

EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA GLICOSILACIÓN TIPO O-GlcNAc EN
UN MODELO ANIMAL CON ISQUEMIA CEREBRAL

DIEGO FERNANDO TOBÓN TOVAR

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI

2015

EVALUACION DE LA INHIBICIÓN DE LA GLICOSILACIÓN TIPO O-GlcNAc EN
UN MODELO ANIMAL CON ISQUEMIA CEREBRAL

DIEGO FERNANDO TOBÓN TOVAR

Proyecto de Grado

Tutor

Juliana Rengifo Gómez

Bióloga PhD.

Cotutor

Alejandro Vera Gonzales

M.D. PhD. (ca)

Carlos Fernando Cardozo Hernández

Biólogo PhD. (ca)

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, QUÍMICA FARMACÉUTICA

SANTIAGO DE CALI

2015



Aprobado Por:

Evaluador

Álvaro A. Barrera Ocampo Ph.D.

Evaluador

Lina V. Becerra Hernández PhD.

Director del proyecto:

Juliana Rengifo Gómez Ph.D.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por el apoyo brindado.

A mi tutora Juliana Rengifo y a mis cotutores Alejandro Vera y Carlos Fernando Cardozo. Quienes me brindaron siempre su apoyo y me guiaron con paciencia, comprensión y dedicación.

A todas las personas que hicieron parte de este largo proceso de investigación y colaboraron con mi formación.

A la universidad ICESI

CONTENIDO

RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUCCIÓN	8
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	9
2.1 Pregunta de investigación y justificación.....	9
2.2 Marco teórico y estado del arte	11
2.3 Objetivos	15
2.4 Metodología Utilizada.....	16
2.5 Resultados	23
2.6 Discusión.....	32
2.7 Conclusiones.....	38
2.8 Recomendaciones.....	39
2.9 Referencias bibliográficas.....	40
3. ANEXO.....	42
3.1 Carta de aprobación del comité de ética.	42
3.2 Abreviaturas	43

RESUMEN

Para evaluar el efecto que tiene la inhibición de la glicosilación tipo N-acetil-O-glucosamina en cerebro de ratas *Wistar* tras un evento isquémico, se utilizó la siguiente metodología: Se inhibió la vía de las hexosaminas con 6-diazo-5-oxonorleucina, se produjo un evento isquémico focal, luego se extrajo el cerebro del modelo animal, estos se analizaron por inmunohistoquímica de fluorescencia y por tinción con cloruro de trifeniltetrazolio. Se tomaron fotos de los cortes cerebrales, las cuales fueron analizadas por el programa imageJ, midiendo el porcentaje de cerebro infartado en los cerebros tratados con cloruro de trifeniltetrazolio y la supervivencia celular por inmunohistoquímica de fluorescencia. Adicional a los objetivos planteados, se incorporó el análisis del nivel de N-acetil-O-glicosilación en proteínas, por inmunohistoquímica de fluorescencia con el anticuerpo RL2. Finalmente, el análisis estadístico de los datos se hizo por una prueba de Kruskal-Wallis y un post-análisis de comparación de Dunn. Obteniendo muy pocos resultados significativos, debido entre otras razones al tamaño de muestra reducido (n=3), teniendo en consideración que se trabajó con modelos animales. En conclusión, no se pudo confirmar el efecto citoprotector endógeno de la N-acetil-O-glicosilación por medio de la inhibición con 6-diazo-5-oxonorleucina. Sin embargo se encontraron tendencias que indican que la N-acetil-O-glicosilación es un mecanismo citoprotector endógeno ante situaciones de estrés como la isquemia, lo cual puede ser confirmado en investigaciones posteriores, si se puede contar con un mayor número de individuos por grupos.

Resultados: inmunohistoquímica (número promedio de neuronas): grupo F: 280,3; R: 278,7; B: 158,7; D: 205,3; Q: 107,0. Cloruro de trifeniltetrazolio (volumen de cerebro infartado mm³): grupo F: 0.0; D: 14.4; B: 30.3; Q: 26.5. RL2 (promedio de intensidad relativa de fluorescencia): Grupo F: 673662; R: 781324; B: 631421; D: 706326; Q: 665043. (media ±EEM, n=3, p<0.05).

Palabras claves: inmunohistoquímica, N-acetil-O-glicosilación, citoprotección endógena, supervivencia celular, volumen de cerebro infartado.

ABSTRACT

To evaluate the inhibition effect of N-acetyl-O-glucosamine glycosylation in brain of male *Wistar* rats after an ischemic event was used the following methodology: Inhibition of hexosamine pathway with 6-diazo-5-oxonorleucina there was produced a focal ischemic event, then the brain of the animal model is extracted, these were analyzed by fluorescence immunohistochemistry and staining with triphenyltetrazolium chloride. Photos of brain slices were taken, analyzed by ImageJ program, measuring the percentage of infarcted brain in brains treated with triphenyltetrazolium chloride staining and cell survival in fluorescence immunohistochemistry method. In addition to the objectives, was incorporated the analysis of the level of N-acetyl-O-glycosylation in protein by fluorescence immunohistochemistry with antibody RL2. Finally, statistical analysis of the data was made by Kruskal-Wallis test and post-test Dunn comparison. Getting very few significant results, among other reasons because of reduced sample size ($n = 3$), taking into consideration the work with animal models. In conclusion, it could not be confirm the cytoprotective effect of endogenous N-acetyl-O-glycosylation through inhibition with 6-diazo-5-oxonorleucina. However, trends indicate that the N-acetyl-O-glycosylation is an endogenous cytoprotective mechanism in situations of stress such as ischemia, which can be confirmed by further research, if there is the possibility of a large number of individuals per group.

Results: Immunohistochemistry (average number of neurons): Group F: 280.3; A: 278.7; B: 158.7; D: 205.3; Q: 107.0. Triphenyltetrazolium chloride (volume of infarcted brain mm³): Group F: 0.0; D: 14.4; B: 30.3; Q: 26.5. RL2 (mean relative fluorescence intensity): Group F: 673 662; R: 781 324; B: 631,421; D: 706,326; Q: 665043. (mean \pm SEM, $n = 3$, $p < 0.05$).

Keywords: immunohistochemistry, N-acetyl-O-glycosylation, endogenous cytoprotection, cell survival, volume of infarcted brain.

1. INTRODUCCIÓN

El accidente cerebro vascular (ACV) representa un problema de salud pública a nivel mundial y se ubica como la tercera causa de muerte por debajo de las enfermedades cardíacas y el cáncer. El cambio en el estilo de vida moderno, ha llevado a un aumento de las enfermedades crónicas no transmisibles como el ACV. Esta cuenta con una gran importancia clínica, ya que puede producir secuelas permanentes en los individuos que la padecen, afectando de manera sustancial su calidad de vida (Leiva, 2014), además de producir elevados costos en los servicios de salud. Actualmente el único tratamiento farmacológico aceptado por la FDA es el uso de trombolíticos, específicamente el activador tisular del plasminógeno (rtPA) el cual se debe administrar por vía intravenosa entre 3 y 4 horas después del evento isquémico para que sea efectivo. (Zarco, González, & Coral, 2008).

Un tipo particular de modificación postraduccional de proteínas, la N-acetil-O-glicosilación (O-GlcNAc) se muestra como un campo de investigación prometedor para encontrar solución a este problema, debido a que se ha reportado que el aumento de este tipo de glicosilación está ligado con la resistencia intrínseca de la célula a condiciones de estrés (Butkinaree, Park, & Hart, 2010). Los hallazgos relacionados con la glicosilación se han obtenido principalmente en cardiomiocitos de ratas (Dassanayaka & Jones, 2014). La evidencia indica que este tipo de glicosilación puede ser modificada por moléculas pequeñas como 6-diazo-5-oxonorleucina (DON) que actúa como inhibidor o la glucosamina que actúa como potenciador de la vía de modificación postraduccional.

Las investigaciones más recientes buscan avanzar en el entendimiento del mecanismo por el cual se lleva a cabo esta citoprotección en el cerebro de modelos animales, evaluando el grado de glicosilación de ciertas proteínas de interés cuando se produce un daño local. Hwang et al., (2010), muestra en su investigación que el tamaño del infarto cerebral en el modelo animal disminuye al ser tratadas con glucosamina, esto concuerda con lo encontrado en el grupo de investigación, sin embargo ambas investigaciones difieren en el estudio del mecanismo por el cual se cree que se da esta citoprotección en células cerebrales. (Rengifo, J., et al, 2014)

La N-acetil-O-Glicosilación (O-GlcNAc) se presenta como un campo de investigación prometedor para encontrar nuevas alternativas en el tratamiento del ACV (Butkinaree, Park, & Hart, 2010). Por lo tanto en este proyecto se evaluó este efecto citoprotector endógeno en las neuronas corticales de rata Wistar adultas, aumentando e inhibiendo la vía de O-GlcNAc con glucosamina y 6-diazo-5-oxonorleucina (DON) respectivamente.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1 Pregunta de investigación y justificación

En la realización de este proyecto se llevó a cabo un ensayo *in vivo* que inhibió y potenció la vía de glicosilación tipo O-GlcNAc en cerebro de ratas *wistar*, con el objetivo de evaluar la función citoprotectora endógena de la glicosilación de proteínas, ante un evento isquémico.

La N-acetil-O-glicosilación (O-GlcNAcilación), es un tipo de modificación post-traduccional que ocurre en las proteínas del núcleo y citoplasma de la célula y que cuando es añadido no se modifica a otras estructuras más complejas, estas características lo hacen único en comparación a otros tipos de glicosilación. Estudios recientes llevados a cabo en células de corazón de rata, han demostrado que existe una relación entre los niveles altos del enlace N-acetil-O-glucosamina (O-GlcNAc) en proteínas, con resistencia natural ante situaciones de estrés como la hipoxia. Sin embargo, el mecanismo por el cual se presenta este fenómeno aún no está claro y poco se ha estudiado su efecto en el cerebro (Jessica E Rexach, Peter M Clark, 2008). Por lo que este proyecto evaluó el efecto citoprotector de la O-GlcNAc en el cerebro de ratas *wistar*, tras un evento isquémico focal.

La enfermedad cerebrovascular tiene una alta prevalencia en la población colombiana, en casos graves suele ser letal y los individuos que logran sobrevivir quedan con secuelas como discapacidad mental, motora o del habla (Silva, Zarruk, Quintero, Arenas, & Silva, 2006). Las actuales estrategias están dirigidas a evitar los factores de riesgo asociado a la enfermedad cerebrovascular y los tratamientos farmacológicos aún están lejos de tener la eficacia deseada (Olga Lúcia Pedraza, Ricardo Díaz, Erick Sanchez P, 2007). La glicosilación tipo O-GlcNAc juega un papel importante en el cerebro. Nuevos estudios han identificado que este tipo de modificación en las proteínas es un mecanismo clave en las células para la regulación de la transcripción, comunicación neuronal y enfermedades neurodegenerativas. (Jessica E Rexach, Peter M Clark, 2008)

Por estas razones se han desarrollado herramientas tecnológicas para detectar y estudiar la O-GlcNAc de las proteínas, como el uso de marcadores quimioenzimáticos, cuantificación de los niveles de glicosilación por métodos de proteómica y moléculas pequeñas que funcionan como inhibidores de la glicosilación (Jessica E Rexach, Peter M Clark, 2008). En la realización de este proyecto se utilizó como estrategia para evaluar el efecto citoprotector de la O-GlcNAcilación, la inhibición de la ruta biosintética por la cual se obtiene este sustrato con DON. Utilizando la metodología de inmunohistoquímica de fluorescencia (IHQ) para medir la supervivencia celular y los niveles de

glicosilación, y la tinción con cloruro de trifenil tetrazolio (TTC) para medir el porcentaje de cerebro infartado, en cerebro de ratas Wistar adultas.

