



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA**



Facultad de Ciencias Químicas BUAP

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS CLÍNICOS

LABORATORIO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO CLÍNICAS

TESIS:

**“COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA DE FASE AGUDA EN
RATAS WISTAR, SPRAGUE-DAWLEY Y LONG-EVANS
DURANTE UN PROCESO INFLAMATORIO INDUCIDO CON
LIPOPOLISACÁRIDO”**

Para obtener el título de:

LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Presenta:

pQ.F.B. STEFFANY CORTEZANO ESTEBAN

Director de tesis:

D.C. EDUARDO MIGUEL BRAMBILA COLOMBRES

Asesor de tesis:

D.C. SAMUEL TREVIÑO MORA

Puebla, Pue., Diciembre de 2019



BUAP

Puebla, Pue. a 6 de Julio de 2018

**C. CORTEZANO ESTEBAN STEFFANY
P R E S E N T E**

Toda vez que se cuenta con la aprobación del Coordinador del Área de Análisis Clínicos,

DR. EDUARDO M. BRAMBILA COLOMBRES, Director de Tesis,

DR. SAMUEL TREVIÑO MORA, Asesor,

se le comunica la autorización de su anteproyecto de tesis denominado:

**"Comparación de la respuesta de fase aguda en ratas Wistar,
Sprague-Dawley y Long Evans durante un proceso inflamatorio inducido con
lipopolisacárido".**

Y con esta fecha se registra en los archivos de la Dirección de esta Facultad,
para los fines legales a los que haya lugar

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

**DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ
DIRECTOR**



Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390 y 01 (222) 244 31 06



BUAP Puebla, Pue. a 4 de Noviembre de 2019

MC. JOSE ANGEL FRANCISCO FLORES HERNANDEZ

MC. JUAN MARQUEZ HERNANDEZ

MC. MARIA ADRIANA GONZALEZ FLORES

Con toda atención comunico a Uds. que se les propone como integrantes de la Comisión Revisora de Tesis que presenta el (la) Pasante de la Carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO

CORTEZANO ESTEBAN STEFFANY

cuyo título es :

"Comparación de la respuesta de fase aguda en ratas Wistar, Sprague-Dawley y Long Evans durante un proceso inflamatorio inducido con lipopolisacárido".

Realizada en el Area de Análisis Clínicos;

asimismo, les ruego que a la brevedad posible emitan el dictamen correspondiente.

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ

DIRECTOR



C.c.p. Archivo

Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390



BUAP

DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
P R E S E N T E

Los que suscriben, integrantes de la Comisión Revisora de la Tesis del alumno de la carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO
CORTEZANO ESTEBAN STEFFANY

realizada en el area de Análisis Clínicos, comunican a Ud. la aprobación de la misma con la siguiente redacción:

"Comparación de la respuesta de fase aguda en ratas Wistar, Sprague-Dawley y Long Evans durante un proceso inflamatorio inducido con lipopolisacárido".


Se extiende la presente, para los usos que al interesado convengan, a los 13 días del mes de Noviembre de 2019

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"




MC. JOSE ANGEL FRANCISCO FLORES HERNANDEZ


MC. JUAN MARQUEZ HERNANDEZ


MC. MARIA ADRIANA GONZALEZ FLORES

C.c.p. Archivo

Vo. Bo.

Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390 y 01 (222) 244 31 06



MTRA. MARIA ELENA RUIZ VELASCO
DIRECCION DE ADMINISTRACION ESCOLAR
PRESENTE

En relacion al oficio de fecha 19 de Noviembre de 2019, signado por el Coordinador del Departamento de Análisis Clínicos de la Facultad de Ciencias Quimicas, me permito comunicar a Ud. el nombre de los Catedráticos que integran el Jurado de Examen Profesional de la Carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO que sustentará:

CORTEZANO ESTEBAN STEFFANY

JURADO

MC. JOSE ANGEL FRANCISCO FLORES HERNANDEZ
MC. JUAN MARQUEZ HERNANDEZ
MC. MARIA ADRIANA GONZALEZ FLORES

Examen que se realizará el día 11 de Diciembre de 2019, a las 13:00 horas en el SALON DE USOS MULTIPLES.

Esperando una respuesta favorable al presente, le reitero mi atenta y distinguida consideracion

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

H. Puebla de Z. a 20 de Noviembre de dos mil diecinueve


DR. JORGE RAUL CERNA CORTEZ
DIRECTOR



C.c.p. Archivo

Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390 y 01 (222) 244 31 06



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Vicerrectoría de Docencia
Dirección General de Bibliotecas



FOLIO:06112019030344-573

MTRA. MARÍA ELENA RUÍZ VELASCO
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DE LA BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
P R E S E N T E

CERTIFICADO DE
NO ADEUDO
BIBLIOTECARIO

Por este conducto, la Dirección General de Bibliotecas de esta institución certifica que el pasante:

CORTEZANO ESTEBAN STEFFANY

Del Nivel Académico de

LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

No adeuda ningún material bibliohemerográfico y que ha entregado la siguiente Tesis en la biblioteca del área correspondiente

**COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA DE FASE AGUDA EN RATAS WISTAR,
SPRAGUE-DAWLEY Y LONG-EVANS DURANTE UN PROCESO INFLAMATORIO INDUCIDO
CON LIPOPOLISACÁRIDO**

ATENTAMENTE
"PENSAR BIEN PARA VIVIR MEJOR"
H. Puebla de Z. A, 28 de Noviembre de 2019


Mtro. Alfredo Avendaño Arenaza
Dirección General de Bibliotecas



2013445055731

G.o.p. Subdirección de Servicios al Público

Av. Juan de Palafox y Mendoza 219 Edificio Arce, planta baja, Centro Histórico, C.P. 72000, Puebla, Pue.
Tels: (01222) 229 55 00 ext. 5351, 5352, Telfax: ext. 5350 www.bibliotecas.buap.mx

Agradecimientos

A Dios por darme las capacidades necesarias para llegar a culminar esta etapa de mi vida y darme día a día oportunidades nuevas para cumplir esta meta. Soy sincera y reconozco que por un momento pensé que no podía hacerlo, pero felizmente Dios estuvo ahí para ayudarme a no dejarme vencer por la adversidad.

A mis padres Reina y Hugo por inculcarme desde pequeña que la educación es muy importante en la vida, que son herramientas para mejores oportunidades. También por sus sabios consejos, amor y cariño que nunca me han faltado, así como su confianza puesta en mí y en ningún momento dudar de mis capacidades y habilidades para obtener este logro. Por alentarme día a día por luchar por estos sueños y no darme por vencida en ningún momento. Por sus sacrificios y esfuerzos incondicionales, los amo.

A mis hermanos Hugo y Daniel quienes me ven como un ejemplo, muchas gracias por creer en mí. A ti Hugo que compartes el mismo amor por la licenciatura y que en ocasiones debatimos haciendo una experiencia mucho mejor. Y a ti Dani que no entiendes lo que tus dos hermanos decimos pero que nos das tu amor incondicional. El tener unos hermanos como ustedes me hace sentir muy feliz porque sé que dos amigos como ustedes nunca me faltaran.

A Ivan que desde que inicie has compartido tu tiempo dándome animo a seguir adelante, gracias por entender que el estrés me causa cambios de humor y que a pesar de eso tengo tu apoyo ilimitado, así como, tu amor y admiración. La ayuda que me has dado ha sido muy importante, siempre fuiste muy motivador diciendo que lo lograría perfectamente, apoyándome hasta donde te era posible, te amo.

A mi abuelita Catalina porque ha estado apoyándome siempre para poder ver a su nieta y sentirse orgullosa por culminar una meta de muchas y a mi abuelita Mercedes que me entrego su apoyo y amor. También a mi abuelito Chelo que te adelantaste en el camino, sin embargo, sé que me ves y que también te llena de orgullo lo que en su momento inculcaste en mí.

A mi director de tesis Dr. Eduardo M. Brambila Colombres por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo para realizar este trabajo, gracias por compartir sus conocimientos y consejos a lo largo de este proyecto que me ayudaron a crecer profesionalmente. No tengo como agradecer la abundancia que brinda y dedicación en la investigación, lo admiro como persona.

A mi co-director de tesis Dr. Samuel Treviño Mora por ser mi guía para desarrollar mis habilidades y ampliar mis conocimientos. Por la paciencia, dedicación y experiencia, por brindarme su tiempo para desarrollar bajo su asesoría la conclusión y éxito de este proyecto. Lo considero uno de los mejores investigadores mi respeto y reconocimiento, siendo un gran ejemplo para mi vida profesional.

A mis sinodales M.C. José Ángel F. Flores Hernández por enseñarme que el mejor regalo de la vida es la felicidad la cual se logra brindando amor y dedicación, siendo humildes ante cualquier circunstancia muchas gracias por sus consejos tanto profesionalmente como en mi vida diaria.

A M.C. Juan Márquez Hernández y M.C. Adriana González Flores por el tiempo invertido a la revisión de esta tesis, gracias por aportar críticas enriquecedoras para la mejora de este proyecto. Gracias también porque fueron participes en mi formación académica una tarea nada fácil de transmitir conocimiento y dejar huella.

A todos mi más sincero agradecimiento.

El conocimiento no es suficiente; debemos de aplicarlo.

El desear no es suficiente; debemos de hacerlo realidad.

Johann Wolfgang von Goethe.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN	3
1. MARCO TEÓRICO	5
1.1. Roedores en la investigación	5
1.1.1. Cepa Wistar	5
1.1.2. Cepa Sprague-Dawley.....	6
1.1.3. Cepa Long-Evans	6
1.1.4. Diferencias de cepas	7
1.2. Respuesta inflamatoria.....	8
1.3. Respuesta de fase aguda	11
1.3.1. Desencadenamiento de la respuesta de fase aguda.....	12
1.3.2. Proteínas de fase aguda.....	12
1.3.3. Clasificación de las proteínas de fase aguda	14
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	16
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	16
4. JUSTIFICACIÓN.....	17
5. OBJETIVOS.....	18
5.1. Objetivo general	18
5.2. Objetivos específicos	18
6. HIPÓTESIS.....	19
6.1. Hipótesis nula (H_0).....	19
6.2. Hipótesis alternativa (H_1).....	19
7. DIAGRAMA DE TRABAJO	20
8. METODOLOGÍA	21
8.1. Material y métodos.....	21
8.1.1. Animales de experimentación.....	21
8.1.2. Grupos experimentales.....	21
8.1.3. Administración de LPS	21

8.1.4.	Extracción sanguínea y preparación de hígado.....	21
8.1.5.	Análisis hematológico	22
8.1.6.	Análisis sérico de IL-6.....	22
8.1.7.	Determinación sérica de PFA	22
8.1.8.	Cuantificación de metalotioneínas por el método de saturación con cadmio 23	
8.2.	Manejo estadístico de los datos y pruebas estadísticas.....	24
8.3.	Aspectos bioéticos	24
9.	RESULTADOS	25
9.1.	Evaluación de síntesis proteica hepática (ALB, PT, globulinas, relación A/G) en cada cepa.	25
9.2.	Valoración de la producción de proteínas clave de la Respuesta de Fase Aguda.....	29
9.3.	Evaluación de los cambios en la citometría hemática durante la RFA	32
10.	DISCUSIÓN.....	41
11.	CONCLUSIONES.....	53
12.	RECURSOS	54
12.1.	Recursos humanos	54
12.2.	Recursos materiales	54
12.3.	Recursos financieros.....	54
13.	REFERENCIAS	55
	ANEXOS	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desencadenamiento de la respuesta inflamatoria.	9
Figura 2. Reclutamiento de leucocitos, mediante el aumento de los niveles de moléculas de adhesión en las células endoteliales.	11
Figura 3 Esquema de la regulación del gen-MT hepático en respuesta a la inflamación e infección	14
Figura 4. Seguimiento de la valoración proteica de la cepa Long Evans posterior a la administración de LPS vía intraperitoneal.	26
Figura 5. Seguimiento de la valoración proteica de la cepa Sprague-Dawley posterior a la administración de LPS vía intraperitoneal.	27
Figura 6. Actividad proteica de la cepa Wistar posterior a la administración de LPS vía intraperitoneal.	28
Figura 7. Proteínas de respuesta de fase aguda de la cepa Long Evans posterior a la administración de LPS vía intraperitoneal.	30
Figura 8. Proteínas de respuesta de fase aguda de la cepa Sprague-Dawley posterior a la administración de LPS vía intraperitoneal.	31
Figura 9. Proteínas de respuesta de fase aguda de la cepa Wistar posterior a la administración de LPS vía intraperitoneal.	32
Figura 10. Evaluación leucocitaria de la cepa Long Evans posterior a la administración de LPS vía intraperitoneal.	33
Figura 11. Evaluación leucocitaria de la cepa Spague-Dawley posterior a la administración de LPS vía intraperitoneal.	35
Figura 12. Evaluación leucocitaria de la cepa Wistar posterior a la administración de LPS vía intraperitoneal.	36
Figura 13. Serie roja y plaquetas de la cepa Long Evans posterior a la administración de LPS vía intraperitoneal.	37
Figura 14. Serie roja y plaquetas de la cepa Sprague-Dawley posterior a la administración de LPS vía intraperitoneal.	38
Figura 15. Serie roja y plaquetas de la cepa Wistar posterior a la administración de LPS vía intraperitoneal.	39
Figura 16. Vía de señalización de TLR4.	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferencias entre especies en las proteínas de fase aguda ¹	13
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ALB	albúmina
Cu ²⁺	cobre
ELISA	ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
gp130	glicoproteína 130
HPA	eje hipotálamo pituitario adrenal
HSC	células madre hematopoyéticas
IFN- α	interferón alfa
IFN- γ	interferón gamma
I κ B	inhibidor del potenciador génico de la cadena ligera en células B
IL-1 β	interleucina 1 beta
IL-6	interleucina 6
IL-6R	receptor de IL-6
IL-8	interleucina 8
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
IL-16	interleucina 16
IL-18	interleucina 18
i.p.	intraperitoneal
IRAK	quinasa asociada al receptor de IL-1
JAKs	tirosin-quinasas intracelulares
LBP	proteína de unión a LPS
LE	Long- Evans
LPS	lipopolisacárido
NET	trampas extracelulares de neutrófilos
NF κ B	factor nuclear de transcripción kappa B
MAPK	proteína quinasa activada por mitógenos
MT	metalotioneínas
MyD88	gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88
NK	células natural killer
PAMP	patrones moleculares asociados a patógenos

PFA	proteínas de fase aguda
PGE2	prostaglandina 2
PMN	polimorfonucleares
PRR	receptores de reconocimiento de patrones
PT	proteínas totales
RFA	respuesta de fase aguda
ROS	especies reactivas de oxígeno
SD	Sprague-Dawley
SMA	eje simpático medulo-adrenal
STAT	elementos activados por los transductores de señales y activadores de transcripción
TAK 1	quinasa 1 del factor de crecimiento transformante beta-quinasa activada
TGF- β	factor de crecimiento transformante β
TLR	receptor tipo toll
TNF- α	factor de necrosis tumoral alfa
TRAF 6	factor 6 asociado al receptor TNF
UBC 13	enzima conjugadora de ubiquitina 13
UEV1A	enzima conjugadora de ubiquitina E2 variante 1A
W	Wistar
Zip	proteínas parecidas a ZrT, IrT
Zn ²⁺	zinc

RESUMEN

Las cepas de *Rattus norvegicus* comúnmente utilizadas en la investigación biomédica son Wistar, Sprague-Dawley, y Long-Evans, sin embargo, un número de estudios han demostrado que existen diferencias entre cepas, por ejemplo, en la absorción gastrointestinal de fármacos, en la respuesta bioquímica a una variedad de neurotóxicos, diferencias en proceso de biotransformación, depuración y vaciamiento hepato-biliar, en la respuesta al estrés, etc., sin embargo, hay poca información ante la respuesta de un proceso inflamatorio. Un método estandarizado para la inducción de la respuesta de fase aguda, es la administración intraperitoneal de lipopolisacárido (LPS), una endotoxina de la pared celular bacteriana.

Ante un daño tisular o infección, el organismo reacciona mediante una respuesta inflamatoria de fase aguda (RFA), proceso biológico complejo que implica vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar y migración de leucocitos al sitio de lesión. La reacción inflamatoria localizada se caracteriza por la presencia de enrojecimiento, tumefacción, calor, dolor y pérdida de la función en la zona del daño.

Ante un daño tisular o infección, el organismo reacciona mediante una RFA, proceso biológico complejo que implica vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar y migración de leucocitos al sitio de lesión. La reacción inflamatoria localizada se caracteriza por la presencia de enrojecimiento, tumefacción, calor, dolor y pérdida de la función en la zona del daño. Las manifestaciones principales son fiebre, leucocitosis, reordenamiento de síntesis de proteínas hepáticas, denominadas proteínas de fase aguda (PFA) que son liberadas a circulación actuando como mediadores inflamatorios; y las metalotioneínas (MT) que son PFA intracelular. La RFA inicia mediante la señalización de citocinas inflamatorias, producidas principalmente por las células de estirpe monocito/macrófago; interleucina-1 β (IL-1 β), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), que median la RFA a nivel local y en sitios distantes. La finalidad de este proceso es restaurar la homeostasis y eliminar la causa de su perturbación.

La mayor parte de la investigación biomédica está dirigida al conocimiento de la fisiología humana y animal a través del conocimiento de eventos celulares y moleculares que permitan explicar los fenómenos que ocurren durante la salud y

enfermedad. Debido a las diferencias reportadas entre las diferentes cepas de ratas es importante conocer las respuestas entre éstas después de un proceso inflamatorio inducido, para así seleccionar el modelo animal más apropiado, lo que constituye un paso crítico en el diseño de un estudio.

