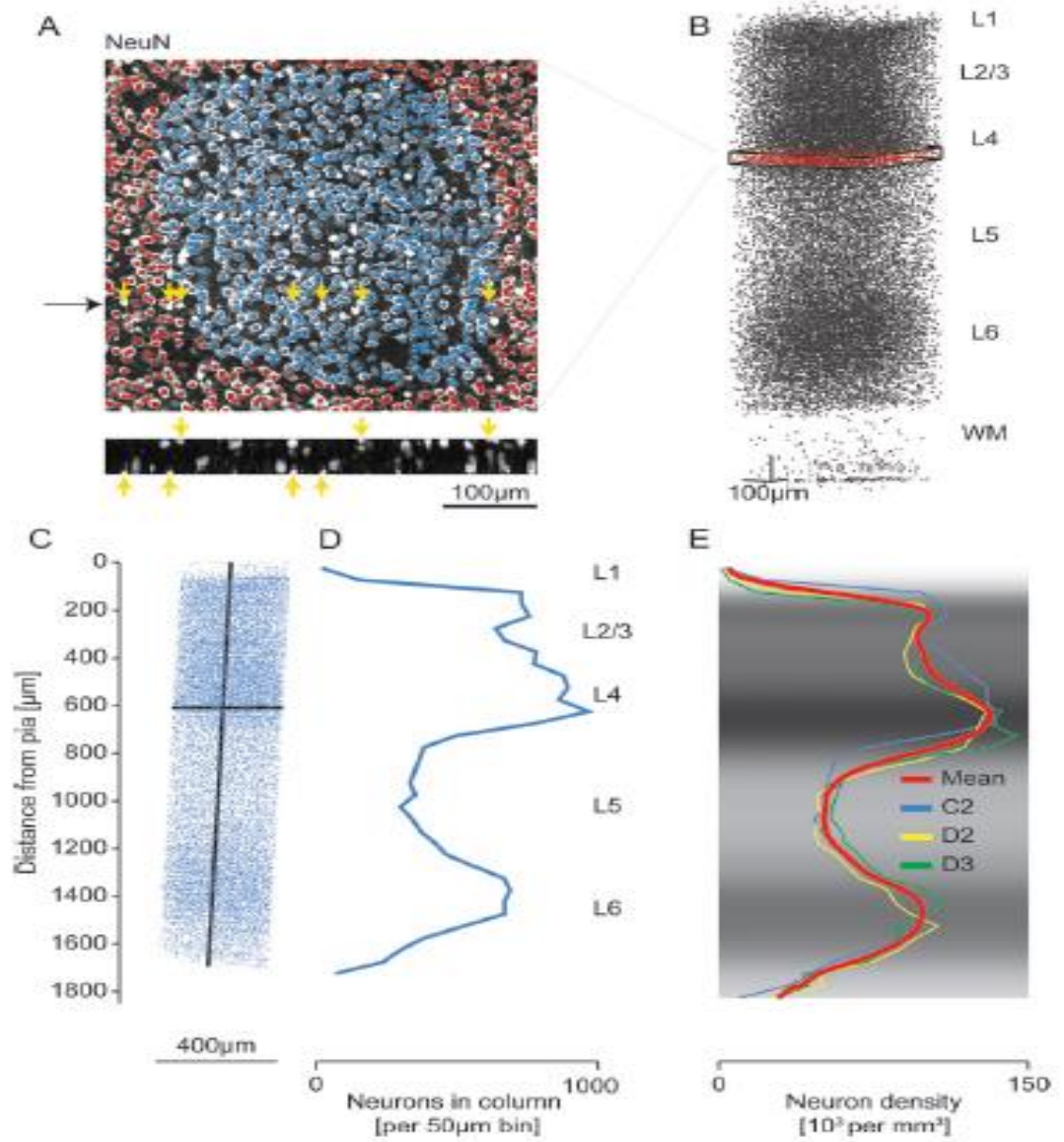


Figura 30 .Cantidad y distribución de neuronas bajo la señal de NeuN en ratas. (Meyer, Wimmer, Oberlaender, Kock, Sakmann, & Helmstaedter, 2010)

### 3.5. Carta de aprobación del proyecto por el comité de ética



Santiago de Cali, 8 de Octubre de 2010

Doctores

**Juliana Rengifo Gómez**

**César Arango Dávila**

Investigadores Universidad ICESI

Ciudad

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

Estimados Doctores,

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

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

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

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

Aterramente,

Jorge Pardeazabal

Presidente

Comité de Ética de Investigaciones en Animales Experimentales

### **3.6. Impacto ambiental**

Según los procedimientos descritos en este proyecto de investigación, éste generará un impacto ambiental debido a los reactivos desechados con el procedimiento inmunohistoquímico. Para esto se dispondrá de recipientes de desecho debidamente rotulados con el fin de que sean almacenados y tratados adecuadamente por el personal pertinente. Esta función es liderada por la Oficina de Salud Ocupacional y Medio Ambiente la cual está comprometida a mitigar, controlar y prevenir los impactos ambientales producto de espacios propios de la universidad a partir de planes de gestión integral de manejo de residuos

En cuanto a la utilización de animales como modelo experimental, se hará énfasis en generarles el menor dolor posible durante los procedimientos quirúrgicos. Los cuerpos de las ratas posteriores a la decapitación serán entregados a una empresa especializada en el manejo de desechos de riesgo biológico con el fin de que dispongan debidamente los cuerpos generando la mínima contaminación ambiental.