Este proyecto permitió profundizar en el entendimiento de los procesos fisiopatológicos en la isquemia cerebral, y el papel que juega el mecanismo de la O-GlcNación de proteínas celulares durante los periodos de isquemia y reperfusión cerebral. Entender estos mecanismos moleculares por los cuales las células desarrollan esta protección endógena, permitirá encontrar nuevas dianas farmacológicas que en el futuro puede desembocar en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para la lesión cerebrovascular en humanos.

2.2 Marco teórico y estado del arte

Según la organización mundial de la salud se define la enfermedad cerebrovascular (ECV) como: Toda afección neurológica focal o general, que puede causar incapacidad permanente o la muerte de forma súbita y que sea de origen vascular (OMS, 2005). La ECV actualmente representa un problema de salud pública a nivel mundial, debido a que es la tercera causa de muerte en América y Europa, después de la patología cardíaca y el cáncer, además se observa que usualmente si el paciente sobrevive a la ECV tiene gran probabilidad de quedar con importantes secuelas funcionales, lo que disminuye la calidad de vida y eleva el gasto económico. (Leiva, 2014)

En Colombia la ECV presenta una tasa de mortalidad de 300 personas cada 100.000 habitantes, la cual está por debajo de la escala mundial con 500-600 personas por cada 100.000 habitantes. Ubicándose como la tercera causa de muerte en el país, después de la violencia y las enfermedades cardíacas y una de las principales causas de discapacidad y pérdida de años saludables (Olga Lúcia Pedraza, Ricardo Díaz, Erick Sanchez P, 2007). Dentro de las estrategias que se aplican para reducir la frecuencia de las ECV, se destaca los estudios de los factores de riesgo, para la prevención de un evento isquémico cerebrovascular, sin embargo aún hoy en día no existe un medicamento capaz de revertir o evitar las secuelas que este produce. (Nuñez Figueredo et al., 2009).

El daño cerebral se produce al interrumpir el flujo sanguíneo, la falta de oxígeno y glucosa activa mecanismos de supervivencia que llevan a la muerte celular o apoptosis. Cuando el flujo se reduce a niveles por debajo de 10mL/100g/min, hay presencia de necrosis, esta zona se caracteriza por tener células muertas que no son recuperables, alrededor de la zona necrótica se encuentra la zona de penumbra la cual se caracteriza por presentar células con daños funcionales y con riesgo de necrosarse, sin embargo también tiene posibilidad de recuperar su funcionalidad, por lo tanto esta zona es la de mayor interés para aplicar estrategias farmacoterapéuticas que disminuyan el tamaño final de la zona infartada.

Es por esto que en la última década se ha dirigido la atención a estudiar los mecanismos moleculares por los cuales se produce la isquemia cerebral y la muerte neuronal, así como las estrategias de intervención farmacológicas, que permita, junto con las estrategias de prevención y tratamiento, disminuir la frecuencia con que se presenta la ECV y la discapacidad asociada a ella (Silva et al., 2006).

Esta atención por el estudio de los mecanismos moleculares se centra en la vía de glicosilación post-traducciona de las proteínas. Se ha encontrado que la glutamina induce citoprotección en células aislada de corazón de ratas, expuestas a

isquemia y reperfusión, por la vía de biosíntesis de las hexosaminas (HBP), incrementando el nivel del enlace O-GlcNAc en las proteínas. Sin embargo el mecanismo por el cual se da la citoprotección aún no está dilucidado. (J. Liu, Marchase, & Chatham, 2007).

Nuevas investigación establecen un importante papel de la O-GlcNAcilación en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer en un modelo murino; las cuales concluyen que existe una relación entre el mejoramiento en la condición clínica y el aumento del nivel de glicosilación en las proteínas (Borghgraef et al., 2013). Otros estudios demuestran la importancia de la O-GlcNAcilación en cerebro de ratones en etapa de desarrollo, silenciando los genes que codifican la O-GlcNAc transferasa (OGT), lo cual resulta en células madre embrionarias no viables, sugiriendo que la O-GlcNAcilación de las proteínas es necesaria para procesos esenciales en el crecimiento y desarrollo del cerebro, así como posiblemente para cualquier tipo de célula. (Shafi R, 2000)

Glicosilación tipo O-GlcNAc

La glicosilación tipo O-GlcNAc, es una modificación post-traducciona, que consiste en la unión de un azúcar al grupo hidroxilo de los residuos de serina y treonina en las proteínas. Este tipo de glicosilación tiene características únicas, dado que la mayoría de la glicosilación de proteínas ocurre en la superficie o dentro de los compartimentos del aparato excretor de la célula, en cambio la modificación O-GlcNAc ocurre en las proteínas presentes en el citoplasma y el núcleo. Las proteínas glicosiladas por esta vía están implicadas en procesos celulares tales como transcripción, ubiquitinación, ciclo celular y respuesta al estrés. Hasta el momento se han identificado dos proteínas encargadas de regular directamente el enlace O-GlcNAc, la OGT, que cataliza la adición del azúcar a la proteína y la β -N-acetilglucosaminidasa (O-GlcNAcasa u OGA), que cataliza la remoción del enlace O-GlcNAc. (Butkinaree, Park, & Hart, 2010)

La glucosamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT) regula la entrada de la glucosa a la HBP, se ha encontrado que la inhibición de esta enzima causa defectos en la adhesión y proliferación celular, además de disminuir los niveles de O-GlcNAc en las proteínas. Por lo tanto los investigadores han aprovechado estos hallazgos para estudiar el mecanismo de glicosilación ya sea aumentando o disminuyendo el flujo de adición del enlace O-GlcNAc a las proteínas, (aumentando la disponibilidad de la glucosamina, glucosa o glutamina o inhibiendo la enzima GFAT)(J. Liu et al., 2007).

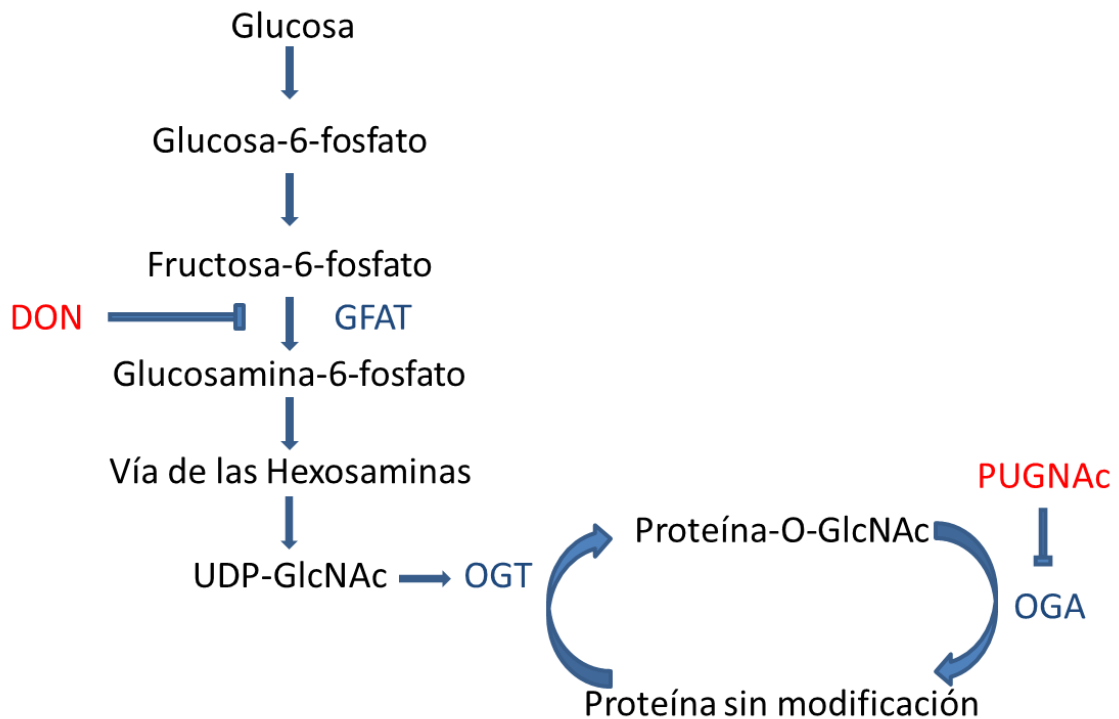


Figura 1. Inhibidores de la O-GlcNAcilación y su implicación en la HBP.

Según el órgano, aproximadamente el 5% de la glucosa intracelular pasa a la HBP. La primera reacción y paso limitante es la conversión de la fructosa-6-fosfato a glucosamina-6-fosfato, por la enzima GFAT, la cual se puede inhibir con 6-diazo-5-oxonorleucina (DON). Por medio de la HBP se obtiene la UDP-GlcNAc, la cual es el sustrato de la OGT, es decir, que si se inhibe la enzima GFAT disminuye la materia prima con la cual trabaja la enzima OGT que realiza la adición del enlace O-GlcNAc en las proteínas.(Dassanayaka & Jones, 2014)

La UDP-GlcNAc, producto de la HBP y sustrato de la OGT, es también usado como sustrato por muchas otras enzimas para la adición de N-acetil-glicanos implicados en la construcción de la membrana celular y como metabolito secundario clave usado por la célula para activar donadores de sustratos usados por las enzimas glicosil transferasas (Macauley & Vocadlo, 2010). Esto nos quiere decir que el efecto de la inhibición o aumento en los niveles de la glicosilación O-GlcNAc puede ser difícil de predecir debido a la perturbación en los niveles en varias proteínas glico-conjugadas además de los procesos celulares en los que participa y que aún no se han dilucidado.