Este trabajo se enfocó en estudiar el efecto del LPS provocando una respuesta inflamatoria aguda en tres cepas de ratas Long Evans, Sprague-Dawley y Wistar más utilizadas en la investigación, donde se observó que cada cepa difiere en respuesta al estímulo en diferentes tiempos, duración y producción de proteínas de fase aguda, así como la respuesta hematopoyética. Los resultados obtenidos muestran incremento de IL-6 en cepas Long Evans y Wistar, mientras $\alpha 2$ macroglobulina incremento en todas las cepas. En cuanto a la evaluación de albúmina, fibrinógeno y globulinas no muestran cambios por lo que no son buenos marcadores de inflamación aguda en rata. Y en lo que respecta a la respuesta hematopoyética solo la rata Wistar presento leucocitosis al inducir una respuesta de fase aguda. Sin embargo las 3 cepas mostraron incremento en los polimorfonucleares y los monocitos indicando la presencia de inflamación aguda. De esta manera se demuestra que si existen diferencias entre la cepa Long Evans, Sprague-Dawley y Wistar en respuesta a la inducción de un proceso inflamatorio agudo.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Roedores en la investigación

Los roedores proporcionan un modelo adecuado para la investigación, particularmente en estudios sobre el metabolismo y la fisiología de diversas patologías. Junto con los ratones y otros roedores, la rata es un mamífero utilizado en la investigación biomédica. Su tamaño, fácil manipulación, así como su disposición y bajo costo de mantenimiento, la han hecho un modelo ideal para la investigación. ¹

Las ratas de laboratorio son ejemplares de *Rattus norvegicus* pertenecientes al orden *Rodentia*, suborden *Myomorpha*, superfamilia *Muroidea*, familia *Muridae*. No obstante, no existe única cepa de rata de laboratorio, sino que, mediante cruzamientos se han generado diversas cepas, entre las más utilizadas se encuentran las cepas Wistar, Sprague-Dawley y Long Evans. ^{2,3}

Un número de estudios han demostrado que existen diferencias entre estas especies, por ejemplo, en la absorción gastrointestinal de fármacos, en la respuesta bioquímica a una variedad de neurotóxicos, diferencias de biotransformación, depuración y vaciamiento hepato-biliar, actividad de la UDP-glucuronil transferasa, en la respuesta al estrés, en la secreción de prolactina ante un proceso carcinogénico, entre otros. ⁴⁻⁷

1.1.1. Cepa Wistar

La cepa Wistar, son ratas albinas, fue desarrollada en el Instituto Wistar en 1906 para su uso en la investigación biológica y médica, y es la primera cepa de ratas desarrolladas para servir como un organismo modelo en investigación. Más de la mitad de todas las cepas de ratas de laboratorio son descendientes de la colonia original establecida por el fisiólogo Henry Donaldson, Milton J. Greenman científico administrador, y Helen Dean King, investigadora en genética y embriología. Esta cepa, se caracteriza por su cabeza ancha, orejas largas, y con una longitud de la cola que es siempre inferior a la longitud de su cuerpo y son una de las cepas más activas. El tamaño poblacional promedio de una camada de esta cepa es de 9.5 crías, son ratas dóciles y de crecimiento más lento que las ratas Sprague-Dawley.

Aplicación: modelo de usos múltiples en general, utilizado principalmente para investigación de enfermedades infecciosas, las pruebas de envejecimiento, pruebas de seguridad y eficacia, neurobiología, etología, cirugía experimental y toxicología.

2,8

1.1.2. Cepa Sprague-Dawley

Es una cepa exogámica, la rata Sprague-Dawley es de usos múltiples, utilizada ampliamente en la investigación médica. Su principal ventaja es su tranquilidad y facilidad de manejo. Esta cepa de ratas fue la primera producida por las Granjas Sprague-Dawley (más tarde para convertirse en Compañía de Animales Sprague-Dawley) en Madison, Wisconsin. Las instalaciones de cría se adquirieron inicialmente por Gibco y luego por Harlan (ahora Harlan Sprague-Dawley) en enero de 1980.

El tamaño poblacional promedio de la camada de la rata Sprague-Dawley es de 11,9 crías. El peso corporal de adultos es de 250 g a 300 g para las hembras, y 450 g a 520 g para los machos. La vida útil típica es 2,5 años a 3,5 años. Estas ratas suelen tener mayor relación de cola en relación a la longitud del cuerpo en comparación con ratas Wistar.

Aplicaciones: Terapia genética, análisis de microarreglos, diferenciación y daño neuronal, deterioro de la memoria, actividad de neurotransmisores, respuesta al estrés traumático, cardiomiopatías, efectos del tabaco y el alcohol, actividad antidepressiva, deficiencias nutricionales, epilepsia, efectos de anestésicos, tratamientos para la hipertensión, toxicología, neurología, reproducción, envejecimiento, teratología, oncología, nutrición y obesidad. ⁹

1.1.3. Cepa Long-Evans

La rata Long-Evans es un modelo que fue desarrollado por el Dr. Long y el Dr. Evans en 1915, es el resultado de un cruce entre una hembra albino del Instituto Wistar y un macho salvaje (*Rattus norvegicus*) capturado cerca de Berkeley. Es conocida como "rata encapuchada". Es una cepa exogámica es decir que son una cruce de animales no emparentados. Como característica es que tiene el color del pelaje negro-capucha. Es una rata agresiva en comparación con la Wistar. La rata Long-Evans es pequeña y resistente a la oncogénesis. Es considerada un animal poco

dócil tiene un tiempo de gestación entre 20 y 23 días. El tamaño poblacional promedio de la camada de la rata Long-Evans es de 10,3 crías.

Aplicación: el modelo de usos múltiples en general, Se utiliza para estudios neurológicos, oftalmológicos, toxicológicos, investigación del comportamiento y la obesidad inducida por la dieta. ³

1.1.4. Diferencias de cepas

Yoon YW, Lee DH y colaboradores (1999) compararon la manifestación de los comportamientos de dolor neuropático en varias cepas de ratas, incluyendo a cepas ACI, Brown-Norway, Fischer 344, Lewis, Long-Evans, Sprague-Dawley y Wistar-Furth. La lesión neuropática se produjo ligando estrechamente los nervios espinales izquierdos L5 y L6, con los animales bajo anestesia con halotano durante 2 semanas, se examinaron los signos conductuales como alodinia mecánica, alodinia fría y el dolor espontáneo. Después de una lesión neuropática, las ratas en la mayoría de los grupos desarrollaron altos niveles de signos conductuales de diversos componentes del dolor; sin embargo, algunas cepas de ratas mostraron signos conductuales débiles de dolor neuropático. Cuando se hicieron comparaciones de las diferentes cepas, las ratas Brown-Norway y Long-Evans mostraron la menor magnitud de comportamientos de dolor neuropático. ¹⁰

Cadoni C. y colaboradores (2007), demostraron que las ratas endogámicas Lewis y Fisher, muestran marcadas diferencias en su respuesta a estrés y las drogas de abuso. Se ha reportado que la exposición crónica por morfina y cocaína, entre ratas Lewis y Fisher existen diferencias, debido a que en las ratas Lewis la actividad de los niveles de adenilato ciclasa, y la actividad de la proteína cinasa dependientes de AMP cíclico, son mayores en el núcleo accumbens y locus coeruleus, que en la rata Fisher. Sin embargo, los niveles de proteína G son más bajos en la rata Lewis que en la Fisher. Otra diferencia reportada es que las neuronas del *locus coeruleus* mostraron mayores tasas de activación espontánea en las rodajas de cerebro *in vitro*, que las ratas Fischer; y también mostraron mayor inducción por la morfina, en la respuesta al AMP 8-bromo-cíclico aplicado. Además, las ratas Lewis y Fisher mostraron síndromes de abstinencia de opiáceos muy diferentes, con diferente tipo

de comportamiento, provocado por la precipitación de la abstinencia a opiáceos con el antagonista de los receptores opiáceos, la naltrexona.^{11,12}

Investigaciones refieren que las ratas son excelentes modelos experimentales para estudiar el cáncer de mama, pero las cepas de rata difieren en susceptibilidad. Entre las cuatro cepas Fisher, Sprague-Dawley, Long-Evans y ACI utilizadas, las ratas Fischer son menos susceptibles al cáncer de mama espontáneo, sin embargo, son muy propensas a los tumores metastásicos extremadamente resistentes y resistentes a los medicamentos, en los casos en que desarrollan la enfermedad. Por el contrario, las ratas Sprague-Dawley son las más susceptibles al cáncer de mama espontáneo entre las cepas. Las ratas ACI son muy propensas al cáncer inducido por estrógenos. Las ratas Long-Evans se usan comúnmente en estudios de carcinogénesis de las glándulas mamarias.¹³

L. Luzhna y colaboradores (2015), demuestran mediante el análisis de expresión génica en el tejido de la glándula mamaria de cuatro cepas de rata ACI, Long-Evans, Fischer-344 y Sprague-Dawley, que hubo diferencias significativas, respectivamente, en las ratas Fischer-344, Long-Evans y Sprague Dawley, en comparación con las ratas ACI. Dos cepas, Fischer-344 y Long-Evans, mostraron expresión diferencial en las cascadas de complemento y coagulación, señalización de quimiocinas, señalización PPAR, sistema renina-angiotensina, interacción ECM-receptor, adhesión focal y ruta del metabolismo del glutatión.¹³

Con base en lo anterior, cabe suponer que, de acuerdo a la presencia de un número de estímulos, pueden existir diferencias entre las diferentes cepas de ratas, como por ejemplo, la respuesta inflamatoria.

1.2. Respuesta inflamatoria

La inflamación es la respuesta del sistema inmunológico de un organismo al daño causado a sus células y tejidos vascularizados, por patógenos bacterianos y por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica. La inflamación, es normalmente una respuesta reparadora; un proceso que implica un importante gasto de energía metabólica.¹⁴

La vía de respuesta inflamatoria general se lleva a cabo por medio de una secuencia de inductores los cuales se pueden clasificar como exógenos (PAMP, factores de virulencia, alérgenos, entre otros) y endógenos (derivados celulares, tisulares y plasmáticos); sensores como los receptores TLR, mediadores en donde se consideran como fuente más importante TNF- α , IL-6 y PGE2 y efectores que son las células a donde se activara el proceso inflamatorio. ^{14,15}

La inflamación se desencadena cuando las células inmunes innatas que residen en los tejidos que incluye monocitos, macrófagos, granulocitos, neutrófilos y células NK reconocen la invasión de patógenos o daños en las células. La inflamación aguda tiene un inicio rápido y de corta duración que comprende reacciones localizadas que se caracterizan por la presencia de enrojecimiento, tumefacción, calor, dolor y pérdida de la función en la zona del daño (Figura 1). ¹⁶

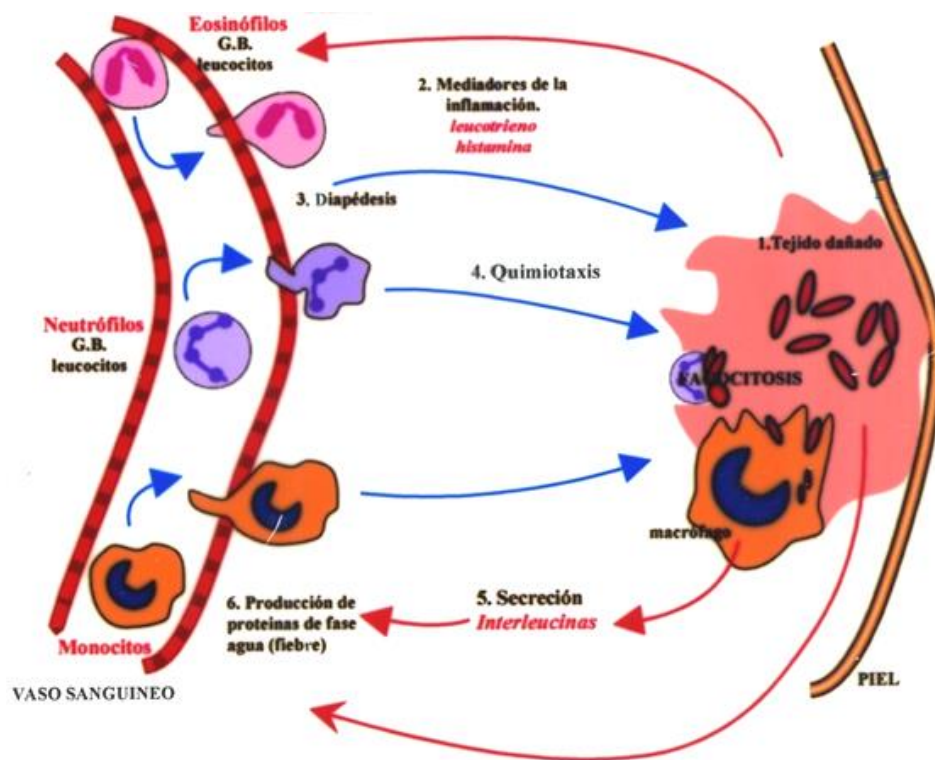


Figura 1. Desencadenamiento de la respuesta inflamatoria. Tomada y modificada de Maria Cholbi et.al.

1. Vasodilatación, aumento del flujo sanguíneo, enrojecimiento y calor.
2. Aumento de la permeabilidad, favorece la salida del plasma, proteínas, anticuerpos, enzimas y fagocitos (edema y tumefacción)
3. Diapédesis, salida de los leucocitos.
4. Quimiotaxis, las células se dirigen hacia el foco inflamatorio.

5. Fagocitosis, efectuada por neutrófilos (formación de pus), macrófagos.

Secreción de interleucinas.

Durante esta respuesta ocurren fenómenos vasculares o cambios hemodinámicos. Se produce una vasoconstricción transitoria de las arteriolas, los mastocitos que se encuentran en el sitio de lesión liberan mediadores inflamatorios como histamina, prostaglandinas y óxido nítrico que actúan en el músculo liso vascular para provocar vasodilatación, aumentando el flujo sanguíneo que causa el enrojecimiento y el incremento de calor en la zona.¹⁷

Posteriormente, las moléculas más grandes, tales como la albúmina y fibrinógeno, dejan el lecho capilar, conformando el exudado. La histamina y leucotrienos actúan sobre las células endoteliales para aumentar la permeabilidad vascular, facilitando la salida de los fagocitos, anticuerpos y otros componentes hacia los tejidos lesionados, produciendo edema y dolor. Las citocinas tales como el TNF- α y la IL-1 β promueven la extravasación de leucocitos (diapédesis) mediante el aumento de los niveles de moléculas de adhesión de leucocitos en las células endoteliales (figura 2) hacia el sitio inflamatorio lo que contribuye a la reparación de tejidos. Los neutrófilos son el primer tipo celular en ser atraídos desde la circulación, y pronto predominan en la zona de la inflamación.¹⁷

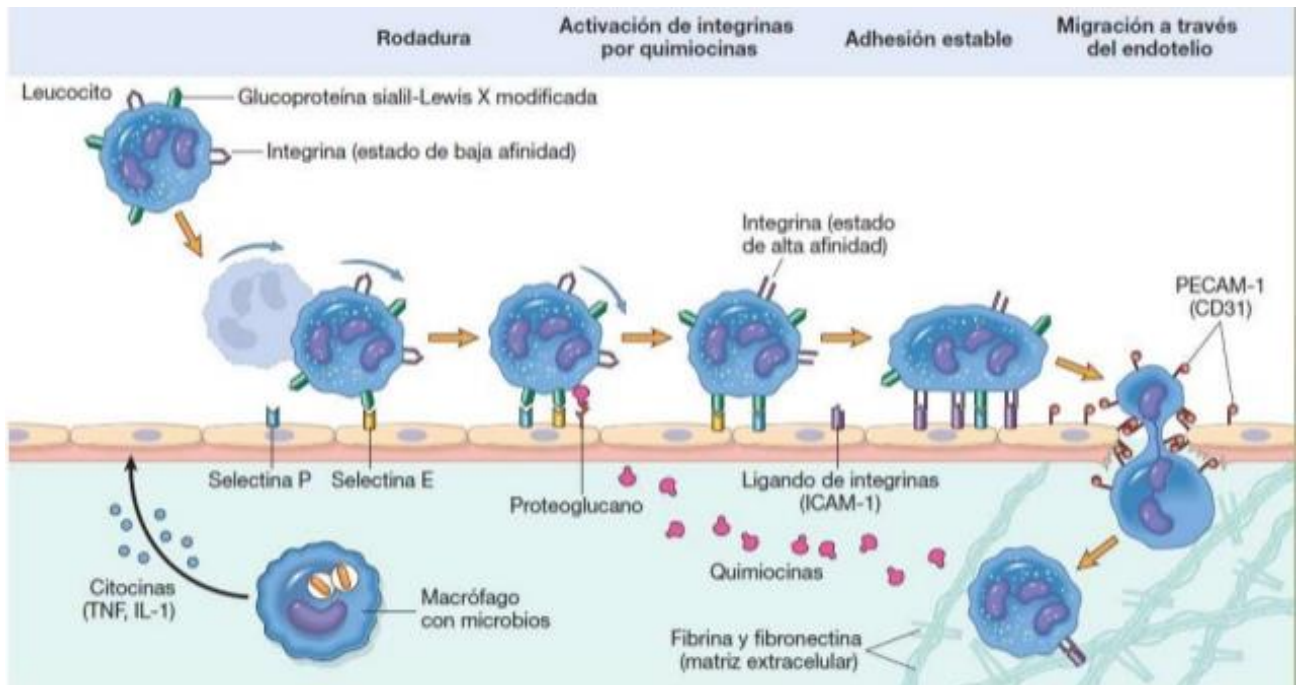


Figura 2. Reclutamiento de leucocitos, mediante el aumento de los niveles de moléculas de adhesión en las células endoteliales. Las células endoteliales en los sitios de infección y lesión tisular son activadas, en su mayoría en respuesta a citoquinas. La activación endotelial genera entonces un aumento en la adhesividad hacia los leucocitos circulantes. Esta adhesión es mediada por dos clases de moléculas llamadas selectinas e integrinas, y sus ligandos. La expresión de estas moléculas de adhesión varía entre los diferentes tipos de leucocitos y los vasos en las diferentes ubicaciones. Tomada y modificada de Robbins, S.L y cols.2004.