El efecto inhibitor de la glicosilación con DON se verificó en cultivos de células HeLa, al encontrarse que disminuye los niveles de O-GlcNAc en las proteínas luego de un realizar un análisis por western Blot a diferentes tiempos (ver imagen 1). Por el contrario al inhibir la OGA (PUGNAc), se observa un aumento en los niveles de O-GlcNAc. Estas modificaciones al flujo de la O-GlcNAc se ha demostrado que tiene profundos efectos en la regulación del ciclo celular.(Slawson et al., 2005). Por ejemplo, se ha encontrado que las células con niveles bajos de O-GlcNAc tienen menor resistencia a condiciones de estrés.(Butkinaree et al., 2010)

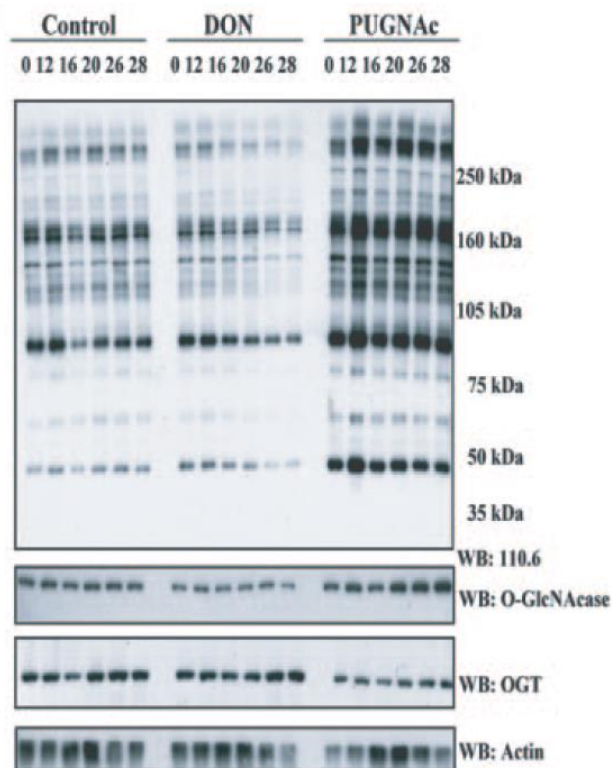


Imagen 1. Western Blot de células HeLa tratadas con DON y PUGNAc. Se puede observar que al inhibir la HBP con DON hay una disminución en el nivel de proteínas N-acetil-O-glicosiladas. Además la expresión de la enzima OGT se ve aumentada. De forma contraria sucede al inhibir la OGA con PUGNAc. Tomada de (Slawson et al., 2005)

En el presente proyecto se inhibió la vía de glicosilación, utilizando DON, en cerebros de modelos animales in vivo, a los cuales posteriormente se les indujo isquemia y reperusión. Esto con el fin de evaluar el efecto citoprotector endógeno de la O-GlcNAc de las proteínas en cerebro de ratas wistar.

2.3 Objetivos

Objetivo General

Demostrar que la glicosilación O-GlcNAc es un factor citoprotector endógeno en cerebro de ratas *Wistar*.

Objetivos específicos

- Estandarizar la metodología necesaria para la medición del porcentaje de supervivencia celular por medio del biomarcador NeuN, y la medición del volumen de cerebro infartado, por medio de tinción con cloruro de trifeniltetrazolio (TTC), en cerebro de ratas *Wistar* tras un evento isquémico.
- Medir el efecto de la inhibición de la glicosilación tipo O-GlcNAc en cerebro de ratas *Wistar* tras un evento isquémico.
- Establecer si la glicosilación O-GlcNAc es un factor de protección endógena de las células neuronales de ratas *Wistar*.

Indicadores

- Protocolo de los procedimientos para la observación, análisis e interpretación de los resultados de la medición de la supervivencia celular y del volumen de cerebro infartado.
- Volumen de cerebro infartado y número de neuronas detectadas (supervivencia celular) en cerebro de ratas *Wistar*, luego de un evento isquémico tras la inhibición de la glicosilación O-GlcNAc.
- Comparación del volumen de cerebro infartado y del número de neuronas (supervivencia celular) entre los cortes histológicos de cerebro de los modelos animales sin y con inhibición de la glicosilación O-GlcNAc.

2.4 Metodología Utilizada

Todas las actividades realizadas para el cumplimiento de este proyecto fueron basadas en el manual de buenas prácticas de laboratorio (World Health Organization 2009, Huber 2002, ICA 2007). El procedimiento experimental con los biomodelos (ratas *Wistar*) fue aprobado por el comité de ética de la Universidad Icesi y del Centro Internacional de Investigaciones Médicas (CIDEIM). La manipulación de los biomodelos se llevó de tal forma que se causara el mínimo sufrimiento y se utilizara el menor número posible de individuos, esto de acuerdo con la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud Nacional de Colombia y las guías del consejo Canadiense del Cuidado Animal (Olfert et al. 1993)

Para evaluar el efecto citoprotector endógeno de la O-GlcNAc, se optó por la medición del volumen de infarto, la supervivencia celular y el nivel de O-GlcNAcilación después de un evento isquémico, en cerebro de ratas *Wistar*, luego de usar DON como inhibidor y glucosamina como potenciador de la vía de glicosilación, como se muestra a continuación:

Modelos animales

Para este trabajo fueron usados como modelos animales ratas *Wistar* macho, con edad entre 14 a 18 meses de edad y entre 360 y 400 gramos. Criados en el bioterio de la Universidad ICESI.

Oclusión de la arteria cerebral media (MCAO)

Para la realización de la isquemia cerebral en los biomodelos se usó el modelo de la MCAO ya que es simple, replicable (Durukan & Tatlisumak 2007) e induce infarto de manera consistente en el caudoputamen lateral y corteza frontoparietal (Garcia et al. 1993). Primero se anestesia el biomodelo con isofluorano al 5% por medio de un vaporizador regulable (Stoelting Vaporizer Matrix VIP-3000), hasta notar ausencia de reflejos de dolor. Durante el procedimiento quirúrgico se varió la concentración de isofluorano administrado entre 1.5% y 3%. El biomodelo ya anestesiado es sujetado a una mesa quirúrgica y se le monitoriza la temperatura rectal (Physitemp BAT-12), presión arterial (IITC Rat and Mouse Blood Pressure Amplifier), frecuencia cardíaca y actividad respiratoria (electrodos Nubenco N-XY y sistema de adquisición de señales BIOPAC MP36) siendo los dos últimos los indicadores más importantes para la regulación del nivel de anestesia (Sicard & Fisher, 2009).

Para el procedimiento quirúrgico, este se debe hacer bajo microscopio quirúrgico y con los biomodelos en ayuno. Primero se les realiza una incisión longitudinal en la línea media del cuello, luego se separa la piel y el tejido del lado derecho del cuello. La isquemia se logra ocluyendo la arteria cerebral media (MCAO por sus siglas en inglés) con un filamento de nylon 4-0 (tratado con una solución de poli-l-

lisina al 0,1% en agua desionizada e incubado a 60°C por 60 minutos) que se introdujo hasta una longitud de 22 mm, desde una incisión en la arteria carótida externa, pasando por la arteria carótida interna, teniendo como referencia la bifurcación carotídea. Luego se cierra la herida quirúrgica con el extremo del nylon rebosando, dejando el tiempo especificado de isquemia; posteriormente se le retira y se deja el tiempo especificado de sobrevida, se permite el libre acceso de agua y alimento a los modelos animales luego de recuperarse de la anestesia. (Nuñez Figueredo et al., 2009).

Para retirar el cerebro de los biomodelos, se realiza perfusión transcardiaca. Primero se anestesia al individuo igual que en el procedimiento descrito anteriormente. Al verificar una anestesia profunda se inyecta 180 ml de solución salina al 0.9%, se decapita y se extrae el cerebro los cuales van destinados al análisis por TTC. Para los cerebros que fueron analizados por inmunohistoquímica de fluorescencia, adicionalmente a lo anterior se realizó perfusión con 180 ml de paraformaldehído-lisina-peryodato (PLP). Posteriormente se extrajo el encéfalo teniendo cuidado de no dañar su estructura (Gage et al. 2012).

Método de tinción con cloruro de trifeniltetrazolio (TTC)

Los biomodelos utilizados para el análisis mediante TTC fueron perfundidos con solución salina al 0,9%, con el objetivo de retirar la sangre del cerebro. Posteriormente se extrae el cerebro con cuidado de no deteriorarlo. Este se ubicó en una matriz de acrílico para ser seccionado en rodajas de aproximadamente 2mm de grosor, teniendo como límite de tiempo máximo 5 minutos para este procedimiento. Las secciones de cerebro obtenidas se pusieron en una caja de Petri con una solución de TTC al 0,1% y se incubó a 37°C por 90 minutos. Luego de la incubación las secciones son fijadas con formalina para posteriormente tomar las fotos en un estereoscopio Nikon, usando la cámara Nikon y el software NisElements F de Nikon. Las imágenes obtenidas fueron analizadas por el programa ImageJ que permitió medir el volumen de cerebro infartado. (F. Liu, Schafer, & McCullough, 2009). Las secciones finalmente fueron almacenadas en Formol al 4% tamponado y a 4°C.

Inmunohistoquímica de fluorescencia (IHQ)

Se utilizaron como biomarcadores el anticuerpo monoclonal NeuN (Clon A60; Millipore MAB377), el cual identifica proteínas específicas del núcleo de las neuronas, en el análisis con NeuN se cuenta el número de neuronas vivas en el tejido, el cual nos indica el porcentaje de supervivencia celular. El otro biomarcador utilizado es el RL2 (Santa Cruz Biotechnology), este se une al enlace O-GlcNAc de las proteínas que presenten esta modificación en cualquier tipo de célula en el cerebro, con el análisis de RL2 se obtiene la intensidad de la tinción, lo cual nos indica el nivel de glicosilación de proteínas en el cerebro.

Los modelos animales se decapitan, sus cerebros son extraídos cortados en tres secciones y mantenidos a 4°C en una solución de sacarosa al 30% y en solución de buffer fosfato salino 1X (PBS 1X). Posteriormente se realizan cortes histológicos cada 50µm de forma coronal en vibrátomo (Leica VT1000). Los cortes son preservados a -20°C en una solución anticongelante (PBS 1X, sacarosa 30% y etilenglicol 30%).

Al momento de llevar a cabo la incubación con los anticuerpos, se realizó el montaje de corte flotante para inmunohistoquímica de fluorescencia, se lavó la solución anticongelante de los cortes de cerebro con solución salina tamponada (PBS 1X) tres veces (5 minutos c/u), luego se permeabilizó en PBS más Tween20 al 0,5% (PBST) por 30 minutos en agitación constante. Posteriormente se hizo un proceso de bloqueo, con solución de albumina de suero bovino (BSA) al 1% en PBST durante 60 minutos a temperatura ambiente y en agitación constante. El bloqueador se retiró y sin lavar el tejido, se agregó 400 µL de solución de los dos anticuerpos primarios NeuN (conejo; dilución 1:1000) y RL2 (ratón dilución 1:400) y se incubó toda la noche a 4°C. Después la solución de anticuerpos primarios se retiró y cada corte se lavó tres veces en PBS durante cinco minutos. Luego y evitando la luz directa, se agregó una mezcla de anticuerpos secundarios (AlexaFluor488 anti-conejo y alexafluor555 anti-ratón ambos de Molecular Probes; 5 µg/ml) en PBST por 60 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Al término de los 60 minutos se retiró la solución de anticuerpos secundarios y se lavó las secciones de cerebro con PBS1X tres veces (5 minutos c/u). Posteriormente se incubó con DAPI (0.3 µM) por 15 minutos. Los cortes se colocan sobre un portaobjetos y se observan al microscopio de epifluorescencia NIKON, Se tomaron 5 fotos con aumento de 40X a cada una de las placas de la corteza cerebral marcadas con NeuN y RL2, las condiciones de exposición, ganancia e intensidad de la lámpara se mantienen iguales para todas las fotos con RL2. El análisis de las imágenes y obtención de los datos se realizó con el software ImageJ (Schneider et al. 2012). Durante el proceso se manejan controles negativos, los cuales reciben todo el tratamiento sin la adición del anticuerpo, ya sea primario o secundario.(Fudong Liu, Schafer, & McCullough, 2009)

Diseño experimental (IHQ)

Los modelos animales se separaron en 5 grupos (n=3) F, R, B, D y Q con los siguientes tratamientos (tabla 1): Todos los grupos tuvieron 6 horas de sobrevida, es decir, pasaron aproximadamente 6 horas desde el inicio de la MCAO hasta la extracción del cerebro al biomodelo. El grupo F es el grupo control sin isquemia (SHAM), a los individuos de este grupo se les practicó todo el procedimiento de la MCAO pero sin la obstrucción con el filamento, 30 minutos después de realizada la operación se les inyectó solución salina al 0.9% (placebo) por vía intraperitoneal. El grupo R fue tratado con el inhibidor DON 24 horas antes (inyección en el ventrículo lateral derecho; diluido en 10ml de líquido cefaloraquídeo a una concentración de 5 mM. Coordenadas: Anterior-Posterior

(AP) = -1.0 mm, MedioLateral (ML) = -2.4 mm y DorsoVentral (DV) = 4.0 mm) de la MCAO sin producir isquemia. El grupo B (control con isquemia), tuvo 90 minutos de isquemia sin ningún otro tratamiento. El grupo D tuvo 90 minutos de isquemia y 30 minutos luego fue tratado con 200mg/Kg de glucosamina (GlcNAc), inyectados intraperitonealmente. El grupo Q fue tratado con el inhibidor DON 24 horas antes de inducir el evento isquémico el cual duró 90 minutos.

Tratamiento	F	R	B	D	Q
Isquemia (90 min)	-	-	+	+	+
<u>GlcNAc</u>	-	-	-	+	-
DON	-	+	-	-	+
Sobrevida (horas)	6	6	6	6	6
comparaciones de interés	└──┬──┘		└──┬──┬──┘		

Tabla 1. Grupos de estudio en el diseño experimental, sus respectivos tratamientos y las comparaciones de interés (experimento aleatorizado, n=3)

Diseño experimental (TTC)

Los modelos animales se separaron en 4 grupos (n=3) F, B, D y Q con los siguientes tratamientos (tabla 2): Todos los grupos tuvieron 36 horas de supervivencia, es decir, pasaron aproximadamente 36 horas desde el inicio de la MCAO hasta la extracción del cerebro al biomodelo. El grupo F es el grupo control sin isquemia (SHAM), 30 minutos después de realizada la operación se les inyectó solución salina al 0.9% (placebo) por vía intraperitoneal. El grupo B (control con isquemia), tuvo 90 minutos de isquemia sin ningún otro tratamiento. El grupo D tuvo 90 minutos de isquemia y 30 minutos luego fue tratado con 200mg/Kg de glucosamina. El grupo Q fue tratado con el inhibidor DON 24 horas antes de inducir el evento isquémico el cual duró 90 minutos.

Tratamiento	F	B	D	Q
Isquemia (90 min)	-	+	+	+
GlcNAc	-	-	+	-
DON	-	-	-	+
Sobrevida (horas)	36	36	36	36

Tabla 2. Grupos de estudio en el diseño experimental y sus respectivos tratamientos (experimento aleatorizado, n=3)

Análisis estadístico

En este trabajo la unidad experimental fue cada biomodelo y la unidad de medida fue cada foto. La variable independiente fue cada uno de los grupos con su tratamiento (tiempo de isquemia cerebral focal y la aplicación o no del tratamiento con glucosamina o DON). Las variables dependientes son los resultados de las pruebas neurológicas, la intensidad de fluorescencia de O-GlcNAcilación (RL2), el número de neuronas por imagen (NeuN) y el porcentaje de cerebro infartado (TTC). Los datos se analizaron mediante una prueba de análisis de varianza (ANOVA) no paramétrica de Kruskal-Wallis (post-test de comparación múltiple de Dunn), que permite comparar variables independientes sin exigentes supuestos de normalidad en los datos para las pruebas paramétricas, debido al bajo número de individuos por grupo que se manejó en este proyecto (3). Se utilizó un intervalo de confianza del 95% en todos los análisis. El software que se usó para el análisis de los datos fue GraphPad Prims versión 5.01.

Hipótesis TTC

H₀= La inhibición farmacológica de la vía de biosíntesis de las hexosaminas con DON, no produce cambios en el porcentaje de cerebro infartado en ratas sometidas a isquemia cerebral.

H_a= La inhibición farmacológica de la vía de biosíntesis de las hexosaminas con DON, produce un aumento en el porcentaje de cerebro infartado en ratas sometidas a isquemia cerebral.

Hipótesis IHQ

NeuN

H₀= La inhibición farmacológica de la vía de biosíntesis de las hexosaminas con DON, no produce cambios en el número de neuronas vivas en ratas sometidas a isquemia cerebral.

H_a= La inhibición farmacológica de la vía de biosíntesis de las hexosaminas con DON, produce una disminución en el número de neuronas vivas en ratas sometidas a isquemia cerebral.

RL2

H₀= La inhibición farmacológica de la vía de biosíntesis de las hexosaminas con DON, no produce cambios en la señal de O-GlcNAcilación en ratas sometidas a isquemia cerebral.

H_a= La inhibición farmacológica de la vía de biosíntesis de las hexosaminas con DON, produce disminución en la señal de O-GlcNAcilación en ratas sometidas a isquemia cerebral.

Marco lógico

Objetivo General: Demostrar que la glicosilación O-GlcNAc es un factor citoprotector endógeno en cerebro de ratas wistar.			
Objetivos específicos	Actividades	Supuestos	Indicadores
Estandarizar la metodología necesaria para la medición del porcentaje de supervivencia celular por medio del biomarcador NeuN, y la medición del volumen de cerebro infartado, por medio de tinción con cloruro de trifeniltetrazolio (TTC), en cerebro de ratas wistar tras un evento isquémico.	<ul style="list-style-type: none"> - Corte en vibrátomo de los cerebros de los modelos animales. - Preparación de las soluciones a utilizar en cada técnica. - Realizar el montaje para inmunohistoquímica de fluorescencia por corte flotante. - Uso del anticuerpo primario, secundario y del TTC a diferentes concentraciones, según lo recomendado por el fabricante. - Implementar controles negativos y positivos para garantizar la especificidad del anticuerpo (para NeuN). - Incubación de los cortes histológicos de cerebro según lo indicado por el fabricante (para TTC). - Observación al microscopio de epifluorescencia (para NeuN). - Toma de fotografías digitales para la medición de la intensidad de la tinción por medio del programa imageJ. 	<ul style="list-style-type: none"> - Disponibilidad de los equipos y reactivos. - Los cortes se realizan en las áreas donde se inhibió la glicosilación y donde se indujo el evento isquémico. 	Protocolo de los procedimientos para la observación, análisis e interpretación de los resultados de la medición de la supervivencia celular y el volumen de cerebro infartado.
-Medir el efecto de la	- Obtención de los cerebros	Aprobación del	Volumen de

<p>inhibición de la glicosilación tipo O-GlcNAc en cerebro de ratas wistar tras un evento isquémico.</p>	<p>de los modelos animales, sin y con inhibición de la vía de glicosilación O-GlcNAc, (grupo control y muestra respectivamente), tras un evento isquémico.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Realizar los cortes histológicos a los cerebros de los modelos animales. - Realizar la tinción a los cortes de cerebro de los modelos animales utilizando TTC y NeuN. - Medir el volumen de cerebro infartado y porcentaje de supervivencia celular en cerebro de ratas wistar. Para lo cual se utiliza el programa imageJ. 	<p>comité de ética.</p> <p>Disponibilidad de equipos y reactivos.</p> <p>Los cortes se realizan en las áreas donde se inhibió la glicosilación y donde se indujo el evento isquémico.</p>	<p>cerebro infartado y porcentaje de supervivencia celular en cerebro de ratas wistar, luego de un evento isquémico tras la inhibición de la glicosilación O-GlcNAc.</p>
<p>Determinar si la glicosilación O-GlcNAc es un factor de protección endógena de las células neuronales de ratas wistar.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Comparación del volumen de cerebro infartado luego de un evento isquémico, del grupo control versus el grupo de inhibición. - Comparación de la supervivencia celular luego de un evento isquémico, del grupo control versus el grupo de inhibición. - Análisis estadístico por medio de la prueba T student si los datos presentan distribución normal. 	<ul style="list-style-type: none"> - todos los procedimientos para la obtención de resultados se plantearon y realizaron correctamente. 	<p>Comparación de la supervivencia celular y volumen de cerebro infartado, entre los cortes histológicos de cerebro de los modelos animales del grupo control contra el grupo de inhibición, por medio de la prueba T student.</p>

2.5 Resultados

Tinción con TTC

La tinción con TTC es comúnmente utilizada para medir la viabilidad celular en un tejido animal. Las sales de tetrazolio tienen la propiedad de actuar como aceptor de protones y son reducidas por las enzimas deshidrogenasas para formar pigmentos insolubles de formazan (Ferrera, Benhabbouche, Bopassa, & Li, 2009), por lo tanto solo las células viables son teñidas de color rojo. Cuando este reactivo se usa en cortes de cerebro, las zonas blancas corresponden al tejido muerto o infartado (imagen 2). Aunque se debe tener la precaución de no tomar las zonas de proyecciones axónicas como zonas de infarto, como se puede observar en la imagen 1 a), que es el grupo control sin isquemia y por tanto sin infarto cerebral. En el proceso isquémico, el tejido afectado siempre va acompañado de una respuesta inflamatoria la cual interfiere con una medición confiable del volumen del tejido. En el modelo de isquemia cerebral usado (MCAO), se ha diseñado de tal forma que la isquemia se genere en el hemisferio derecho. Por lo tanto para calcular el porcentaje de cerebro infartado, se mide el volumen del hemisferio derecho (no infartado) y a este se le resta el volumen de tejido rojo o vivo en el hemisferio izquierdo (infartado). Esta resta da como resultado el volumen de cerebro que presentó isquemia. Luego se presentan estos volúmenes en forma de porcentajes promedio de cerebro infartado (gráfica 1).

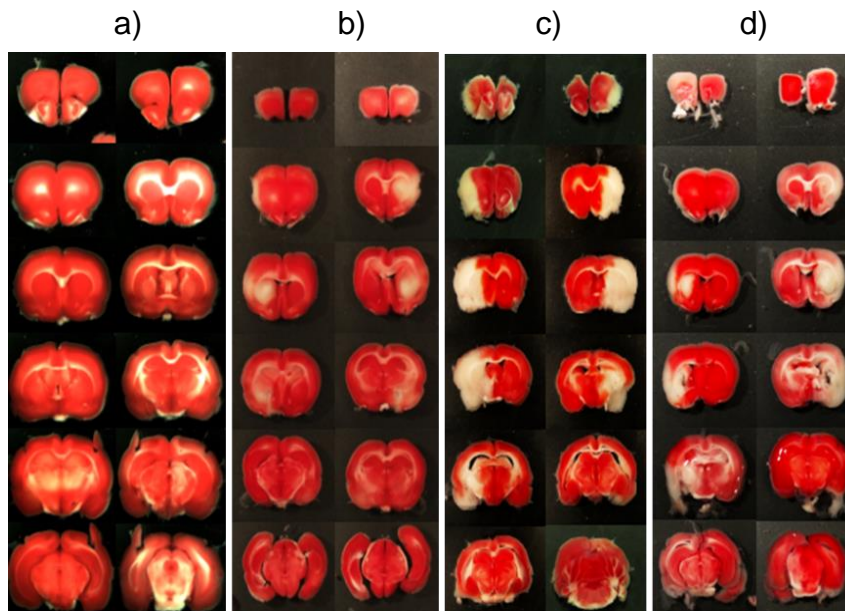
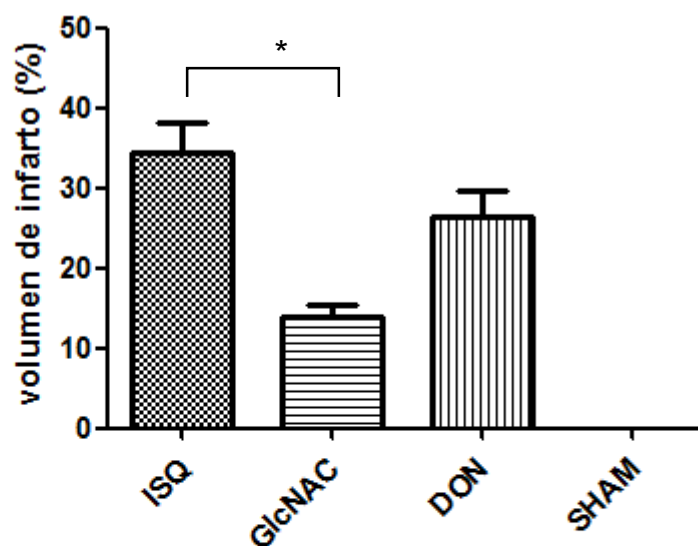


Imagen 2. Imágenes representativas de cada grupo: a) SHAM; b) Gluc; c) DON; d) Control. La primera columna muestra el lado anterior de cada corte y la segunda el posterior.