1.3. Respuesta de fase aguda

La respuesta inflamatoria se acompaña de una respuesta generalizada, conocida como RFA, es una reacción no específica, altamente compleja y rápida del organismo animal. Es parte del sistema de defensa innata en el huésped como una respuesta a la lesión tisular, infección o inflamación, en donde se produce una rápida reprogramación de expresión de genes y cambios en el metabolismo en respuesta a la señalización de citoquinas proinflamatorias. Una característica destacada de esta respuesta es la síntesis de proteínas de fase aguda por parte del hígado. La finalidad de este proceso es restaurar la homeostasis y ayudar a eliminar la causa de su perturbación. ^{16,18}

1.3.1. Desencadenamiento de la respuesta de fase aguda

La RFA se ve estimulada por la liberación de citocinas, entre las que destacan: Interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6 y TNF- α . Estas citocinas son liberadas por monocitos y macrófagos en el lugar donde se sitúa el foco inflamatorio o infeccioso, y debido a sus acciones paracrinas este aumento inicial provoca un incremento sistémico. El aumento de citocinas circulantes produce la estimulación de la RFA en los hepatocitos. En el mecanismo de estimulación hepática para la producción de proteínas de fase aguda se pueden apreciar tres variantes fundamentales según el tipo de citocina implicada:

La IL-6, se une a su receptor específico provocando la fosforilación del factor de transcripción, que se transloca hacia el núcleo donde se lleva a cabo la transcripción de los genes que codifican la producción de proteínas de fase aguda.

La IL-1 β y el TNF- α se unen a sus respectivos receptores y causan la degradación del inhibidor del factor de transcripción permitiendo así la producción de este factor y la activación subsecuente de los genes de fase aguda en el núcleo de la célula. ¹

1.3.2. Proteínas de fase aguda

La producción de PFA está controlada por citocinas liberadas durante el proceso inflamatorio como la IL-1 β e IL-6, principales reguladores que funcionan como una cascada y como una red que tiene efectos reguladores aditivos, inhibidores o sinérgicos en la expresión de PFA.

Las PFA son diferentes entre los seres humanos y los animales, y a su vez de una especie a otra. En la rata, la α -1-glicoproteína ácida, α -2-macroglobulina, haptoglobina y fibrinógeno se encuentran entre las principales proteínas de fase aguda (tabla 1), mientras que la proteína C-reactiva, predominante en los seres humanos, no participa.^{18,19}

Proteína de fase aguda	Humano	Rata	Ratón
α -1-glicoproteína ácida	↑↑	↑↑↑	↑↑↑
α -2-macroglobulina	SC	↑↑	Desconocido
Haptoglobina	↑↑	↑↑	↑↑
PCR	↑↑↑	↑	↑↑
Fibrinógeno	↑↑	↑↑	↑↑

Hemopexina	↑	↑↑	↑
Ceruloplasmina	↑	↑	Desconocido

Tabla 1. Diferencias entre especies en las proteínas de fase aguda ¹

↑↑↑: elevación ≥ 100 veces; ↑↑: elevación de dos a cinco veces; ↑: elevación < doble; SC: sin cambio significativo

Cambios en la respuesta de fase aguda hepática intracelular que se llevan a cabo se encuentran las metalotioneínas (MT), forman parte de una familia de proteínas con capacidad de unir metales que son expresadas en todos los organismos y juegan un papel clave en la homeostasis de metales esenciales como el Zn^{2+} y Cu^{2+} . Además, participan en la depuración de no esenciales, o aquellos que aun siendo esenciales se encuentren en los sistemas biológicos en concentraciones tóxicas. La MT es la principal metaloproteína intracelular.

Se ha mostrado que la síntesis de las MT es inducida *in vitro* e *in vivo* por citocinas después de la infección y daño tisular. Con base en la similitud entre los inductores de la síntesis de PFA y MT, en la actualidad las MT se consideran como proteínas de fase aguda ya que hay elevación hepática de MT1 y MT2 durante la exposición a endotoxinas. Esta es una respuesta de fase aguda asociada con una reducción rápida de Zn^{2+} en plasma y un aumento de ~ 29% en Zn^{2+} hepático. La producción de IL-1 α , IL-1 β , TNF α e IL-6 preceden a esta respuesta y cada una de estas citocinas desencadena independientemente la transcripción de MT.²⁰

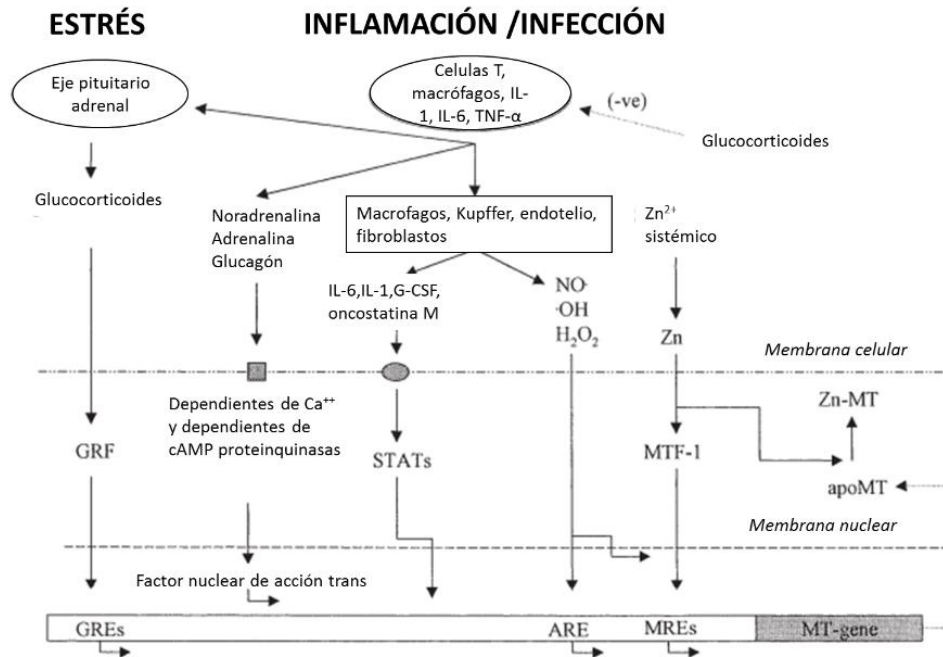


Figura 3 Esquema de la regulación del gen-MT hepático en respuesta a la inflamación e infección. (Modificado de Coyle P., Philcox J. C., Carey L. C., Rofe A. M. 2002)

1.3.3. Clasificación de las proteínas de fase aguda

Las proteínas de fase aguda se pueden clasificar con base al tipo de variación de sus niveles ante un estímulo:

- Proteínas de fase aguda negativas: son aquellas cuyos niveles se ven disminuidos durante una RFA. Dentro de este grupo se encuentra principalmente a la albúmina, durante un proceso inflamatorio esta proteína se asocia con una mayor tasa fraccional de catabolismo y cuando es extrema, aumenta la transferencia de albúmina fuera del compartimento vascular. Se produce una cascada de eventos en los que la inflamación induce la anorexia y reduce el uso efectivo de la ingesta de proteínas y energía en la dieta y aumenta el catabolismo de la proteína somática clave, la albúmina.
- Proteínas de fase aguda positivas: son aquellas cuyos niveles se ven aumentados cuando se produce la RFA.

Las principales PFA ante la activación de la inflamación aguda sistémica son $\alpha 2$ -macroglobulina, IL-6, IL-1 β y TNF- α siendo las ultimas las encargadas de la regulación de la síntesis de PFA.

La α 2-macroglobulina es útil como marcador de procesos inflamatorios, típica en rata. Es una proteína plasmática con secuencias de similitud con los componentes del complemento C3 y C4 (todos contienen un tipo único de sitio reactivo: β -cisteinil- γ -glutamil tioléster). Inhibe las proteasas de serina, cisteína, aspartato y metal. Exhibe una función de unión a citocina y factor de crecimiento. Modula la respuesta de células T por mitógenos antígenos.^{1,19}

Aunque se han identificado en diversos trabajos la respuesta de fase aguda, sus proteínas participantes, la respuesta innata celular y los diferentes tejidos que participan integrando la diversidad de señales en pro de la homeostasis de la inflamación, hasta ahora no se ha establecido las posibles diferencias que pueden existir entre cepas de *Rattus norvegicus* como modelos de estudio del estado inflamatorio.

2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El uso de modelos animales es ampliamente aceptado para el estudio de procesos de compromisos fisiológicos y fisiopatológicos, entre las especies de ratas comúnmente utilizadas en la investigación son Wistar, Sprague-Dawley y Long-Evans. Sin embargo, numerosos estudios demuestran que existen diferencias entre especies, por ejemplo, en la absorción gastrointestinal de fármacos, en la respuesta bioquímica a una variedad de neurotóxicos, diferencias en el hígado (actividad de la *UDP-glucuronil transferasa*) y en la respuesta al estrés. Sin embargo, hay poca información acerca de la respuesta ante un proceso inflamatorio agudo entre cepas y como repercutiría en la interpretación y correlación de los resultados obtenidos.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existen diferencias significativas en la producción de las proteínas de fase aguda entre las cepas de *Rattus Norvegicus*: Wistar, Sprague-Dawley y Long-Evans después de la inducción de un evento inflamatorio?

4. JUSTIFICACIÓN

La mayor parte de la investigación biomédica está dirigida al conocimiento de la fisiología humana y animal a través del conocimiento de eventos celulares y moleculares que permitan explicar los fenómenos que ocurren durante la salud y enfermedad. Seleccionar el modelo animal más apropiado es un paso crítico en el diseño de un estudio. Los roedores proporcionan un modelo muy adecuado para la investigación del metabolismo y de la fisiología en la RFA. La comprensión de los modelos animales en respuesta a eventos que alteren la fisiología de la inflamación, ayudará a entender mejor los procesos de integración de señales intra y entre tejidos. Así mismo, la información obtenida ayudará a seleccionar el modelo correcto para la evaluación de blancos terapéuticos y nuevos desarrollos farmacológicos.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Comparar la respuesta de fase aguda en tres cepas de ratas con un proceso inflamatorio inducido con lipopolisacárido.

5.2. Objetivos específicos

En las tres cepas de *Rattus norvegicus* después de una administración de LPS intraperitoneal:

- Evaluar los cambios leucocitarios en sangre periférica durante la RFA.
- Valorar si existen diferencias significativas en la producción de proteínas clave de la RFA.
- Determinar si existen diferencias en los niveles de metalotioneína hepática como marcador intracelular de la RFA.

6. HIPÓTESIS

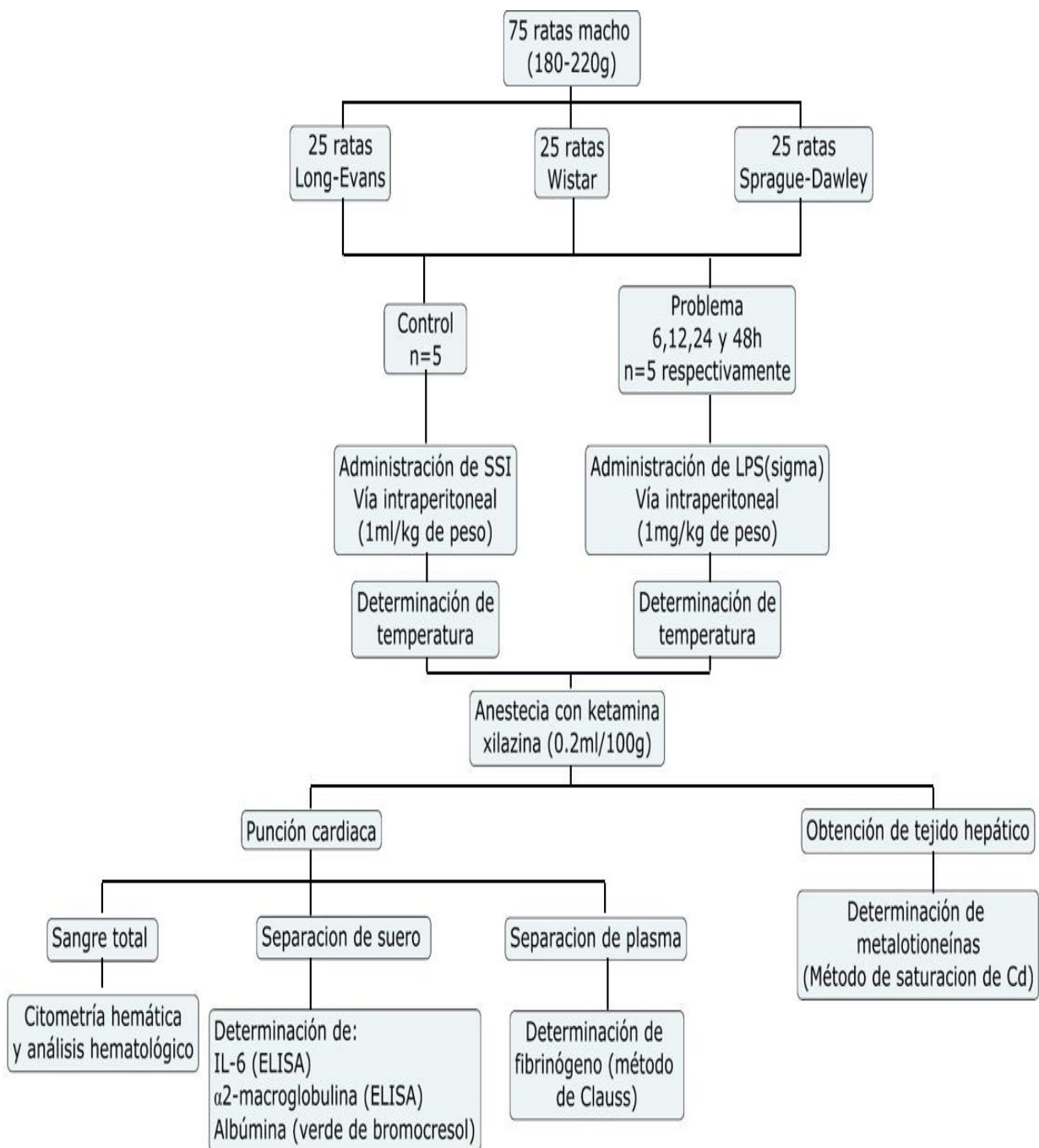
6.1. Hipótesis nula (H_0)

No existe diferencia en la respuesta celular y proteica de fase aguda entre ratas Wistar, Sprague-Dawley y Long-Evans con un proceso inflamatorio inducido con lipopolisacárido.

6.2. Hipótesis alternativa (H_1)

Existe diferencia en la respuesta celular y proteica de fase aguda entre ratas Wistar, Sprague-Dawley y Long-Evans con un proceso inflamatorio inducido con lipopolisacárido.

7. DIAGRAMA DE TRABAJO



8. METODOLOGÍA

8.1. Material y métodos

8.1.1. Animales de experimentación

Ratas macho adultas de cada cepa; Wistar, Sprague-Dawley y Long Evans, con un peso de 180-220 g del Bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Las cuales se alojaron en jaulas de policarbonato con serrín, en una habitación con las instalaciones de clima controlado ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) y luz regulada, con 12:12h ciclos día-noche, con acceso libre a comida y agua. Todos los procedimientos empleados en los animales siguieron las normas de acuerdo a la “Guía para el Cuidado y uso de Animales de Laboratorio” de México y aprobados por el Comité Institucional para el cuidado y uso de animales y a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

8.1.2. Grupos experimentales

El estudio se conformó por 5 grupos de cada cepa Wistar, Sprague-Dawley y Long Evans: control al que se le administró SSI (1ml/kg de peso), problema a las 6h, problema a las 12h, problema a las 24h y problema a las 48h se les administro LPS. Debido a que se han reportado resultados favorables para el proceso inflamatorio con lipopolisacárido lo que conlleva a desencadenar la respuesta a diferente tiempo ya especificado con $n=5$ animales para evitar falsos resultados.

8.1.3. Administración de LPS

Las ratas problema recibieron un única dosis de LPS de *Escherichia coli* (1 mg / kg disuelto en 0.5 ml de solución salina isotónica en condiciones estériles) por vía intraperitoneal. Para evitar factores relacionados con los ritmos circadianos, las inyecciones se administrarán a las 8:00 a.m.-10:00 a.m. Las ratas control recibirán un volumen similar de SSI.

8.1.4. Extracción sanguínea y preparación de hígado

Las ratas problema se sacrificaron a las 6, 12, 24 y 48 horas después de la administración de LPS y las ratas control se sacrificaron a las 0 horas.

Se anestesiaron con una mezcla de ketamina y xilazina. Posteriormente se extrajo sangre por punción cardiaca, la sangre total se utilizó para realizar citometría

hemática, el plasma citratado para determinar fibrinógeno, con el suero se determinará IL-6, α -2-macroglobulina y albumina. En seguida, se extirparon los hígados enjuagándolos con solución salina helada (NaCl 0,9%), se perfundieron con solución de sacarosa helada al 0.25 M, se pesaron, maceraron y finalmente se homogeneizaron en un mortero de vidrio Potter-Elvehjem para obtener el sobrenadante.

8.1.5. Análisis hematológico

La determinación se realizó a las 6, 12, 24 y 48 horas después de la administración de LPS y las de las ratas control a las 0 horas. A partir de sangre total con EDTA recolectada se realizó una citometría hemática, y se cuantificaron y evaluaron las diferentes líneas celulares, y a partir de un frote se observará las características de la serie leucocitaria.

8.1.6. Análisis sérico de IL-6

Las concentraciones séricas de IL-6 se midieron por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) con un kit comercial específico para ratas. La determinación de los niveles séricos de IL-6 se realizó a las 6, 12, 24 y 48 horas después de la administración de LPS, y las de las 0 h del control.

8.1.7. Determinación sérica de PFA

La determinación de los niveles séricos de PFA se realizó a las 6, 12, 24 y 48 horas después de la administración de LPS, y las 0 h del control.

Las concentraciones séricas de α -2-macroglobulina se determinaron por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) con un kit comercial específico para ratas.

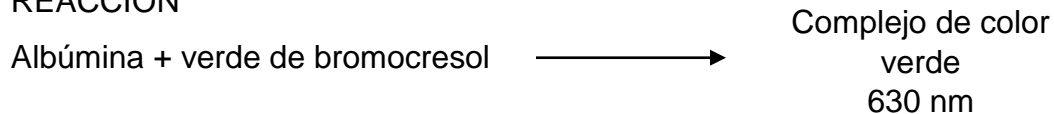
La técnica de ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un substrato cromogénico específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable.

Las concentraciones plasmáticas de fibrinógeno se determinaron con el método de Clauss. El plasma para el ensayo se llevó a cabo en sangre total citratada.

El método de Clauss mide el índice de conversión del fibrinógeno en fibrina en presencia de un exceso de trombina. Cuando el plasma diluido se coagula por exceso de trombina, el nivel de fibrinógeno es inversamente proporcional al tiempo de coagulación.

Las concentraciones séricas de albúmina se determinaron con un método colorimétrico (verde de bromocresol). La albúmina sérica tiene como función el transporte de diversas sustancias. Debido a que el punto isoeléctrico de la albúmina es del orden de 4.9, en la sangre se encuentra predominantemente como anión y en consecuencia es capaz de combinarse fácilmente con cationes. Además, la albúmina es capaz de ligar sustancias orgánicas insolubles como los ácidos grasos, bilirrubina, hormonas, fármacos, etc. La unión de la albúmina a estas sustancias ocurre mediante fuerzas de Van der Waals entre las porciones no polares denominadas uniones hidrofóbicas. Una variedad de colorantes son capaces de ligarse hidrofobicamente a la albúmina y el complejo absorber luz de una longitud de onda diferente de la absorbida por el colorante no ligado a la albúmina proceso denominado error proteico de los indicadores. Por lo tanto, si se hace reaccionar a la albúmina con el verde de bromocresol se formará un complejo de color verde que es directamente proporcional a la concentración de la albúmina presente en la muestra.

REACCIÓN



8.1.8. Cuantificación de metalotioneínas por el método de saturación con cadmio

La determinación de la concentración de MT hepática se realizó de acuerdo al método de saturación con ^{109}Cd /hemoglobina de Onosaka y Cherian (1978) como una modificación por Eaton y Toal, 1982. Se homogenizó en frío 1 g de tejido hepático con amortiguador Tris-HCl 10mmol/L, pH 7.4, posteriormente se centrifugo

a 18,000 x g por 20 minutos. A 100µL de sobrenadante se le adicionó 100µL de solución de ^{109}Cd , posteriormente se incubó durante 10 minutos. Luego se adicionaron 500µL de una solución de hemolizado. Estos tubos fueron calentados en un baño de agua hirviendo por 2 minutos y posteriormente fueron enfriados en un baño de hielo por 5 minutos y finalmente fueron centrifugados a 18,000 c g por 5 minutos. Se adicionó el hemolizado a la muestra y se calentó nuevamente el agua hirviendo, este paso se repitió por una vez más y luego se determinó Cd en el sobrenadante final por AAS (espectroscopia de absorción atómica) de llama. La cantidad de ^{109}Cd fijado por la MT presente en el sobrenadante se midió mediante un detector de centelleo gamma (Perkin Elmer Wisard 1470 Automatic Gamma Counter).

8.2. Manejo estadístico de los datos y pruebas estadísticas.

Los datos se analizaron estadísticamente por ANOVA (análisis de varianza) el cual nos sirve para comparar varios grupos en una variable cuantitativa, además de que si se quiere saber si existe diferencia significativa entre ellos.

El análisis post hoc, es por el ajuste Bonferroni, esta técnica estadística ajusta el nivel de significación en relación al número de pruebas estadísticas realizadas simultáneamente sobre un conjunto de datos.

8.3. Aspectos bioéticos

El manejo de los animales se llevó a cabo de acuerdo a los lineamientos del Comité para el cuidado de los animales de laboratorio cumpliendo los criterios establecidos por la Norma Oficial Mexicana “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” NOM-062-ZOO-1999. Además, siguiendo las medidas de seguridad bajo la NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico infecciosos-Clasificación y especificación de manejo.

9. RESULTADOS

9.1. Evaluación de síntesis proteica hepática (ALB, PT, globulinas, relación A/G) en cada cepa.

Una de las funciones del hígado es sintetizar la mayoría de las proteínas para el organismo, como la albúmina y globulinas. En principio se muestran los resultados obtenidos en la cepa Long-Evans. Respecto a la albúmina (Figura 3-A), los resultados muestran una ligera elevación a las 6 horas y después una disminución con respecto al paso del tiempo hasta las 48 horas, teniendo una media de 3.32 g/dL en el grupo control, sin embargo, comparando los grupos a las 6, 12, 24 y 48 horas no son estadísticamente significativos. Otro parámetro evaluado fueron las proteínas totales (Figura 2-B), observando al grupo control con una media de 6.86 g/dL. En los grupos experimentales hay un aumento a las 6 y 12 horas, y posteriormente un decremento a las 24 y 48 horas, sin ser estadísticamente diferentes respecto al control.

La Figura 3-C muestra la concentración de globulinas en la cual se observa una disminución en el grupo tratado a las 6 y 48 horas, un incremento a las 12 y 24 horas, sin embargo, no existe diferencia significativa con el grupo control que presenta una media de 3.54 g/dL. Finalmente, se realizó la relación A/G, la cual es una expresión de la correlación de albúmina a globulinas, para determinar los cambios de las proteínas. Los resultados muestran un incremento en los grupos de experimentación hasta las 6 horas y posteriormente un decremento manteniéndose hasta las 48 horas, sin embargo, no son significativamente diferentes.

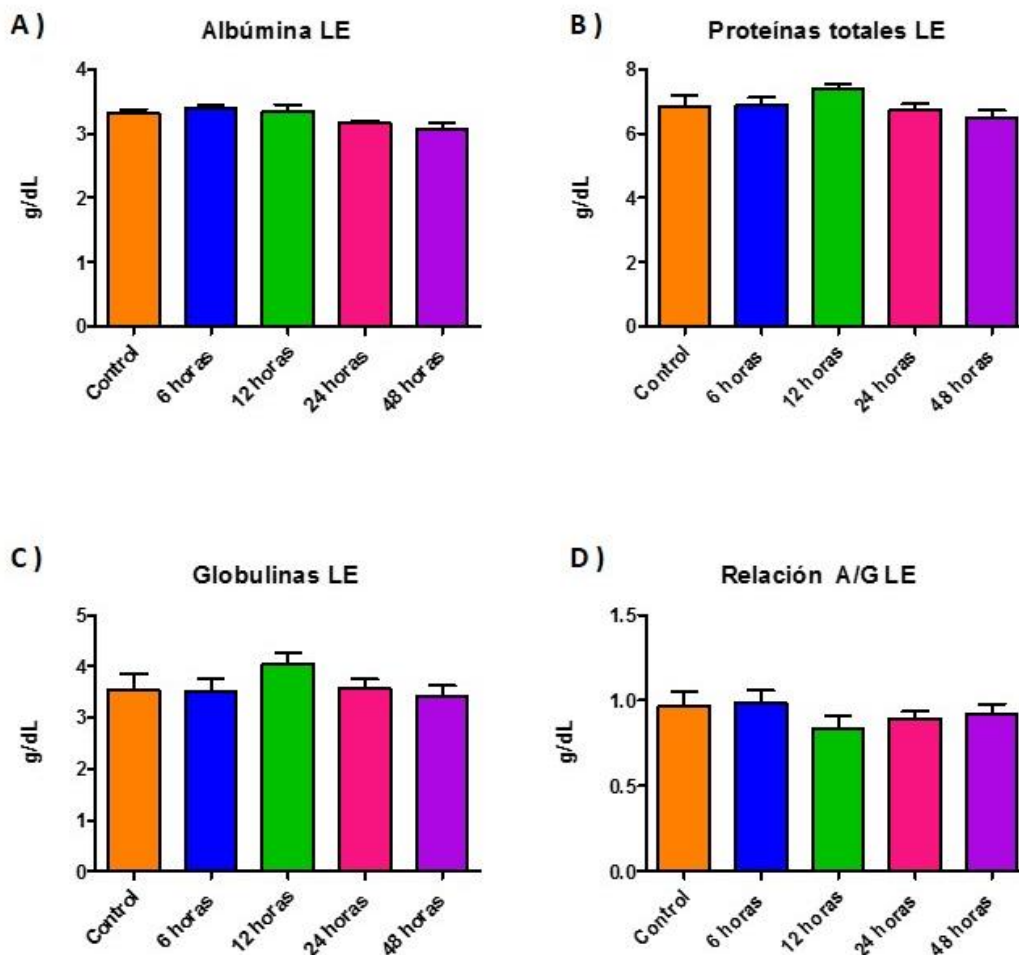


Figura 4. Seguimiento de la valoración proteica de la cepa Long Evans posterior a la administración de LPS vía intraperitoneal. A) Albúmina B) Proteínas totales C) Globulinas D) Relación A/G (▲ ▼) Indica diferencia significativa con un incremento o una disminución con respecto al grupo control, el análisis estadístico fue por ANOVA de una vía, post-hoc de Bonferroni $p \leq 0.05$. Las barras representan la media \pm EEM de 5 experimentos independientes.

Con respecto a la cepa SD se observa que la albúmina (Figura 4-A), tiene incremento a las 6, 12, 24 y 48 horas (3.2%, 12.2%, 5.8% y 1.9%; respectivamente), siendo significativo sólo en el grupo 12 horas. Las proteínas totales (Figura 4-B), en el grupo control tuvieron una media de 7.04 g/dL, y en los grupos experimentales mostraron decremento a las 6 horas y un aumento de las 12 - 48 horas, pero sin ser significativos estadísticamente.

La concentración de globulinas (Figura 4-C), muestra un comportamiento y significancia estadística similar a las proteínas totales para los grupos problema, sin

embargo, el grupo control presentó una media de 3.92 g/dL. En cuanto a la relación A/G, el grupo control observó una media de 0.81, mientras que los grupos experimentales incrementan a las 6 y 12 horas y un disminuyen de las 24 - 48 horas, pero no muestran cambio estadísticamente significativo.

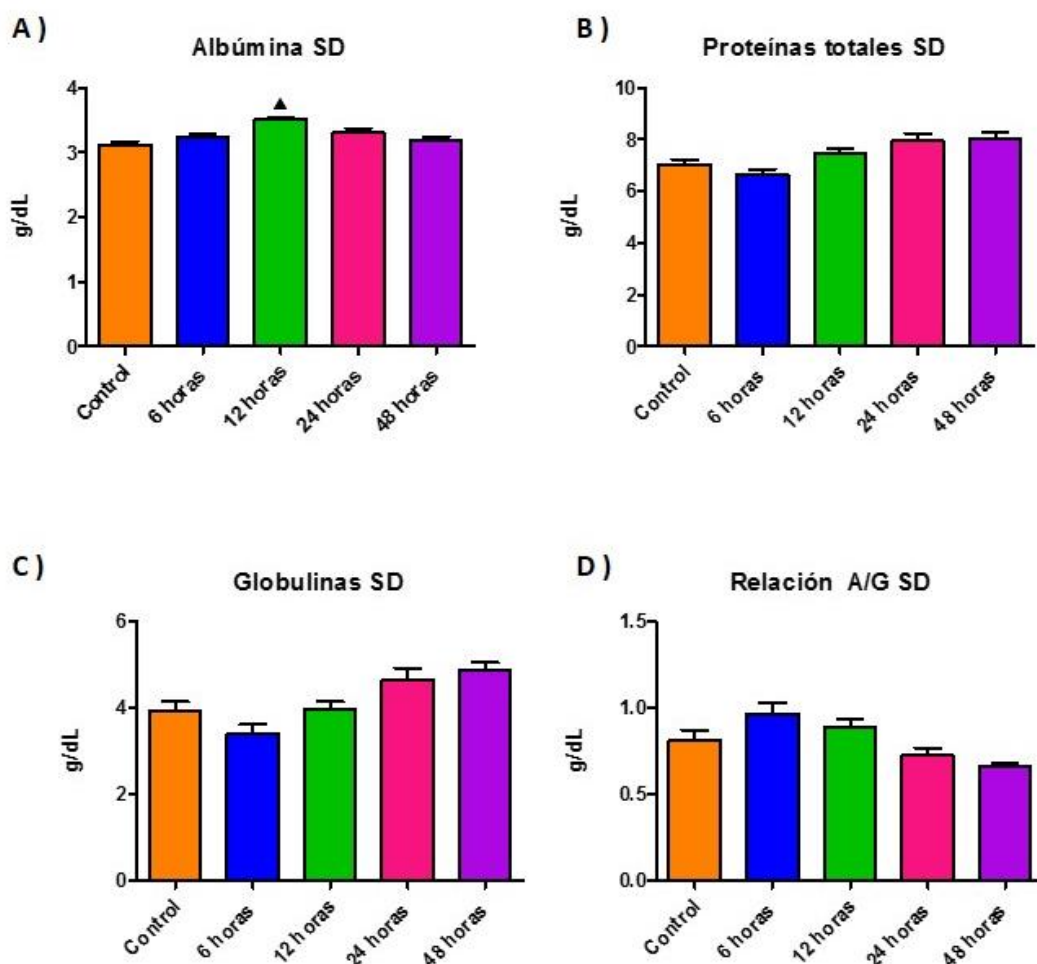


Figura 5. Seguimiento de la valoración proteica de la cepa Sprague-Dawley posterior a la administración de LPS vía intraperitoneal. A) Albúmina B) Proteínas totales C) Globulinas D) Relación A/G (▲ ▼) Indica diferencia significativa con un incremento o una disminución con respecto al grupo control, el análisis estadístico fue por ANOVA de una vía, post-hoc de Bonferroni $p \leq 0.05$. Las barras representan la media \pm EEM de 5 experimentos independientes.

En cuanto a la cepa Wistar, la albúmina (Figura 5-A) tiene decremento no significativo en los grupos experimentales de 6 a 48 horas. La determinación de proteínas totales (Figura 5-B), muestra una media de 6.88 g/dL en el grupo control, mientras que los grupos experimentales muestran un comportamiento bifásico

incrementando dicho parámetro de las 6 - 24 horas y un decremento a las 24 y 48 horas, sin cambios estadísticamente significativos. La concentración de globulinas (Figura 5-C) incrementa en los grupos experimentales desde las 6 a las 48 horas, sin embargo, este no es estadísticamente significativo respecto del grupo control (media de 3.38 g/dL).

La figura 5-D, muestra la relación A/G, la cual disminuye en los grupos experimentales desde las 6 hasta las 48 horas, sin ser estadísticamente diferente respecto al control (media de 1.04).

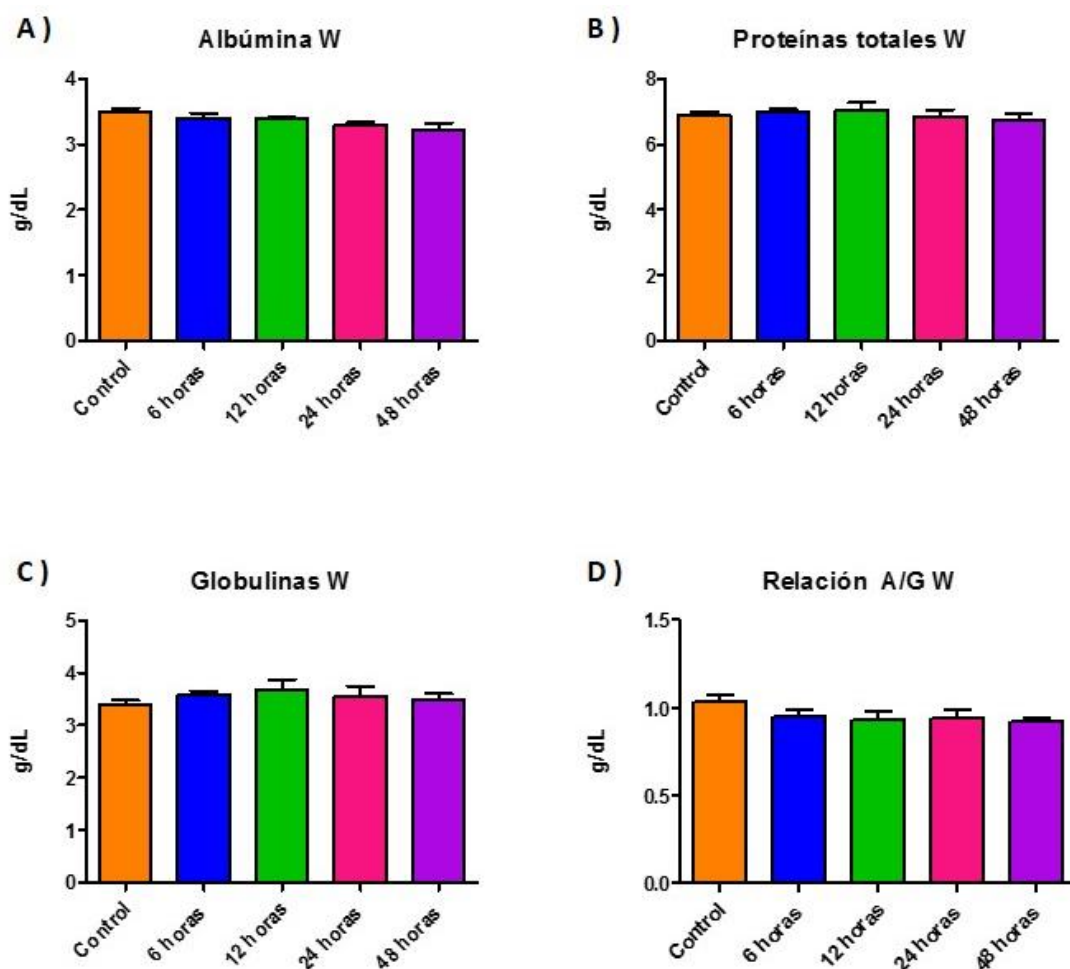


Figura 6. Actividad proteica de la cepa Wistar posterior a la administración de LPS vía intraperitoneal. 48 horas de tratamiento. A) Albúmina B) Proteínas totales C) Globulinas D) Relación A/G (▲ ▼) Indica diferencia significativa con un incremento o una disminución con respecto al grupo control, el análisis estadístico fue por ANOVA de una vía, post-hoc de Bonferroni $p \leq 0.05$. Las barras representan la media \pm EEM de 5 experimentos independientes.