Tratamiento	B	D	Q	F
Isquemia (90 min)	+	+	+	-
GlcNAc	-	+	-	-
DON	-	-	+	-
Sobrevida (horas)	36	36	36	36

Gráfica 1. Gráfica 1. Resultados para la tinción con TTC. ISQ: 34.4%±3,9; GlcNAc: 13.8%±1,6; DON: 26.5%±3,1; SHAM: 0.0%±0,0. (media ±EEM, n=3, p<0.05). El grupo SHAM (F) es excluido del análisis estadístico de los datos. Existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos B y D (ver tabla 3). Se puede observar una diferencia entre el grupo D y Q, sin embargo esta no es estadísticamente significativa (media ±EEM, n=3, p<0.05).

Se puede observar que el promedio de tejido infartado es mayor para el grupo con isquemia sin tratamientos (B). En el grupo SHAM (Grupo F) no se evidencia infarto. Aunque se esperaba que el grupo con DON presentara mayor volumen de infarto, este presentó el segundo mayor volumen después del grupo B. Finalmente el grupo tratado con glucosamina (grupo D) presenta un volumen de infarto de cerca de 14%, que es estadísticamente diferente solo al grupo B (ver tabla 3).

Prueba de comparación múltiple de Dunn	P < 0.05
ISQ vs GlcNAC	Si
ISQ vs DON	No
GlcNAC vs DON	No

Tabla 3. Resultados del análisis estadístico para TTC.

Inmunohistoquímica de fluorescencia (NeuN)

El anticuerpo monoclonal A60 reconoce una proteína neuro-específica del sistema nervioso vertebrado llamada NeuN (*Neuronal Nuclei*). La expresión de NeuN se observa en la mayoría de las células neuronales en ratones adultos (Mullen, Buck, & Smith, 1992). Por lo tanto con el análisis de NeuN se excluyen todo tipo de células gliales. En el escrutinio del número de neuronas se utilizaron ciertos criterios de exclusión, basados en la forma y el tamaño de las neuronas, se descartaba algún tipo de suciedad o unión inespecífica que pudiera haber afectado el conteo y que brillara lo suficiente para pasar los filtros del programa imageJ que se utilizó para el análisis de las imágenes. Aplicando estos criterios en el análisis de todas la imágenes. Los resultados se observan en la gráfica 2.

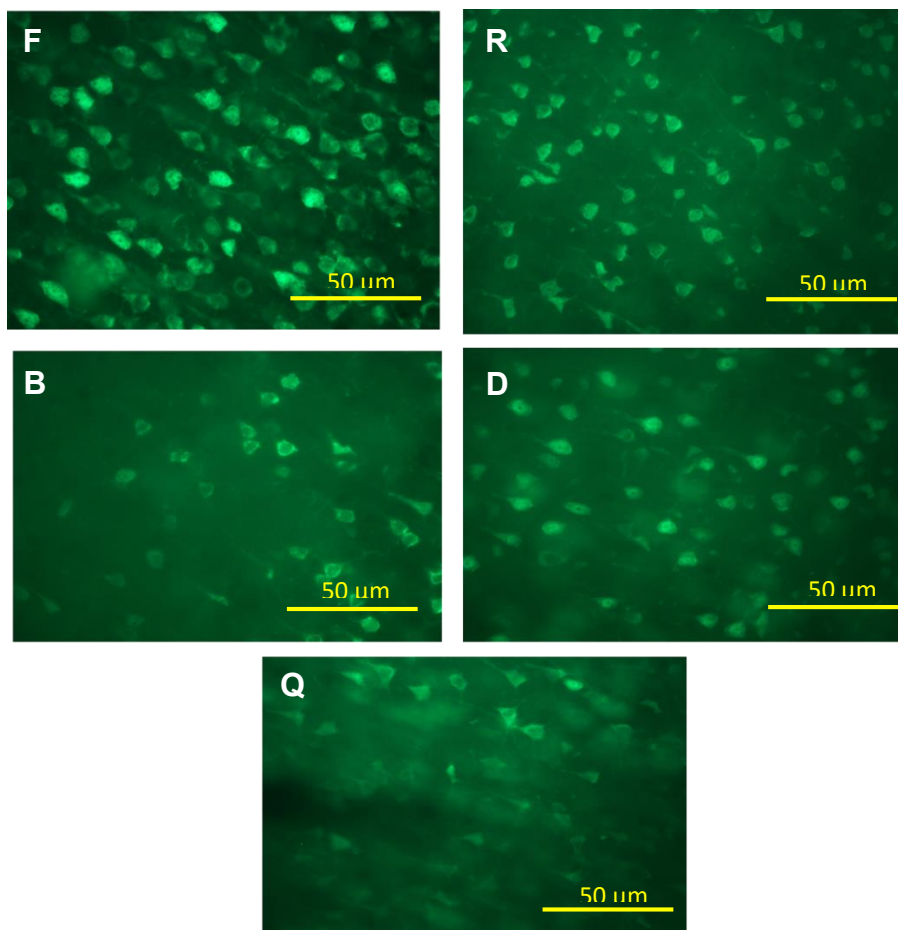
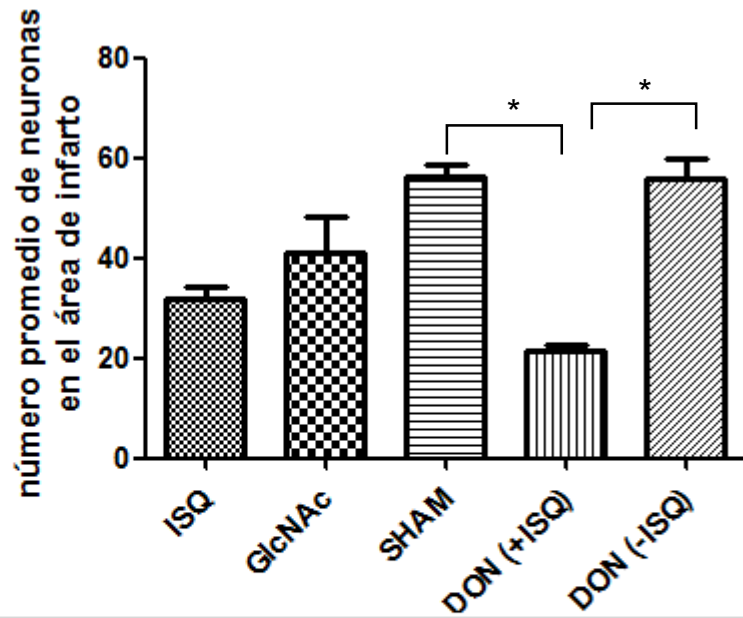


Imagen 3. Imágenes representativas de cada grupo. Tomadas con un aumento de 40X.



Tratamiento	B	D	F	Q	R
Isquemia (90 min)	+	+	-	+	-
GlcNAc	-	+	-	-	-
DON	-	-	-	+	+
Sobrevida (horas)	6	6	6	6	6

Gráfica 2. Supervivencia celular medido en número de neuronas promedio. Grupo B: 31.7±2,7; D: 41.1±7,1; F: 56.1±2,7; Q: 21.4±1,4; R: 55.7±4,2. (media ±EEM, n=3, p<0.05).

Se observa una marcada disminución del número de neuronas promedio entre los grupos de isquemia (B, D y Q) comparados con los grupos controles (F y R). El grupo D presentó un promedio mayor que el grupo Q y B, lo cual es un resultado esperado. El grupo Q presentó el menor promedio de neuronas entre todos los grupos, siendo estadísticamente diferente comparado contra los grupos F y R (ver tabla 4).

Prueba de comparación múltiple de Dunn	P < 0.05
ISQ vs GlcNAc	No
ISQ vs SHAM	No
ISQ vs DON (+ISQ)	No
ISQ vs DON (-ISQ)	No
GlcNAc vs SHAM	No
GlcNAc vs DON (+ISQ)	No
GlcNAc vs DON (-ISQ)	No
SHAM vs DON (+ISQ)	Si
SHAM vs DON (-ISQ)	No
DON (+ISQ) vs DON (-ISQ)	Si

Tabla 4. Resultados del análisis estadístico para NeuN.

Inmunohistoquímica de fluorescencia (RL2)

El anticuerpo monoclonal RL2 reconoce un epítipo en las proteínas que contienen el enlace O-GlcNAc (Santa Cruz Biotechnology, Inc, 2016). Este anticuerpo no es específico para un tipo de célula cerebral, por lo que se teñirán tanto neuronas como otros tipos celulares (por ejemplo células gliales). En el análisis con RL2 se mide la intensidad de la fluorescencia de las células teñidas, para esto, se utilizaron ciertos criterios de exclusión, basados en la forma y el tamaño de las células, se descartaba algún tipo de suciedad o unión inespecífica que pudiera haber afectado la medición y que brillara lo suficiente para pasar los filtros del programa imageJ con el cual se analizaron las imágenes. Aplicando estos criterios en el análisis de todas la imágenes. Los resultados se observan en la gráfica 3.

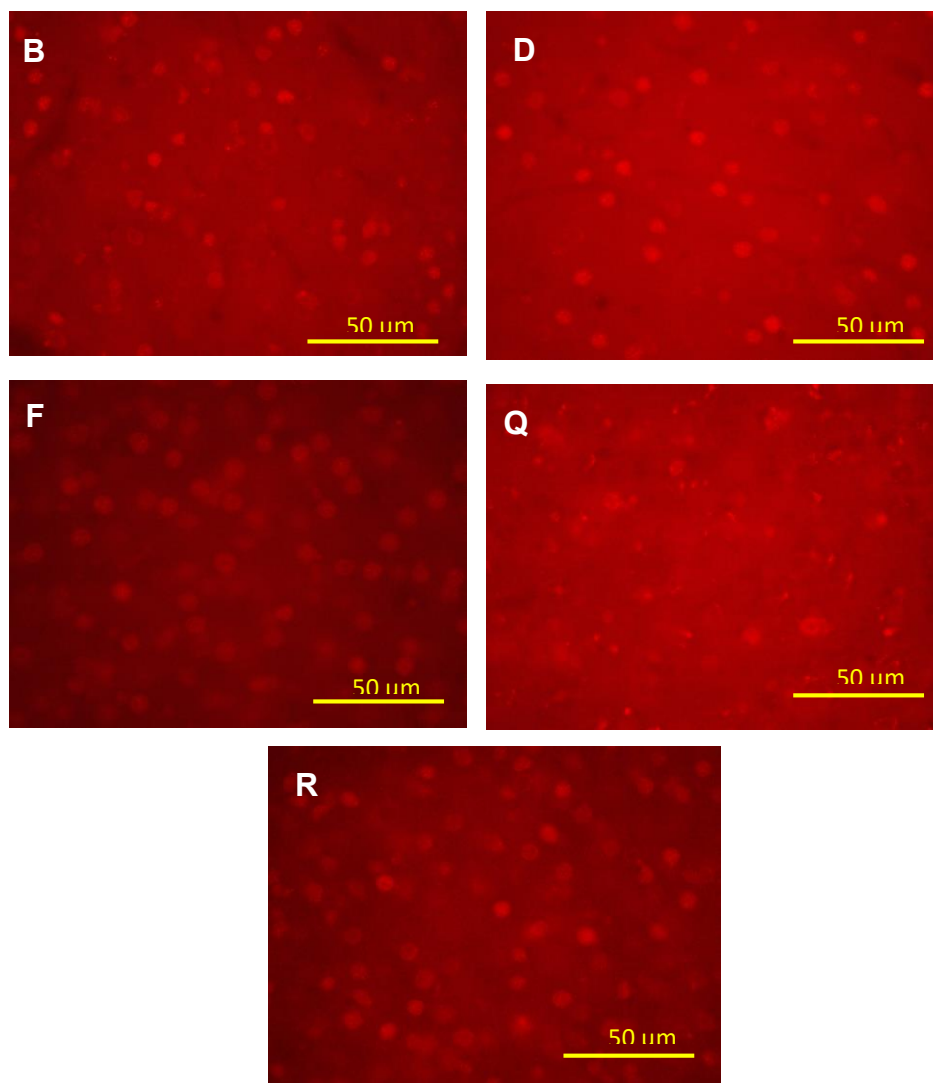
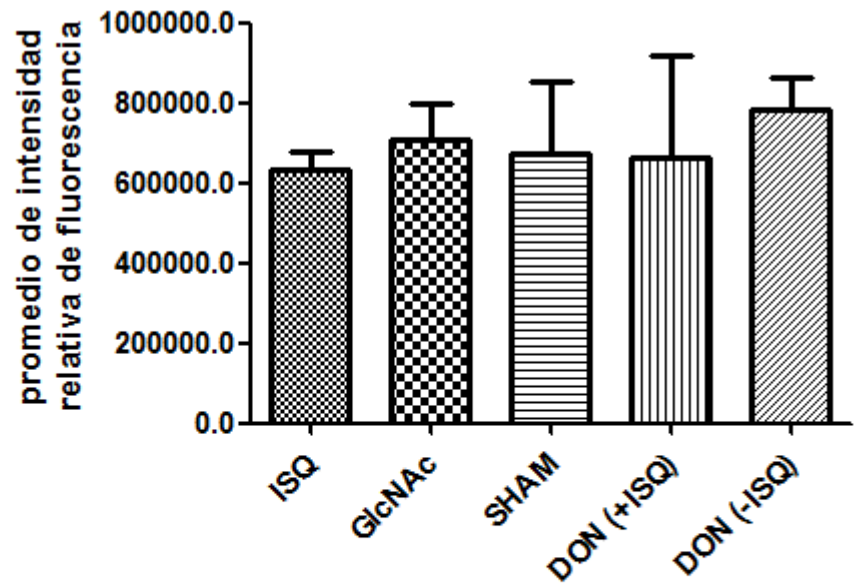


Imagen 4. Imágenes representativas de cada grupo. Tomadas con un aumento de 40X.

En la Imagen 4 se puede observar como en los grupos a los cuales no se les realizó isquemia (Grupos F y R) presentan una alta densidad de células marcadas con RL2. Por otra parte, los grupos sometidos a isquemia (grupos B, D y Q) presentan una disminución de células marcadas en el área de infarto, siendo este efecto más notable en la imagen del grupo Q (con inhibición de la O-GlcNAcilación). También puede notarse que la relación señal ruido de las imágenes es bajo, en otras palabras, el contraste entre las células marcadas y el fondo es bajo, lo que dificulta la toma de las fotos y el análisis de las imágenes.



Tratamiento	B	D	F	Q	R
Isquemia (90 min)	+	+	-	+	-
GlcNAc	-	+	-	-	-
DON	-	-	-	+	+
Sobrevida (horas)	6	6	6	6	6

Gráfica 3. Niveles de O-GlcNAc medido en intensidad promedio (no tiene unidad de medida). Grupo B: 631421±47628; D: 706326±93429; F: 673662±181737; Q: 665043±251400; R: 781324±83666. (media ±EEM, n=3, p<0.05).

Se observa que los promedios entre los grupos no varían mucho, todos los grupos presentan barras de error grandes, lo que indica alta variabilidad en cada grupo. Ninguna comparación resultó ser estadísticamente significativa (ver tabla 5).

Prueba de comparación múltiple de Dunn	P < 0.05
F vs R	No
F vs B	No
F vs D	No
F vs Q	No
R vs B	No
R vs D	No
R vs Q	No
B vs D	No
B vs Q	No
D vs Q	No

Tabla 5. resultados del análisis estadístico para RL2.

2.6 Discusión

Evaluación volumétrica por TTC

En el análisis del porcentaje de cerebro infartado por el método de tinción con TTC, se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control de isquemia (B: 34.4%) y el grupo tratado con glucosamina (D: 13.8%), este es un resultado esperado debido a que en el tratamiento con glucosamina se aumentan los niveles de O-GlcNAcilación de las proteínas, lo cual está asociado con un mecanismo citoprotector endógeno de las células ante situaciones de estrés como un evento isquémico (Champattanachai, Marchase, & Chatham, 2007). Las comparaciones entre los demás grupos no resultaron diferentes, sin embargo se puede observar una tendencia hacia la disminución del porcentaje de isquemia del grupo D comparado contra el grupo con inhibición (Q: 26.5%). Debe notarse que el grupo SHAM (F), da como resultado un porcentaje de isquemia de cero (0.0%), indicando que el procedimiento quirúrgico (anestesia y cirugía) no tiene incidencia en el tamaño del infarto y que los volúmenes de infarto medidos solo se deben a la oclusión de la arteria cerebral media cuando se insertó el monofilamento de manera adecuada.

Al comparar los grupos B y Q se observa que el promedio de infarto para el Q es menor que para el B, aunque no estadísticamente significativo. De acuerdo con la literatura (Champattanachai et al., 2007; J. Liu et al., 2007), se espera que el grupo con isquemia y tratados con DON (grupo Q) presentara un mayor tamaño de infarto respecto al grupo con isquemia pero sin tratamiento con DON (Grupo B). Lo anterior es debido a que este compuesto (DON) es un inhibidor de la GFAT, enzima involucrada en la vía biosintética de las hexosaminas que da como producto el UDP-GlcNAc, sustrato indispensable para la modificación postraducciona de la glicosilación tipo O-GlcNAc (ver figura 1). Aumentos en este tipo de glicosilación, se ha relacionado con aumento en la supervivencia celular de células sometidas a isquemia reperusión (Champattanachai et al., 2007). Por tanto se esperaría que la inhibición de esta vía se relacionara con aumento en tamaño de infarto al disminuir la supervivencia celular.

En relación a lo anterior, se observa que el grupo con glucosamina presentó un promedio de infarto menor que el grupo con DON como se esperaría, pero la diferencia entre estos grupos no fue estadísticamente significativa. Es posible que este resultado sea debido a que el número de individuos por grupo (n=3) es muy pequeño, por lo que la variabilidad total por grupo es grande, como se puede observar en las barras de error en la Gráfica 1. Puede ser que al aumentar el número de individuos por grupo, dicha comparación se torne significativa. Otro factor cuyo resultado puede verse afectado por el tamaño de la muestra es la magnitud del efecto citoprotector endógeno de la O-GlcNAcilación. Aunque los resultados del grupo D (con isquemia y tratado con Glucosamina) presenta

diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo B (grupo con isquemia) es posible que esta diferencia sea mayor, ya que el estrés celular producido por la isquemia puede estar aumentando los niveles de glicosilación en cerebros de ratón en las primeras horas (Shi et al., 2015), el tratamiento con glucosamina en otros tipos de tejidos (cardiomocitos) eleva dichos niveles aún más aumentando el porcentaje de supervivencia de células cardíacas, aunque dichos estudios se hayan realizado *in vitro* (Champattanachai et al., 2007).

Otra posible explicación para los resultados obtenidos es que el lugar de inhibición con DON en la vía de las hexosaminas se encuentre muy arriba de la vía y por otro punto esté entrando los compuestos requeridos para la formación del sustrato UDP-GlcNAc (figura 1) (Dassanayaka & Jones, 2014; Laczy et al., 2009) y por tanto dicha inhibición no sea fuerte.

Evaluación del número de neuronas mediante el marcador NeuN

En el análisis de la supervivencia neuronal por el método de Inmunohistoquímica usando el marcador neuronal NeuN, se obtuvo que entre el grupo Q (DON más isquemia; 21.4) y el grupo F (SHAM; 56.1) diferencias en el número de neuronas promedio en el área infartada. Similar situación se observó entre el grupo Q y el grupo R (DON sin isquemia; 55.7). Estos resultados eran esperados (diferencias entre los grupos sin isquemia (F, R) y el grupo con isquemia y DON (Q)) ya que el DON es un compuesto que inhibe la vía biosintética de las hexosaminas y por ende disminuye los niveles de glicosilación. Como se ha expuesto anteriormente, aumentos en los niveles de glicosilación se ha relacionado con aumento en la supervivencia celular en cardiomiocitos expuesto a eventos de isquemia reperusión (Champattanachai et al., 2007), por lo que es posible que la inhibición de la vía biosintética de las hexosaminas se relacione con disminución en los niveles de glicosilación y por ende con disminución en la supervivencia celular.

A pesar de lo mencionado anteriormente, y que los promedios de neuronas en el grupo B (con isquemia) era mayor que el grupo de interés Q (tratado con DON) pero sin ser estadísticamente significativo, no se puede confirmar certeramente que la inhibición de la glicosilación esté relacionada con una disminución en las neuronas expuestas a isquemia cerebral. Lo anterior puede estar relacionado con el número de individuos por grupo (n=3) como se expuso anteriormente. Es posible que al aumentar el número de individuos por grupo estas diferencias en los promedios de neuronas en el área infartada se torne significativa. Dado esto, queda por confirmar el efecto de la inhibición de la O-GlcNAcilación con DON.