9.2. Valoración de la producción de proteínas clave de la Respuesta de Fase Aguda

El hígado produce proteínas en procesos inflamatorios llamadas proteínas de fase aguda (RFA) o reactante de fase aguda. Los niveles plasmáticos de las RFA presentan una dinámica en dependencia del tiempo y del estímulo de producción hepática. Una de estas proteínas es la IL-6 (Figura 6-A), que en la cepa LE, muestra un incremento sérico significativo a las 24 horas (208.5%) y 48 horas (89.2%). La α 2- macroglobulina es una de las principales proteínas de la RFA predominante en la rata, en la Figura 6-B, se muestra un incremento estadísticamente significativo desde las 6 hasta las 48 horas observando un pico máximo a las 24 horas, que corresponden a 66.6%, 105.4%, 1041.3%, 144.9%, respectivamente. Por otro lado, el fibrinógeno (Figura 6-C), observó un comportamiento similar a α 2- macroglobulina, sin embargo, no fue significativamente diferente respecto al control. Particularmente el tejido hepático, promueve como parte de la RFA la síntesis de metalotioneínas. En la Figura 6-D, se observa un incremento significativo desde las 6 horas (87.58%), 12 horas (35.42%), 24 horas (149.03%) hasta las 48 horas (127.23%), con dos picos máximos a las 6 y 24 horas.

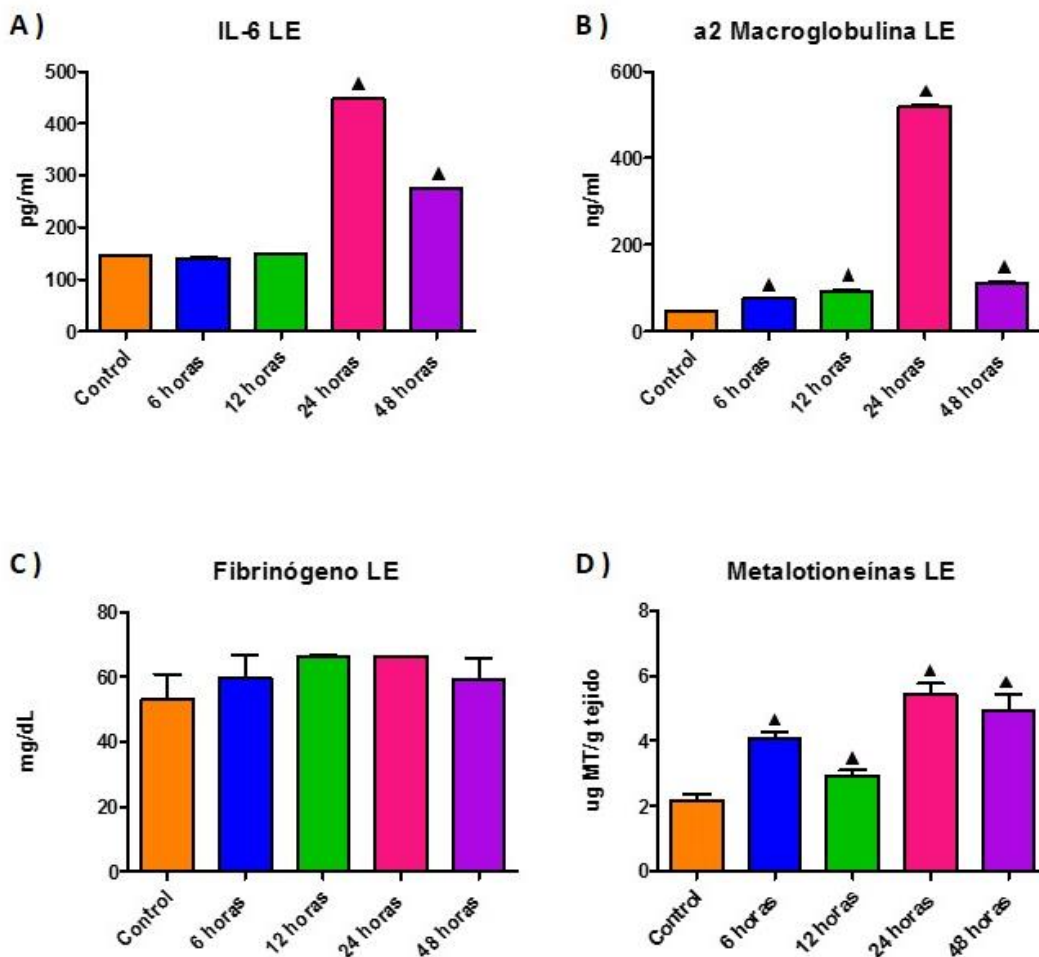


Figura 7. Proteínas de respuesta de fase aguda de la cepa Long Evans posterior a la administración de LPS vía intraperitoneal. A) IL-6 B) α 2- macroglobulina C) Fibrinógeno D) Metalotioneínas hepáticas (▲▼) Indica diferencia significativa con un incremento o una disminución con respecto al grupo control, el análisis estadístico fue por ANOVA de una vía, post-hoc de Bonferroni $p \leq 0.05$. Las barras representan la media \pm EEM de 5 experimentos independientes.

En lo que concierne a la cepa SD (Figura –A), los niveles plasmáticos de IL-6 tienen una disminución estadísticamente significativa de las 6 a las 48 horas, que correspondió a 42%, 42.1%, 32.8% y 39.5%, respectivamente.

En cambio, la α 2- macroglobulina incrementó significativamente de las 12 a las 48 horas en 453.2%, 591.2% y 582.1%, respectivamente. La concentración plasmática de fibrinógeno (Figura 7-C), no observó diferencias significativas entre grupos, únicamente a las 12 y 48 horas hay una tendencia a la baja. Mientras que la concentración de metalotioneína hepática (Figura 7-D), sin ser estadísticamente

significativa, muestra un descenso a las 6 horas (12.7%), y un ascenso a las 12 horas (9.4%), 24 horas (11.1%) y 48 horas (59.3%) comparado con el grupo control.

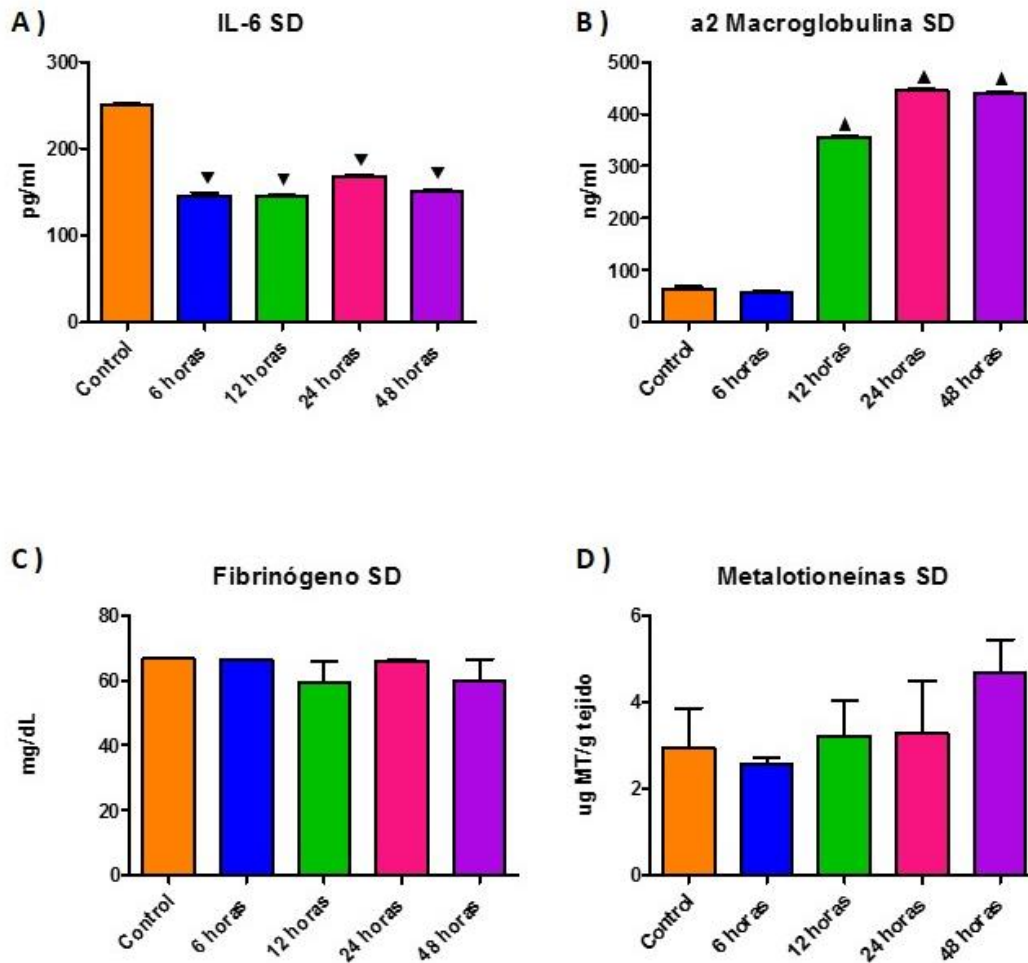


Figura 8. Proteínas de respuesta de fase aguda de la cepa Sprague-Dawley posterior a la administración de LPS vía intraperitoneal. A) IL-6 B) α2- macroglobulina C) Fibrinógeno D) Metalotioneínas hepáticas (▲▼) Indica diferencia significativa con un incremento o una disminución con respecto al grupo control, el análisis estadístico fue por ANOVA de una vía, post-hoc de Bonferroni $p \leq 0.05$. Las barras representan la media \pm EEM de 5 experimentos independientes.

En cuanto a la cepa Wistar la IL-6 (Figura 8-A), incrementó significativamente desde las 6 hasta las 48 horas en un 34.1%, 45.4%, 35.6% y 28.2%, respectivamente. De igual manera se presentaron los niveles de la α2-macroglobulina (Figura 8-B), incrementando significativamente en un 130.5%, 402.4%, 609.4% y 650.2% en los tiempos de cohorte, respecto al control. En cambio, la concentración plasmática de fibrinógeno (Figura 8-C) no muestra diferencias significativas con respecto al

control. La concentración de metalotioneína hepática (Figura 8-D), observó incremento estadísticamente significativo de las 6 a las 48 horas en 51.4%, 171%, 258.2% y 200.8% respecto del control.

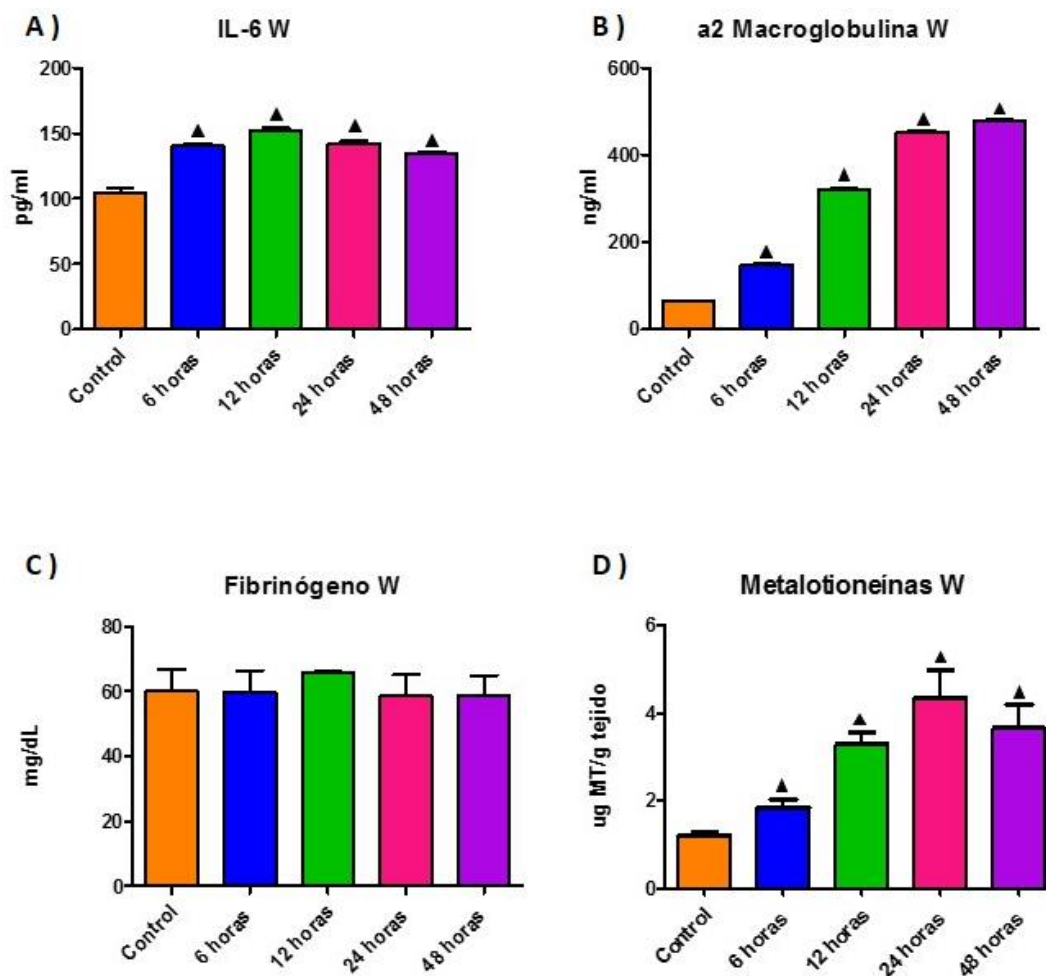


Figura 9. Proteínas de respuesta de fase aguda de la cepa Wistar posterior a la administración de LPS vía intraperitoneal. A) IL-6 B) α2- macroglobulina C) Fibrinógeno D) Metalotioneínas hepáticas (▲▼) Indica diferencia significativa con un incremento o una disminución con respecto al grupo control, el análisis estadístico fue por ANOVA de una vía, post-hoc de Bonferroni $p \leq 0.05$. Las barras representan la media \pm EEM de 5 experimentos independientes.

9.3. Evaluación de los cambios en la citometría hemática durante la RFA

Durante el proceso inflamatorio agudo pueden existir cambios celulares particularmente de estirpe leucocitarios y sus diferentes linajes, por lo que en el presente trabajo se realizó una evaluación de estos. En la figura 9-A se observa la cuenta total leucocitaria para los diferentes grupos de trabajo de la cepa LE. El grupo

control presento una media de $7.64 \times 10^3 / \mu\text{L}$, mientras que los grupos experimentales presentaron incremento de las 6 hasta las 24 horas y una disminución a las 48 horas, sin existir diferencia estadística con respecto al control. En cuanto al conteo diferencial en la figura 9-B se muestran los valores absolutos de la serie linfocida que observan una tendencia a disminuir de las 6 a las 12 horas y un incremento a las 24 horas sin ser diferentes estadísticamente del control. La serie monocítica Figura 9-C se observa un aumento en su conteo absoluto a las 6 horas de 86.8%. En cuanto al absoluto de los polimorfonucleares (Figura 9-D), se observa un incremento de las 6 a las 24 horas, que correspondió a 297.9%, 440.1% y 108.1%, respectivamente, siendo significativamente diferente del control.

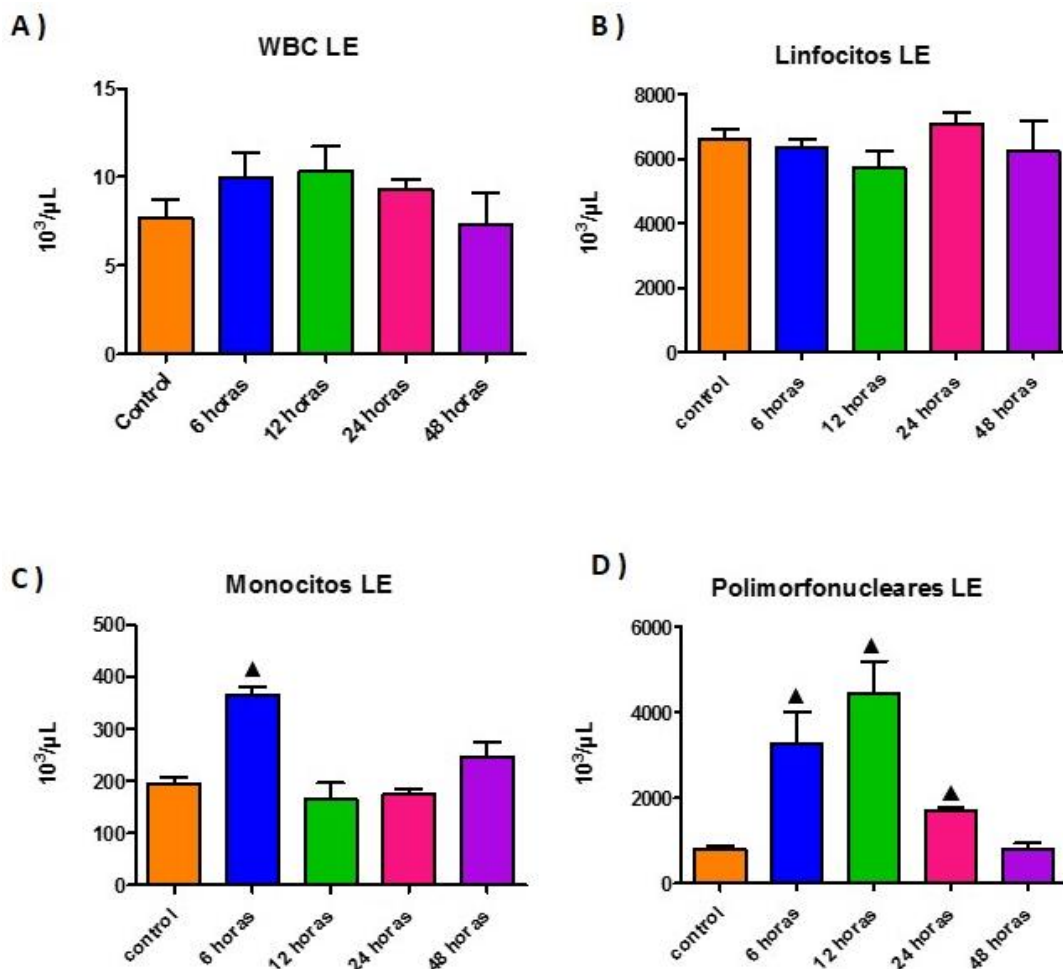


Figura 10. Evaluación leucocitaria de la cepa Long Evans posterior a la administración de LPS vía intraperitoneal. A) Leucocitos totales B) Linfocitos C) Monocitos D) Polimorfonucleares (▲ ▼) Indica diferencia significativa con un incremento o una disminución con respecto al grupo control, el

análisis estadístico fue por ANOVA de una vía, post-hoc de Bonferroni $p \leq 0.05$. Las barras representan la media \pm EEM de 5 experimentos independientes. La distribución del diferencial leucocitario se realizó con los valores absolutos.

En cuanto a la cepa Sprague-Dawley, el conteo total de leucocitos Figura 10-A muestra un comportamiento dual, incrementando de las 6 a las 12 horas, y posteriormente disminuyendo de las 24 a las 48 horas, sin diferencia significativa con respecto al control. El absoluto de linfocitos (figura 10-B), no presentó diferencias respecto del control a lo largo del estudio. Mientras que los monocitos (figura 10-C) con una media de 123.8×10^3 células/ μL del grupo control, muestran incremento de las 6 a las 12 horas (151.37% y 85.95%) y posteriormente un decremento a las 24 horas (82.71%), siendo estadísticamente diferentes del grupo control los grupos tratados de las 6 a las 24 horas. En la figura 10-D, el absoluto de los polimorfonucleares observa incrementos estadísticamente significativos en los grupos tratados de 6 y 12 horas (285.6% y 156.8%, respectivamente) y una disminución significativa a las 24 y 48 horas (67.1% y 59.3%).

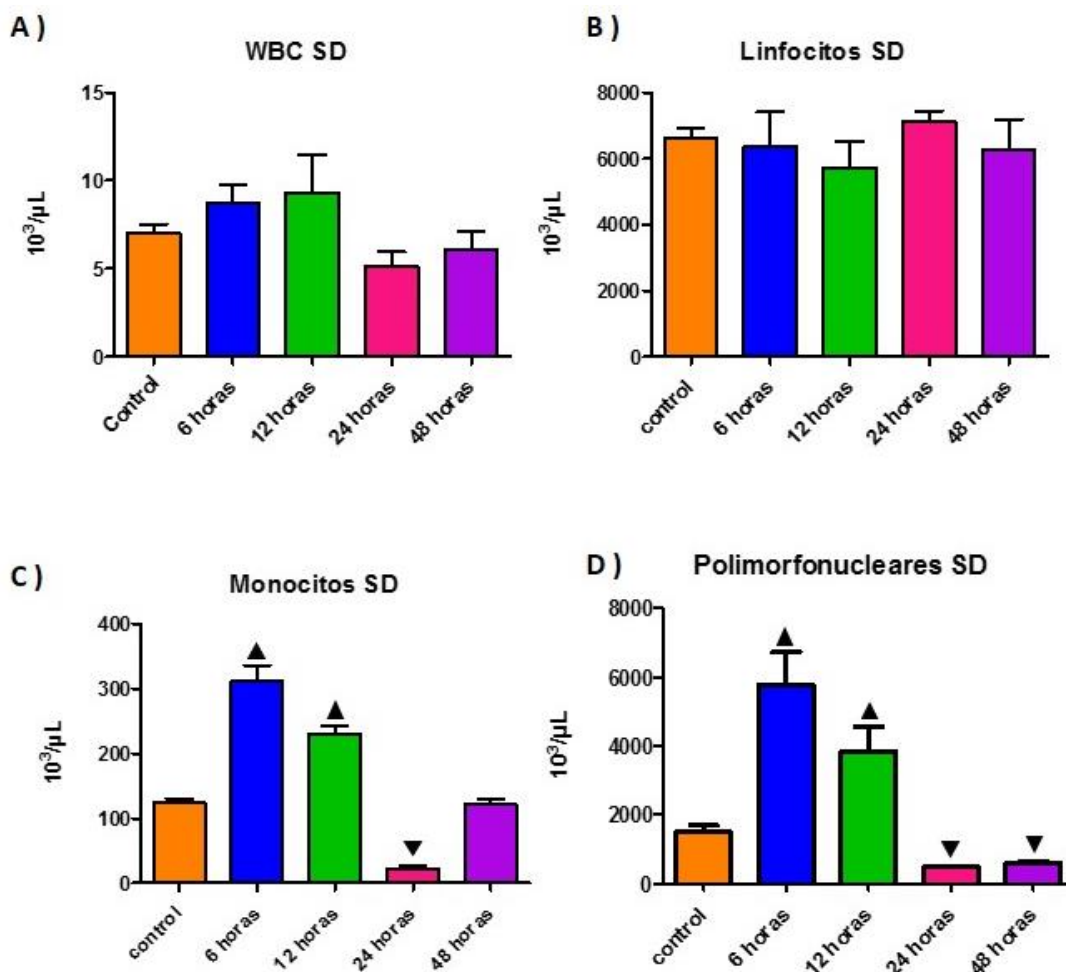


Figura 11. Evaluación leucocitaria de la cepa Spague-Dawley posterior a la administración de LPS vía intraperitoneal. A) Leucocitos totales B) Linfocitos C) Monocitos D) Polimorfonucleares (▲ ▼) Indica diferencia significativa con un incremento o una disminución con respecto al grupo control, el análisis estadístico fue por ANOVA de una vía, post-hoc de Bonferroni $p \leq 0.05$. Las barras representan la media \pm EEM de 5 experimentos independientes. La distribución del diferencial leucocitario se realizó con los valores absolutos.

Los resultados representados en la figura 11-A, evidencian los leucocitos totales correspondientes a la cepa Wistar teniendo un incremento significativo a las 12 horas (84.8%) y un decremento significativo a las 48 horas del 42.3%. La figura 11-B muestra el conteo absoluto de linfocitos en donde se observa una disminución significativa a las 6 (53.3%), 12 (35.8%) y 48 horas (41.9%). Con respecto al conteo de monocitos (figura 11-C), los tiempos 6 y 12 horas incrementan significativamente en 447.8% y 322.01%, respectivamente, mientras que el linaje disminuye a las 24 horas (100%) y recupera a las 48 horas post-tratamiento sin mostrar evidencia

significativa en el grupo tratado a las 48 horas. Finalmente, en la figura 11-D se muestra el comportamiento de los absolutos correspondientes a los polimorfonucleares, observando incrementos a las 6, 12 y 24 horas, 414.5%, 1033.8% y 73.1% y un decremento a las 48 horas de 44.5%, evidenciando solo diferencias significativas en los grupos tratados a las 6 horas y 12 horas.

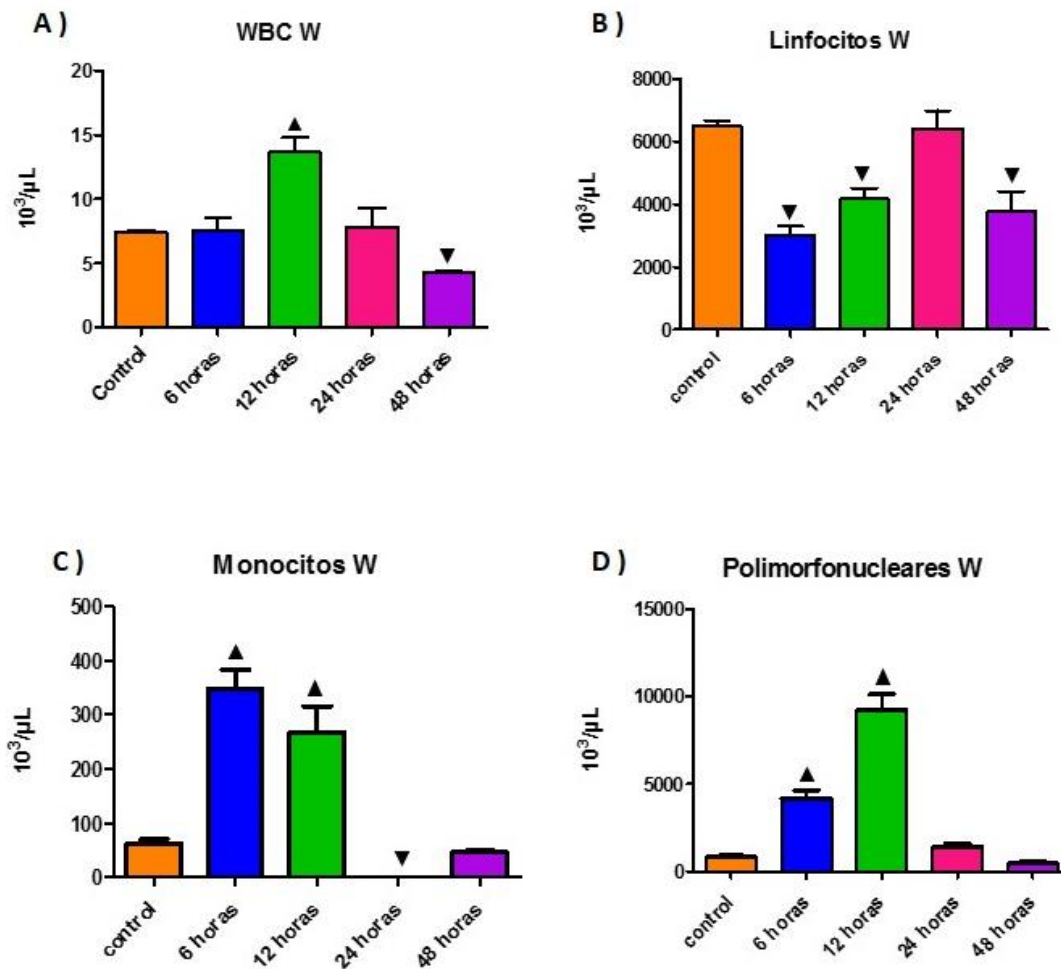


Figura 12. Evaluación leucocitaria de la cepa Wistar posterior a la administración de LPS vía intraperitoneal. A) Leucocitos totales B) Linfocitos C) Monocitos D) Polimorfonucleares (▲ ▼) Indica diferencia significativa con un incremento o una disminución con respecto al grupo control, el análisis estadístico fue por ANOVA de una vía, post-hoc de Bonferroni $p \leq 0.05$. Las barras representan la media \pm EEM de 5 experimentos independientes. La distribución del diferencial leucocitario se realizó con los valores absolutos.

Para evaluar el efecto que tiene el proceso inflamatorio agudo sobre la serie roja y plaquetas en la cepa Long Evans. La figura 12-A muestra la concentración de

hemoglobina (15.26 g/dL, para el grupo control), la cual observó disminución no significativa desde las 6 horas, manteniéndose hasta las 48 horas del tratamiento. Lo mismo ocurre con el conteo de los eritrocitos (figura 12-B), en donde la tendencia es a la baja con el paso del tiempo siendo estadísticamente diferente del control el grupo tratado a las 48 horas con un 25.8%. Con respecto al conteo de plaquetas (figura 12-C), muestra un comportamiento fluctuante, pero sin diferencia estadística respecto del control.

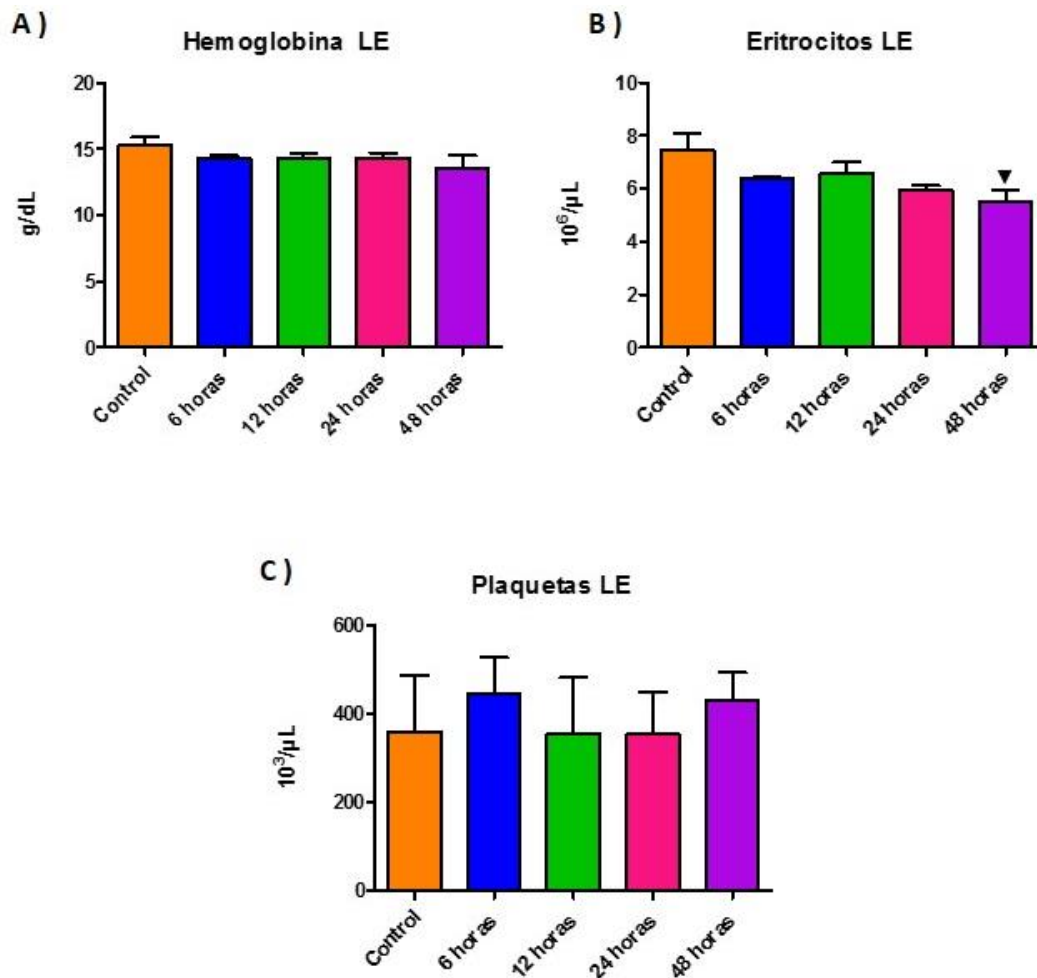


Figura 13. Serie roja y plaquetas de la cepa Long Evans posterior a la administración de LPS vía intraperitoneal. A) Hemoglobina B) Eritrocitos C) Plaquetas (▲ ▼) Indica diferencia significativa con un incremento o una disminución con respecto al grupo control, el análisis estadístico fue por ANOVA de una vía, post-hoc de Bonferroni $p \leq 0.05$. Las barras representan la media \pm EEM de 5 experimentos independientes.

En cuanto a la cepa Sprague-Dawley, la concentración de hemoglobina (figura 13-A) no presentó cambios significativos a lo largo del experimento respecto del control (14.43 g/dL). Mientras el conteo de eritrocitos (Figura 13-B), presenta una tendencia a disminuir 6.1% a las 6 horas manteniéndose hasta las 12 horas, posteriormente 13.6% a las 24 horas y siendo significativamente diferente al control el grupo tratado a las 48 horas con 18.9%. El conteo de plaquetas (Figura 13-C), también disminuye con respecto al grupo control a las 6, 12, 24 y 48 horas (24.7%, 69.6%, 30% y 47%, respectivamente), siendo estadísticamente diferentes los grupos a las 12 y 48 horas.