Existen otras comparaciones que si bien no son estadísticamente significativas, se puede observar una tendencia (dado que las barras de EEM de estos grupos no se sobrelapan) como es el caso para la diferencia en promedio del número de neuronas entre el grupo D y Q. Ambos fueron sometidos a isquemia, el grupo D fue tratado con glucosamina (41.1 ± 7.1), mientras que el grupo Q fue tratado con

DON y sometido a isquemia (21.4 ± 1.4). Estos grupos tuvieron tratamientos opuestos: El DON para reducir la glicosilación tipo O-GlcNAc, mientras que la glucosamina para aumentarla. A pesar de esto, no se observó las diferencias esperadas en esta comparación. Es posible que a pesar de haberse evaluado 5 fotos de la corteza por individuo de cada grupo, estos conteos aún sean insuficiente en cuanto a mostrar si hay o no una diferencia real. Esto porque de un volumen total de infarto, solo se está realizando el conteo en una sección de 50 μm , además el infarto causado no es homogéneo, ya que en un mismo corte se hallaron regiones con y sin marcación de neuronas en el área evaluada (corteza), en los grupos con isquemia.

Por otro lado los grupos F y R presentan un promedio casi igual de número de neuronas (56.1 y 55.7 respectivamente). Y se muestran superiores a los demás tratamientos. Esto nos indica dos cosas: primero, que todo el procedimiento quirúrgico (anestesia, disección, etc.) antes de la obstrucción con el filamento que produce la isquemia, no influye en la supervivencia celular y segundo que el inhibidor DON y el procedimiento de inyección, no causan daño o disminución de la supervivencia celular cuando el tejido no ha sido expuesto a eventos de isquemia.

Uno de los factores a considerar en el análisis con NeuN es que las fotos fueron tomadas con un aumento de 40X, y aunque se trató de abarcar la mayor área posible de la corteza cerebral tomando 5 fotos por individuo, solo se obtiene el resultado de un área representativa, dejando por fuera el conteo de muchas neuronas, además de contar con un número reducido de individuos por grupo. Estos factores pueden ser decisivos a la hora de encontrar diferencias significativas o no.

Evaluación de los niveles de Glicosilación O-GlcNAc mediante el marcador RL2

En el análisis de los niveles de glicosilación por el método de Inmunohistoquímica se observó que no había diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos utilizando el marcador de glicosilación tipo O-GlcNAc RL2. Es apreciable como los resultados están acompañados de una alta variabilidad como lo indican las barras de EEM (gráfica 3), por lo que no se puede hablar de ninguna tendencia. Sin embargo en la imagen 4, se observa a simple vista diferencias en la intensidad de la tinción (por ejemplo entre el grupo D y F), pero también se observa una relación señal ruido baja en las imágenes que presentan mayor intensidad. Es importante resaltar que para la obtención de estas imágenes se ensayaron diferentes concentraciones de anticuerpo con el objetivo de optimizar esta relación señal ruido, usando diluciones del anticuerpo que van desde 1:50 hasta 1:1000, optando por la dilución de 1:400 que presentó el mejor contraste entre la marcación de las células y el fondo. A pesar de esto la observación por el objetivo del microscopio de epifluorescencia se dificultó mucho, solo fue posible

observar las células cuando se tomaron las imágenes mediante el software NIS-Element, manejando tiempos de exposición (1 segundo) y ganancia altos (8X), así como la intensidad de la lámpara al máximo. De esta manera, estos parámetros ayudan a visualizar en el monitor del computador la fluorescencia de los diferentes cortes, pero como se mencionó anteriormente con una relación señal ruido muy baja.

En observación de tinciones con RL2 hechas en trabajos anteriores del grupo de investigación de la Universidad ICESI (Cardozo Hernández, Rengifo Gómez, & Castro Herrera, 2014), se encontró que las células en estas placas si son observables y tienen un alto contraste, sin embargo el anticuerpo utilizado para esas tinciones fue de diferente marca (Thermo Scientific MA1-072) al referenciado en este trabajo (Santa Cruz Biotechnology). Lo anterior sumado a los problemas que surgieron durante el análisis de los niveles de glicosilación con RL2 sugiere que la marca del anticuerpo utilizado para este proyecto no es el óptimo para el análisis por el método de IHQ, aunque en la ficha técnica del anticuerpo se especifique que si sirve para dicho propósito (Santa Cruz Biotechnology, Inc, 2016) .

Adicional, como se ha mencionado anteriormente, el reducido número de individuos por grupo y el aumento con el que se tomaron las fotos influyen en la obtención de resultados no significativos, sumado a esto la magnitud de la señal que se quiere identificar (aumento de la O-GlcNAcilación de proteínas), puede no ser muy grande, ya que otras investigaciones han reportado que el tratamiento con glucosamina tiene un aumento en los niveles de glicosilación, pero esto evaluado mediante la técnica de Western Blot (Macaulay & Vocadlo, 2010). En relación a lo anterior, el anticuerpo mencionado anteriormente (santa Cruz Biotechnology), ha funcionado de manera adecuada pero para la realización de la técnica de Western Blot por parte del grupo de investigación de la Universidad ICESI (Viveros Araque, Rengifo Gómez, & Vera Gonzales, 2014) .Esto puede apoyar lo mencionado anteriormente de que este anticuerpo puede no ser óptimo para la técnica de inmunohistoquímica.

En investigaciones más recientes (2015) Shi et al, hallaron que los niveles de O-GlcNAc en la corteza cerebral de ratón, aumentaban rápidamente 1 hora después de la MCAO, sin embargo estos niveles bajaban drásticamente a las 6 horas, haciéndose casi indetectables luego de 12 horas , observándose muy poca diferencia entre los niveles de glicosilación entre las 6 y 12 horas. Teniendo en cuenta lo anterior, es posible que los resultados obtenidos obedezcan a que el tiempo de sobrevivencia (6 horas) en el cual se evaluó la glicosilación tipo O-GlcNAc fue muy alto para poder apreciar una diferencia significativa en los grupos con y sin inhibición de la vía de glicosilación, ya que la O-GlcNAcilación ha demostrado ser una tipo de modificación post-traducciona muy dinámica, que se puede inducir rápidamente en respuesta a la activación de numerosas vías de señalización, como por ejemplo la activación mitógena de los linfocitos T, la cual induce cambios

en los niveles de O-GlcNAc en proteínas del núcleo y citosol en el rango de minutos a horas (Butkinaree et al., 2010).

Dificultades técnicas

Durante el desarrollo del proyecto se encontraron diferentes dificultades, sobre todo en la toma de imágenes en los grupos de inmunohistoquímica. En la toma de fotos para NeuN, las imágenes se observaron desenfocadas y con un brillo en un costado de la pantalla. Para solucionar este problema que se pensaba era de la técnica de inmunohistoquímica, primero se probó el procedimiento con diferentes concentraciones de anticuerpo, teniendo similares resultados. Aun así, estas imágenes fueron analizadas pensando que era lo normal con los equipos utilizados. Posterior a la toma y análisis de las imágenes fue informado que la fibra óptica del microscopio tenía fibras rotas y por ende producía una iluminación irregular en el tejido. También se detectó que en la parte interna del objetivo de 40X una capa de aceite que impedía el adecuado enfoque de la muestra en el microscopio. Una vez realizado el mantenimiento, se realizó de nuevo la toma de todas las fotos, obteniendo imágenes nítidas y con un buen contraste como se ejemplifica en la imagen 5.

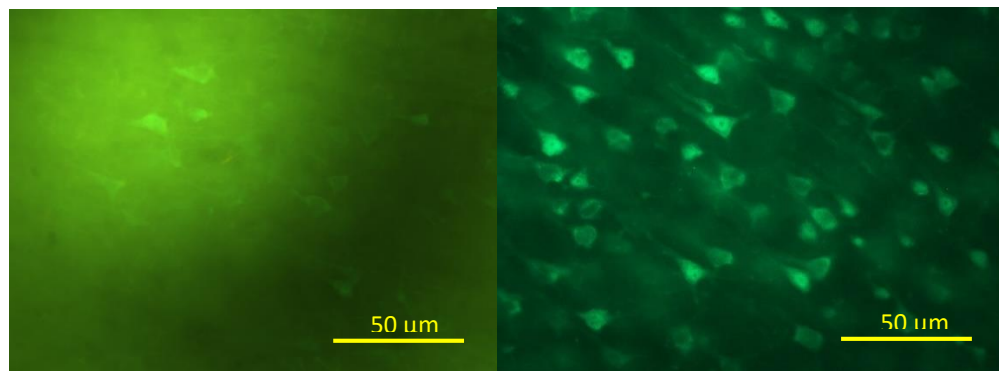


Imagen 5. Comparación entre dos fotos del mismo grupo (F). Izquierda antes, derecha después de realizar el mantenimiento al microscopio de epifluorescencia. (aumento 40X).

Para el análisis con RL2 se obtuvo un problema similar, pero este no se solucionó con el mantenimiento al microscopio. Como se menciona anteriormente, el anticuerpo utilizado puede que no sea el óptimo, se tiene como evidencia la imagen 6, la cual muestra a la izquierda una foto tomada a una placa incubada con el anticuerpo RL2 de marca Thermo Scientific MA1-072, en la cual se observa una adecuada marcación, comparado con la foto de la derecha, obtenidas con el anticuerpo RL2 de marca Santa Cruz Biotechnology. Aunque se ensayaron diferentes concentraciones de anticuerpos no se pudo mejorar mucho la relación señal ruido en los grupos con este tratamiento.

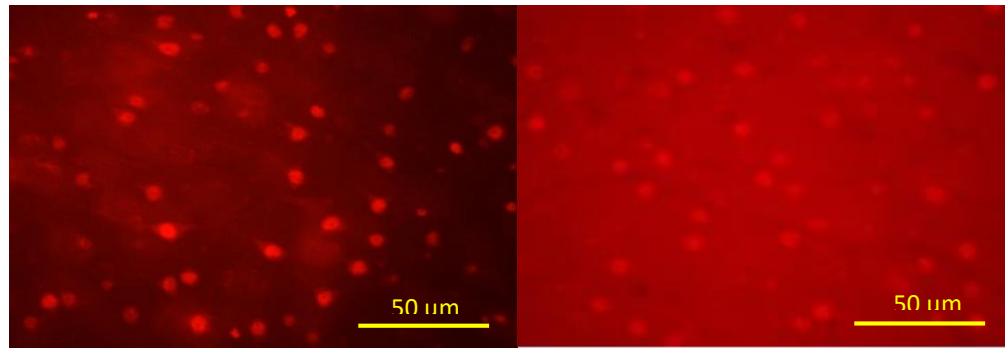


Imagen 6. A la izquierda: Foto tomada a una placa tratada con el anticuerpo de marca Thermo Scientific MA1-072. A la derecha: foto tomada a una placa tratada con el anticuerpo de marca Santa Cruz Biotechnology.

2.7 Conclusiones

- Se estandarizó la metodología necesaria para medir la supervivencia celular (NeuN), el volumen de cerebro infartado (TTC) y los niveles de O-GlcNAcilación de proteínas (RL2), en cerebro de ratas *Wistar* tras un evento isquémico.
- Se midió la supervivencia celular (NeuN), el volumen de cerebro infartado (TTC) y los niveles de O-GlcNAcilación de proteínas (RL2), en diferentes grupos tratados con isquemia, inhibición o potenciación de la O-GlcNAcilación.
- Por medio de la inhibición con DON, no se puede afirmar que a las 6 horas la O-GlcNAcilación sea un factor citoprotector endógeno en cerebro de ratas *Wistar*. Sin embargo se encontraron tendencias y diferencias en los grupos evaluados que indican que este tipo de glicosilación juega un papel importante en la respuesta celular ante situaciones de estrés como la isquemia.
- Los principales factores responsables de las escasas diferencias significativas entre los diferentes tratamientos son: La intensidad de la señal que se midió, el tiempo en el que se midió los niveles de O-GlcNAcilación, factores asociados al diseño experimental de la toma de fotos y a la técnica de medición.