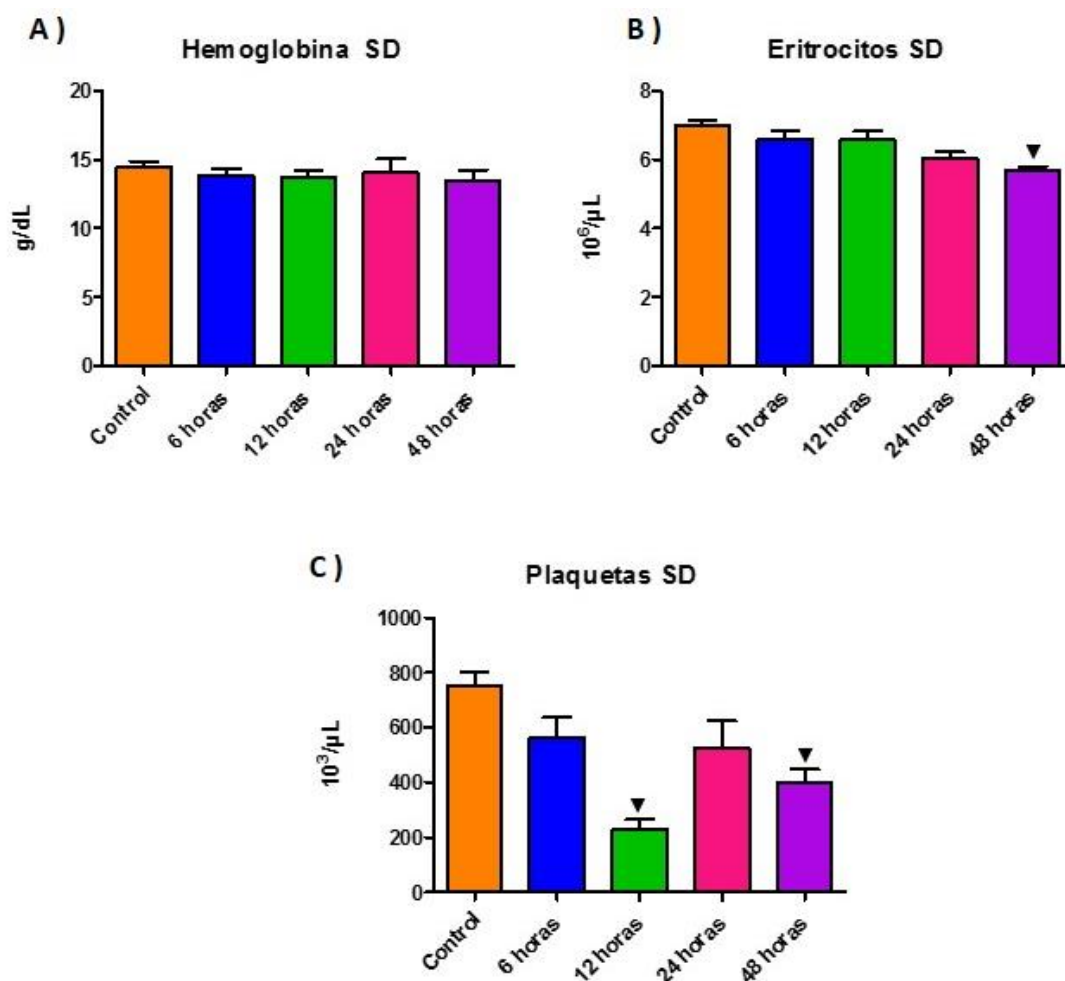


Figura 14. Serie roja y plaquetas de la cepa Sprague-Dawley posterior a la administración de LPS vía intraperitoneal. A) Hemoglobina B) Eritrocitos C) Plaquetas (▲▼) Indica diferencia significativa con un incremento o una disminución con respecto al grupo control, el análisis estadístico fue por ANOVA de una vía, post-hoc de Bonferroni $p \leq 0.05$. Las barras representan la media \pm EEM de 5 experimentos independientes.

Con respecto a la cepa Wistar, la figura 14-A muestra la concentración de hemoglobina para el control correspondió a 14.04 g/dL, mientras que los grupos experimentales observan una tendencia al aumento de las 6 a las 24 horas, y una disminución a las 48 horas, sin embargo, no son estadísticamente diferentes. En cuanto al conteo de eritrocitos (Figura 14-B) tiene un comportamiento similar en donde de las 6 - 24 horas existe un aumento, y posteriormente a las 48 horas un decremento respecto del grupo control (media de $6.82 \times 10^6/\mu\text{L}$), sin embargo, no existe diferencia significativa. En la figura 14-C se observa al conteo de plaquetas donde se ve una tendencia a disminuir en los grupos de experimentación con el paso del tiempo a las 6 horas (33.4%), 12 (56.9%), 24 (59.4%) y 48 horas (64.1%) siendo estadísticamente diferentes los grupos a las 12, 24 y 48 horas.

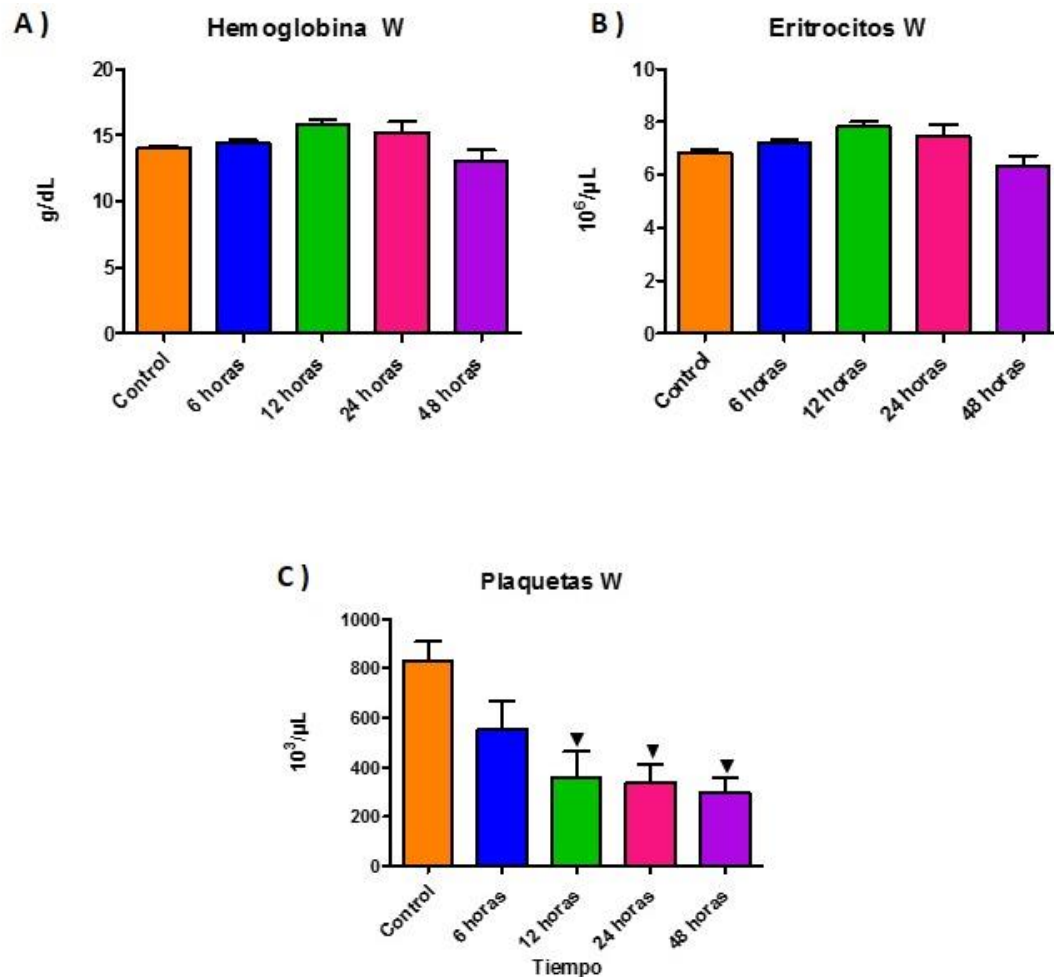


Figura 15. Serie roja y plaquetas de la cepa Wistar posterior a la administración de LPS vía intraperitoneal. A) Hemoglobina B) Eritrocitos C) Plaquetas (▲ ▼) Indica diferencia significativa con

un incremento o una disminución con respecto al grupo control, el análisis estadístico fue por ANOVA de una vía, post-hoc de Bonferroni $p \leq 0.05$. Las barras representan la media \pm EEM de 5 experimentos independientes.

10. DISCUSIÓN

En diversos estudios se ha demostrado que un proceso inflamatorio es la respuesta biológica del sistema inmune a las señales de peligro para eliminar la causa y mantener la homeostasis. En el presente trabajo abordamos el efecto del LPS (lipopolisacárido) sobre la dinámica de la inflamación humoral y celular leucocitaria, así como la inducción de metalotioneínas hepáticas. En este sentido, la fuente de la señal inflamatoria que fue el LPS se ha denominado como un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP). Esta señal puede inducir una respuesta inflamatoria de carácter agudo que afecta a diferentes tejidos, tales como el hígado, corazón, el páncreas, los riñones, los pulmones, el cerebro, el tracto gastrointestinal y el sistema reproductivo.²¹

En mamíferos se ha reportado que tras la administración de LPS se desencadena una serie de cambios, metabólicos e inflamatorios a fin de restaurar la homeostasis alterada, en conjunto, este proceso es conocido como respuesta de fase aguda (RFA). También se sabe que la aplicación intraperitoneal (i.p.) de LPS es un modelo experimental para inducir inflamación hepática y sistémica en roedores. Las principales ventajas de la administración i.p son la alta reproducibilidad y la estandarización, las dosis aplicadas varían ampliamente y el análisis va entre 2 y 8 h antes del sacrificio; en el presente trabajo se utilizó 3 cepas de ratas diferentes y una dosis de 1mg/kg peso, sacrificando desde las 6 h hasta las 48h después de la administración de LPS.²²⁻²⁵

El LPS es una endotoxina que consiste en un fosfoglicolípido anclado a la membrana bacteriana (lípid A) unido covalentemente a un heteropolisacárido hidrofílico, que es la que confiere actividad biológica a la molécula, actuando como estimuladores extremadamente fuertes de la inmunidad innata en diversas especies. Esta endotoxina causa la producción incontrolada de mediadores inflamatorios y estrés oxidativo, lo que resulta en daño hepático agudo.^{23,26} En diferentes estudios se ha demostrado que la lesión hepática inducida por LPS en ratones simula el curso del daño y la falla hepática en la endotoxemia séptica y ocasionalmente en dependencia de la dosis, shock séptico y muerte.

El LPS es un inductor perteneciente a los PAMP reconocido por el receptor 4 tipo toll (TLR4) expresado en la superficie de todas las células inmunes innatas y también en los hepatocitos. Este inductor señala a través de un complejo ternario que involucra TLR4, MD 2 y CD14 y es transportado por la proteína de unión a LPS (LBP), posteriormente se activa la vía MyD88 (gen de respuesta primaria de diferenciación mielóide 88) en donde recluta y activa una quinasa 4 asociada al receptor de IL-1 (IRAK 4) y IRAK 1 (quinasa 1 asociada al receptor de IL-1) siguiendo la activación de la cascada de señalización se activa una proteína adaptadora TRAF 6 (factor 6 asociado al receptor de TNF) formando un complejo con UBC 13 (enzima conjugadora de ubiquitina 13) y UEV1A (enzima conjugadora de ubiquitina E2 variante 1A) y activa la quinasa 1 del factor de crecimiento transformante beta-quinasa activada (TAK1). TAK 1 en consecuencia, activa las vías río abajo del complejo de quinasas IKK y MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos). Las quinasas IKK α , IKK β y IKK γ forman un complejo y fosforilan proteínas I κ B (inhibidor del potenciador génico de la cadena ligera en células B). Esta fosforilación conduce a la degradación de las proteínas I κ B y la posterior translocación del factor de transcripción de NF- κ B, que controla la expresión de citocinas proinflamatorias.^{27,28}

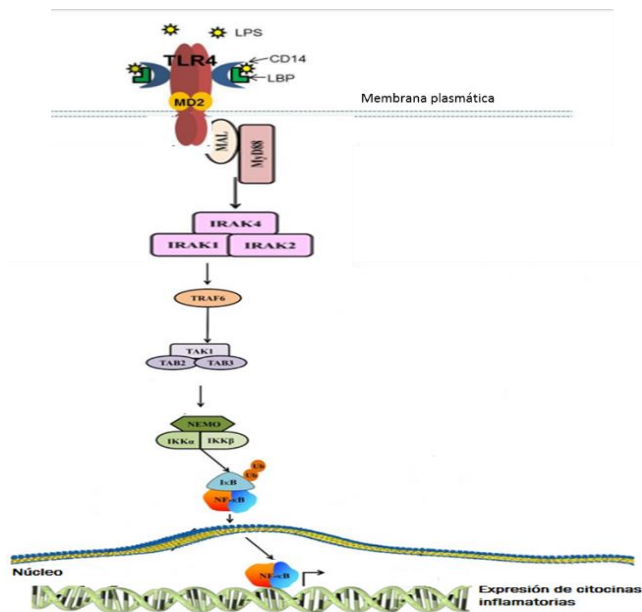


Figura 16. Vía de señalización de TLR4. TLR4 es activado por LPS, mientras que CD14 y MD2 actúan como proteínas accesorias para la unión de LPS / TLR4. Tras la unión del ligando, TLR4 se

dimeriza y recluta moléculas adaptadoras aguas abajo como MyD88 / MAL y TRIF / TRAM para montar una respuesta inflamatoria. El MyD88 / MAL activado luego activa los complejos IRAK4, TRAF6, TAK1 e IKK, mientras que TRIF / TRAM envía señales a través de RIP1 a TRAF6 / TAK1 e IKK. Después de esto, ambas vías convergen en NF- κ B. El complejo citoplasmático NF- κ B se mantiene en estado inactivo por I κ B, que a su vez es degradado por los proteasomas, lo que resulta en la translocación de NF- κ B en el núcleo. Tomada y modificada Yesudhas, Gosu, Anwar, & Choi, 2014

El mecanismo para la estimulación de la producción hepática de proteínas de fase aguda (PFA) es mediante citocinas proinflamatorias. Las citocinas tales como: IL-1 β , IL-6, TNF- α , se unen a un receptor donde activan señales intracelulares a través de la fosforilación de tirosina, así como la activación de las tirosin-kinasas intracelulares (JAKs), el factor de transcripción citoplasmático latente, el STAT1, el STAT3 y el STAT5 (activadores de la transcripción) y las proteínas activadas por mitógenos (MAPKs), donde todas las señales promueven la transcripción, traducción de las PFA.²⁹ Las funciones de las PFA positivas se consideran importantes en la optimización y captura de microorganismo, así como sus productos, en la activación del sistema del complemento, en la unión de restos celulares como fracciones nucleares, en la neutralización de enzimas, la eliminación de hemoglobina y radicales libres, así como en la modulación de la respuesta inmune del huésped. Las PFA son sintetizadas por el hígado, se ha reportado que la concentración sérica máxima de éstas se alcanza típicamente dentro de las 24 a 48 horas después del inicio de la inflamación. Según Beutler y Cerami, las PFA son estimuladas por la liberación de citocinas (IL-1 β , IL-6 y TNF- α) que se generan tanto de hepatocitos como de macrófago / monocitos en el sitio de la lesión inflamatoria o infección. Estas citocinas proinflamatorias inducen reacciones locales y sistémicas.³⁰

TNF- α , IL-1 β e INF- γ son cruciales para la expresión de mediadores inflamatorios como las prostaglandinas y los leucotrienos e induce la producción de factor activador de plaquetas e IL-6. Después de la estimulación por citocinas inflamatorias, las células de Kuffer en el hígado producen IL-6 y la presentan a los hepatocitos. Por lo tanto, IL-6 es el mediador principal para la secreción hepática de la mayoría de las PFA.³¹ En el presente trabajo encontramos diferencias importantes en el comportamiento de la IL-6, mientras que la cepa LE sólo mostró incremento de las 24 – 48 h, la cepa Wistar demostró este comportamiento desde

las 6 horas y hasta las 48 horas. Por otro lado, la cepa Sprague-Dawley mostró una disminución de la concentración sérica desde las 6 hasta las 48 horas. Estos resultados sugieren que cada cepa tiene una inducción particular de la RFA, con tiempos y niveles diferentes de inducción, duración y respuesta.