2.8 Recomendaciones

- Realizar la toma de fotos en el procedimiento por IHQ con un aumento menor al 40X, para abarcar una mayor área de la corteza, y por ende un número mayor de neuronas, que permita observar de manera más amplia el efecto de los tratamientos empleados.
- Se recomienda el cambio del anticuerpo RL2 de la marca Santa Cruz Biotechnology, por el anticuerpo ya usado en el grupo de investigación y que tiene una mejor relación señal ruido Thermo Scientific MA1-072.
- Se recomienda utilizar un mayor número de individuos por grupo de tratamiento.

2.9 Referencias bibliográficas

- Borghgraef, P., Menuet, C., Theunis, C., Maurin, H., Devijver, H., Lechat, B., ... Van Leuven, F. (2013). O-GlcNAc-ase inhibitor improves the clinical conditions of Alzheimer's disease mice. *Alzheimer's & Dementia*, 9(4), P509. <http://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.05.1064>
- Butkinaree, C., Park, K., & Hart, G. W. (2010). O-linked β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1800(2), 96–106. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.018>
- Cardozo Hernández, C. F., Rengifo Gómez, J., & Castro Herrera, F. (2014). O-GLCNACILACIÓN EN EXCITOTOXICIDAD NO ISQUÉMICA EN RATAS SOMETIDAS A ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL. Universidad del Valle.
- Champattanachai, V., Marchase, R. B., & Chatham, J. C. (2007). Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein-associated O-GlcNAc. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292(1), C178–87. <http://doi.org/10.1152/ajpcell.00162.2006>
- Dassanayaka, S., & Jones, S. P. (2014). O-GlcNAc and the cardiovascular system. *Pharmacology and Therapeutics*, 142(1), 62–71. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.11.005>
- Jessica E Rexach, Peter M Clark, L. C. H.-W. (2008). Chemical approaches to understanding O-GlcNAc glycosylation in the brain. *Nat Chem Biol*, 4, 97–106.
- Laczy, B., Hill, B. G., Wang, K., Paterson, A. J., White, C. R., Xing, D., ... Chatham, J. C. (2009). Protein O-GlcNAcylation: a new signaling paradigm for the cardiovascular system. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 296(1), H13–H28. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.01056.2008>
- Leiva, A. (2014). CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LA ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR ISQUÉMICA EN PACIENTES DEL ÁREA DE EMERGENCIA CIUDAD HOSPITALARIA DR. ENRIQUE TEJERA. *Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias de La Salud*.
- Liu, F., Schafer, D. P., & McCullough, L. D. (2009). TTC, Fluoro-Jade B and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by middle cerebral artery occlusion. *Journal of Neuroscience Methods*, 179(1), 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.12.028>
- Liu, F., Shi, J., Tanimukai, H., Gu, J., Gu, J., Grundke-Iqbal, I., ... Gong, C. X. (2009). Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer's disease. *Brain*, 132(7), 1820–1832. <http://doi.org/10.1093/brain/awp099>

- Liu, J., Marchase, R. B., & Chatham, J. C. (2007). Glutamine-induced protection of isolated rat heart from ischemia/reperfusion injury is mediated via the hexosamine biosynthesis pathway and increased protein O-GlcNAc levels. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 42(1), 177–185. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2006.09.015>
- Macauley, M. S., & Vocadlo, D. J. (2010). Increasing O-GlcNAc levels: An overview of small-molecule inhibitors of O-GlcNAcase. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1800(2), 107–121. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.028>
- Mullen, R. J., Buck, C. R., & Smith, A. M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, 116, 201–211. <http://doi.org/VL-116>
- Nuñez Figueredo, Y., Tillán Capó, J., Bueno Pavón, V., Carrillo Domínguez, C., Jiménez Alemán, N. M., & Valdés Martínez, O. (2009). Estandarización de un modelo de isquemia por oclusión de la arteria cerebral media en ratas. *Latin American Journal of Pharmacy*, 28(1), 47–54.
- Olga Lúcia Pedraza, Ricardo Díaz, Erick Sanchez P, A. M. I. (2007). ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN SECUNDARIA EN ATAQUE CEREBROVASCULAR (ACV). *Corcas Editores*, 8, 45–70.
- OMS. (2005). Estrategia paso a paso de la OMS para la vigilancia de accidentes cerebrovasculares.
- Shi, J., Gu, J., Dai, C., Gu, J., Jin, X., Sun, J., ... Gong, C.-X. (2015). O-GlcNAcylation regulates ischemia-induced neuronal apoptosis through AKT signaling. *Scientific Reports*, 5, 14500. <http://doi.org/10.1038/srep14500>
- Sicard, K. M., & Fisher, M. (2009). Animal models of focal brain ischemia. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 1, 7. <http://doi.org/10.1186/2040-7378-1-7>
- Silva, F. a, Zarruk, J. G., Quintero, C., Arenas, W., & Silva, S. Y. (2006). Enfermedad cerebrovascular en Colombia. *Revista Colombiana de Cardiología*, 13(2), 85–89.
- Slawson, C., Zachara, N. E., Vosseller, K., Cheung, W. D., Lane, M. D., & Hart, G. W. (2005). Perturbations in O-linked β -N-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis. *Journal of Biological Chemistry*, 280(38), 32944–32956. <http://doi.org/10.1074/jbc.M503396200>
- Viveros Araque, E., Rengifo Gómez, J., & Vera Gonzales, A. (2014). CARACTERIZACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA GSK-3 β EN UN MODELO ANIMAL DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL EN TRATAMIENTO CON GLUCOSAMINA. ICESI.

3. ANEXO

3.1 Carta de aprobación del comité de ética.



Santiago de Cali, Febrero 25 de 2013
CIECUAE-009/2013

Dr. César Augusto Arango Dávila, MD Psiquiatra, MSc, PhD
Investigador principal -
Dr. Juliana Rengifo Gómez, MSc, PhD
Dr. Alejandro Vera González, MD, Estudiante de Doctorado
Cali

Asunto: Aprobación de Proyecto -Isquemia Cerebral con preconditionamiento

El día 8 de Febrero del presente año, los miembros del CIECUAE de la Universidad Icesi, se reunieron y aprobaron el siguiente proyecto de investigación, dando cumplimiento a la Ley 84 de 1989 y a la resolución de Rectoría N° 847 (9 de julio de 2012):

"Evaluación proteómica y funcional de los fenómenos de glicosilación tipo O-glcNAc y sus implicaciones terapéuticas en un modelo experimental de preconditionamiento, isquemia y reperfusión cerebral" -Versión 2.

La presente se firma, el día (25), mes (Febrero), del año (2013)

Cordialmente,

Gabriel Jaime Echeverri, M.D
Presidente -CIECUAE- Universidad Icesi

3.2 Abreviaturas

ECV.....	Enfermedad cerebro vascular
O-GlcNAc.....	N-Acetil-O-glucosamina
O-GlcNAcilación.....	N-Acetil-O-glicosilación
DON.....	6-diazo-5-oxonorleucina
HBP.....	vía de biosíntesis de las hexosaminas
OGT.....	O-GlcNAc transferasa
OGA.....	β -N-acetilglucosaminidasa
GFAT.....	glucosamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa
TTC.....	Método de tinción con cloruro de trifeniltetrazolio

3.3 Fotos DAPI

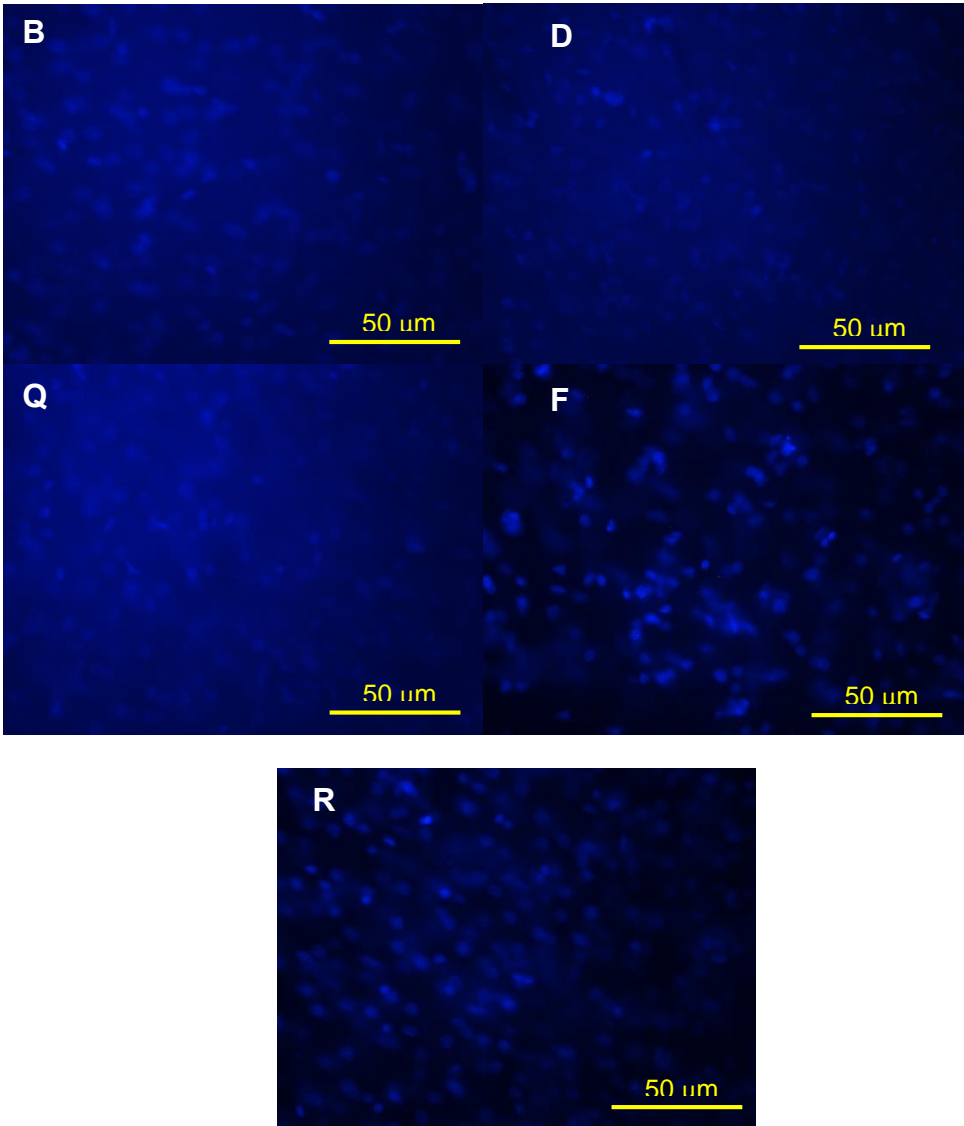


Imagen 7. Imágenes representativas de cada grupo con DAPI. Tomadas con un aumento de 40X.