Adicionalmente, debemos considerar que, la grasa visceral, que es un órgano endocrino importante que está involucrado con la inflamación sistémica al secretar adipocinas inflamatorias entre ellas IL-6, por lo que el tejido adiposo se ha reconocido como un tejido activo en la regulación de la inmunidad y la inflamación.^{32,33} Al asociar esta idea con los resultados obtenidos de IL-6, se podría pensar que, la cepa LE al tener mayor cantidad de tejido adiposo se predispone a estar en un proceso inflamatorio basal y con esto responde tardíamente a una inflamación aguda. En este mismo sentido, La cepa SD se observó que tiene niveles basales más altos de IL-6 que las otras cepas, por lo que responde al inductor, disminuyendo la síntesis de dicha interleucina o integrándola rápidamente a la cascada de señalización. Estudios demuestran que esta cepa es más resistente a los trastornos inflamatorios, así como una respuesta más rápida de recuperación en comparación con otras cepas.³⁴⁻³⁶

La cascada de señalización de esta interleucina esta mediada por dos moléculas: el receptor de IL-6 (IL-6R) y una proteína transmembrana de tipo I (gp130). El IL-6R no tiene actividad enzimática intrínseca y una vez unido a IL-6 forma un heterotrímero con gp130 responsable de la traducción de señales. El IL-6R se expresa en pocos tipos celulares principalmente en hepatocitos y leucocitos, como lo son: los linfocitos B activadas y T.³⁷ (Eulenfeld et al., 2012, Keller et al., 2005; Simpson et al., 1997). Mientras que la proteína transductora de señales gp130, a diferencia del IL-6R, se expresa de forma ubicua en todas las células.³⁸⁻⁴⁰ (Rose-John and Heinrich, 1994; Scheller and Rose-John, 2006)

A medida que los hepatocitos integran dicha señal en conjunto a otras interleucinas y citocinas pro-inflamatorias, se establece la RFA, por lo que el hígado responde incrementando la concentración de PFA. Dentro de las primeras horas se incrementa la concentración plasmática de $\alpha 2$ macroglobulina, protrombina, factor

VIII, plasminógeno, dímero D, proteína C reactiva y α 1 antitripsina; 12 horas después, se elevan la α 1 glicoproteína ácida, ferritina, haptoglobina, la fracción C4 del complemento y el fibrinógeno. Todas alcanzan su máxima concentración entre 2 y 5 días.⁴¹ De todas estas proteínas, evaluamos a 2 representativas: la α 2 macroglobulina y el fibrinógeno. La primera observó un incremento de las 6 a las 48 horas en las cepas LE y Wistar, mientras que en la cepa Sprague-Dawley fue de las 12 a las 48 horas. Por su parte, el fibrinógeno no mostró cambios significativos en los tiempos de estudio. Por lo que podemos pensar que es debido a que en roedores ante un proceso inflamatorio agudo por LPS preferentemente induce la síntesis de α 2-macroglobulina, y el fibrinógeno sólo llega a tener un aumento moderado y puede que el consumo exceda su producción. De lo anterior podemos deducir que en las 3 cepas se generó una RFA inducida por el LPS, y que esta integra a la cascada de señalización de la IL-6 con diferente intensidad y respuesta proteica, sin embargo, también hace pensar que existen otras citocinas que pueden inducir la RFA con anterioridad o a la par de IL-6, al menos en las cepas LE y Sprague-Dawley.

Cabe destacar que las PFA difieren entre los seres humanos y las ratas; en donde la rata ante un proceso inflamatorio exagera la producción de α -1-glicoproteína ácida, α 2-macroglobulina, haptoglobina y en menor grado el fibrinógeno. Cabe mencionar que dentro de las acciones clave de las PFA, la α 2-macroglobulina es un inhibidor de proteinasas de amplio espectro y alta afinidad que se encuentra abundantemente en el plasma y fluidos intersticiales que puede unirse covalentemente con ciertos factores de crecimiento.⁴² De esta manera esta proteína tiene la función de unir péptidos y partículas del huésped o extraños, sirviendo como barrera de defensa humoral contra los patógenos en el plasma y los tejidos de los vertebrados por lo que es importante para eliminar enzimas liberadas durante la lesión. Además de la función de la inhibición de diferentes proteasas inespecíficas, también participa en el transporte plasmático de citocinas, factores de crecimiento y hormonas. La α 2-macroglobulina inhibe la actividad de la prostaglandina E2, lo que aumenta la permeabilidad de los vasos sanguíneos y actúa como un vasodilatador.⁴³⁻⁴⁵

Además, existen PFA que no son clásicamente estudiadas dentro del entorno clínico, pero que, sin embargo, están fuertemente involucradas en la respuesta inflamatoria. La cascada de señalización de IL-6, también desemboca en la inducción de MT. Asimismo, la liberación de citocinas inflamatorias o la activación del eje hipotálamo pituitario adrenal (HPA) y el eje simpático medulo-adrenal (SMA) activados mediante lesión o trauma dan como resultado la liberación de hormonas inductoras de MT, como glucocorticoides y catecolaminas. En los resultados obtenidos se muestra que tanto la cepa Wistar, como la LE tiene un incremento gradual y progresivo durante la inducción con LPS desde las 6 hasta las 48 horas, en cambio la cepa SD no tiene cambio significativo en la producción de MT, lo que nos hace suponer que parte de esta inducción está dada por IL-6, ya que correlacionan con estos resultados. Estudios han sugerido a la IL-6 como posible mediador ya que han demostrado que la inducción de MT en hepatocitos cultivados por sobrenadante de macrófagos estimulados con LPS correlaciona con la inducción causada por esta citocina (Coyle et al., 1995).⁴⁶ El efecto de la IL-6, es dependiente de la presencia de glucocorticoides en el medio que también intervienen en la regulación de fase aguda.^{47,48}

Diferentes estudios han demostrado que después de la administración de LPS o en inflamación sistémica resulta en una reducción de la concentración de zinc (Zn^{2+}) en plasma (hipozinemia), como un componente fisiológico de la RFA.⁴⁹⁻⁵² (Powanda 1979, Cousins y Leinart 1988; Rofe 1996, Liuzzi 2005). Esto sugiere que la caída de zinc circulante es debido a una mayor absorción de este metal por parte de los hepatocitos en el hígado ayudando a una mejor actividad por parte de los monocitos/macrófagos a la resolución de la eliminación del agente patógeno promoviendo efectos protectores al limitar la activación de NF- κ B y promoviendo la reducción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Para regular la homeostasis de este metal es necesaria la presencia de proteínas de unión a zinc que controla la distribución celular del mismo de una manera dependiente de redox. Dentro de estas proteínas se encuentran las MT promoviendo acciones antiinflamatorias.^{53,54}

Ocasionando la redistribución de Zn^{2+} hacia hígado, acompañada por un incremento de MT unidas a zinc, incrementando la expresión de transportadores de zinc (Zip 14) en la membrana plasmática de hepatocitos inducidos por IL-6.

Por otro lado, en la RFA se reduce la producción de varias otras proteínas que se denominan PFA negativas. Las PFA negativas son la albúmina, transferrina, transcortina y proteína de unión a retinol. En general conocidas como globulinas.^{23,55} En este sentido, se valoró el comportamiento de la cepa Wistar, Sprague-Dawley y Long-Evans inducidas con LPS, primero se realizó la valoración de la síntesis proteica hepática, tomando en cuenta que el hígado está implicado en la síntesis de proteínas plasmáticas, considerando que algunas de estas tienen una vida media larga, y que además el hígado posee una elevada capacidad de reserva funcional, por lo que la concentración de proteínas puede mantenerse normal hasta que la lesión hepática es grave, lo que ocasiona un descenso paulatino de estas.⁵⁶

Para esto se evaluó los cambios en las proteínas totales, donde los resultados obtenidos demuestran que no existe ningún cambio significativo entre las tres cepas de rata, sin embargo, la cepa SD tiende a aumentar de las 24 y 48 horas. Las proteínas totales es una medición aproximada de todas las proteínas plasmáticas presentes en el suero, las fracciones proteicas involucradas son la albúmina y las globulinas. Clínicamente esta última es determinada por la diferencia de las proteínas totales y la albúmina.¹⁸

La concentración de proteína total en plasma se mantiene durante la inflamación aguda, en parte por el aumento de la síntesis y secreción por el hígado de globulinas plasmáticas, pero no de albúmina. ⁵⁷La albúmina como se sabe, es la principal proteína plasmática sintetizada y secretada por el hígado, tiene una vida media en plasma de 20 días aproximadamente, y un descenso significativo ocurre lentamente si hay una síntesis reducida, esta proteína contribuye mayormente a la presión oncótica, además de ser la principal proteína transportadora. Sin embargo, es posible que no haya una alteración grave de la concentración de albúmina sino hasta después de un daño severo o por un estímulo inflamatorio grave, lo cual se asocia con una mayor tasa catabólica fraccional, donde predomine la síntesis de

PFA, lo que conduce a una disminución correspondiente en la síntesis y secreción de albúmina, y por consecuencia una disminución de su concentración plasmática.⁵⁸ Nuestros resultados arrojan que, tanto la cepa LE y la cepa Wistar tienden a disminuir la concentración de albúmina en los tiempos analizados, sin ser significativa; mientras que, la cepa SD tiende a aumentar la concentración de albúmina, desde las 6 hasta las 12 horas después de la administración de LPS, esto probablemente asociado a, que esta cepa es susceptible de procesos de deshidratación aguda.⁵⁹

De igual manera, la concentración de globulinas que fue otro parámetro evaluado mostró aumento no significativo en las tres cepas de rata (LE, SD, Wistar) siendo más evidente en la cepa SD. Este parámetro se incrementa en dependencia del tipo de estímulo, la duración y la gravedad de daño generado en base a las citocinas inflamatorias. Por lo que existe una dependencia del incremento de las globulinas y una limitante en la producción de albúmina, lo cual clínicamente se expresa como la relación albúmina / globulinas. Esta correlación para determinar los cambios en las proteínas, en condiciones clínicamente sanas, es en una tasa mayor de 1. Cuando existe una disminución en esta relación, indica un aumento en la producción de globulinas. Los procesos inflamatorios agudos se caracterizan por disminución de albúmina y elevación de globulinas alfa 1 y alfa 2, por ejemplo α 2 macroglobulina, haptoglobina, α 2 lipoproteína, ceruloplasmina, entre las cuales se encuentran la mayoría de los reactantes de fase aguda. Mientras que las globulinas β incluyen PFA además del complemento y varias proteínas importantes en la coagulación como el fibrinógeno.^{60,61} Los resultados obtenidos en la relación albúmina/globulinas (A/G), no muestran un cambio significativo en ninguna de las cepas en estudio, sin embargo, la cepa Wistar tiene una tendencia al decremento desde las 6 horas manteniéndose hasta las 48 horas, lo cual, no se observa en la cepa LE y SD. Por lo que, los datos sugieren que la cepa Wistar posee, al menos con estos parámetros una mayor susceptibilidad al proceso inflamatorio.

Como se sabe las citocinas pro-inflamatorias son responsables de la activación de los precursores de glóbulos blancos en la médula ósea, e infiltración, diferenciación

y maduración de macrófagos en el tejido inflamado. Los eventos microvasculares importantes que ocurren durante el proceso inflamatorio incluyen: cambios en la permeabilidad vascular, reclutamiento y acumulación de leucocitos y liberación de mediadores inflamatorios.²¹ El papel del sistema sanguíneo en la inmunidad es fundamental, ya que es altamente sensible a la señalización inflamatoria causada por insultos nocivos y alteraciones ambientales como infecciones y lesiones. Los linajes sanguíneos participan en el inicio y la resolución de eventos inflamatorios. La respuesta inflamatoria a menudo van acompañada de cambios cuali-cuantitativos en los leucocitos circulantes, que pueden verse acompañados de cambios en la serie roja y plaquetas.⁶²

Estudios han probado que los roedores presentan diferencias hematológicas notables con respecto a los humanos, en donde el recuento porcentual de neutrófilos en sangre periférica es más bajos, mientras que el porcentaje de linfocitos es mayor. Por lo que su distribución porcentual para linfocitos es del 70% al 80%, neutrófilos del 20% al 30%, eosinófilos 0% al 7% y monocitos <2% del recuento total de leucocitos.^{63,64} Uno de los parámetros valorados en el presente trabajo fue el recuento total de leucocitos donde tanto la cepa LE y SD no mostraron cambios significativos con el paso del tiempo. Mientras que la cepa Wistar, presento leucocitosis a las 12 horas posteriores a la administración de LPS para después presentar una leucopenia. Durante la RFA existe un aumento en el total de leucocitos, debido a las funciones fagocíticas y microbicidas primarias, así como de la respuesta proliferativa por parte de médula ósea, en la que se genera el aumento de la granulopoyesis durante el proceso de inflamación aguda.⁶³

En este sentido, se sabe que los neutrófilos son la primera línea de defensa celular del sistema inmune innato. Durante las infecciones microbianas, están expuestos a una variedad de estímulos solubles y particulados que pueden modular de manera diferencial la capacidad microbicida de estas células. Esto incluye la activación de neutrófilos por PAMP a través de receptores de membrana, incluyendo los TLR y citocinas inflamatorias.^{65,66} Nuestros resultados muestran un aumento paulatino del recuento absoluto de este linaje celular, en las tres cepas de estudio, a partir de las

6 horas de la administración de LPS. Estos resultados son probablemente debidos a que tanto el receptor de IL-1 β , TNF- α y TLR4 activan la vía NF- κ B conllevando a la diferenciación mieloide por parte de HSC en medula ósea.^{62, 67} Ahora bien, esta respuesta se ve exacerbada, a causa de la respuesta por parte de los monocitos/macrófagos, que son activados potencialmente por LPS, se induce la producción de citocinas pro-inflamatorias específicas (TNF- α , IL-12, IL-6 e IL-1 β). Esta primera respuesta se da en las primeras horas posteriores al inicio de la RFA. Asimismo, nuestros resultados muestran que en las 3 cepas tratadas, un mayor número de monocitos plasmáticos de las 6 a las 12 horas posteriores a la administración de LPS fueron observados, siendo más evidente en la cepa SD y Wistar. Así, después de la primera ola de citocinas proinflamatorias, los monocitos se reprograman funcionalmente para producir citocinas con propiedades anti-inflamatorias, como IL-10 y factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y con ello disminuyendo su demanda en sangre periférica.^{68, 69} Al existir un aumento en la producción mieloide, propicia que la producción linfoide se vea disminuida. Este comportamiento se vio reflejado sólo en la cepa Wistar que al tener mayor demanda de polimorfonucleares y monocitos de las 6 a las 12 horas después del estímulo, los linfocitos disminuyeron. En cambio la cepa LE y SD no mostraron cambio significativo en el linaje linfoide.

Estos cambios en la dinámica de linajes son debido a que los neutrófilos son reclutados en el sitio inflamado para la fagocitosis de los agentes infecciosos liberando una variedad de sustancias antimicrobianas como especies reactivas de oxígeno (ROS), péptidos catiónicos, eicosanoides y proteasas como elastasa, catepsina G, proteinasa 3 y activador de plasminógeno de tipo uroquinasa, aumentando la demanda de los mismos y al mismo tiempo los monocitos se ven activados para fagocitar PMN y fragmentos de degradación tisular, así como también amplificar la respuesta inflamatoria. Una vez que ha sido controlada la RFA se lleva a cabo una fase de remodelación de tejido activándose las células de la respuesta inmune adaptativa, en particular las células T mediadas por quimiocinas de esta forma durante las RFA se ve exacerbada la demanda de PMN y monocitos

y se ve disminuida la población de linfocitos durante las primeras horas de la inflamación.⁷⁰

Finalmente, se sabe que, el linaje eritrocitario puede verse afectado durante la inflamación aguda o crónica presentándose una anemia normocítica normocrómica, debido a los cambios en las respuestas eritropoyéticas, bajo nivel de hierro en suero y baja saturación de transferrina. Estos cambios son debidos a que, las citocinas inflamatorias liberadas durante una infección aguda pueden alterar el metabolismo sistémico del hierro, al inducir un exceso de síntesis de hepcidina, la hormona reguladora del hierro. Esta hormona inhibe la exportación de hierro de las células al bloquear la actividad de la ferroportina, el exceso de hepcidina, es la causa principal de la hipoferremia y la eritropoyesis con restricción de hierro donde el hospedero disminuye la biodisponibilidad de hierro evitando un mayor crecimiento de microorganismos patógenos.⁷² Los resultados obtenidos en el presente trabajo, nos indican que no se indujo anemia, ya que la concentración de hemoglobina no mostró cambios en ninguna de las cepas analizadas. En cuanto al conteo de eritrocitos las 3 cepas muestran una tendencia a disminuir, sin embargo, solo las cepas LE y SD reflejan una disminución a las 48 horas después de la administración de LPS. La supresión de eritrocitos puede asociarse a la restricción de hierro, los efectos directos de las citocinas en los progenitores eritropoyéticos y la destrucción en el parénquima hepatoesplénico, por parte de la activación de macrófagos en respuesta a citocinas inflamatorias que hace que los macrófagos fagociten y destruyan eritrocitos prematuramente.⁷¹

Además, la participación de las plaquetas durante la RFA es de gran importancia en la modulación de trombos y cascada de la coagulación que regula la hemostasia vascular de los tejidos inflamados. Una de sus funciones iniciales, es agregarse en la zona dañada y adherirse a los leucocitos, coadyuvando en la liberación de citocinas y quimiocinas, así como de tromboxano y prostaglandinas determinantes en el proceso inflamatorio, que son quimiotácticas para neutrófilos y monocitos. Esto ayuda a que los linfocitos, neutrófilos y monocitos se dirijan al sitio de inflamación. Por lo que una vez que inicia la RFA se observa una trombocitopenia debido a que

las plaquetas interactúan con los leucocitos, ayudando a capturar al patógeno estimulando la formación de la captura extracelular de neutrófilos (NET).^{73,74} En los resultados obtenidos en el presente trabajo se vio que la cepa LE no presenta cambios, respecto al número de plaquetas circulantes, probablemente esto es debido a que sólo un tercio de las plaquetas se encuentran circulando, y otros dos tercios se encuentran en el “pool endotelial”, por lo que en esta cepa se compensa evitando una trombocitopenia. Sin embargo la cepa SD si presentó trombocitopenia a partir de las 12 horas, después del estímulo inflamatorio compensando con las plaquetas endoteliales a las 24 horas después del estímulo, sin embargo, vuelve a disminuir a las 48 horas. En cambio la cepa Wistar, presenta una trombocitopenia marcada desde el inicio del proceso inflamatorio hasta las 48 horas.^{74, 75}

11. CONCLUSIONES

Al valorar los cambios leucocitarios en la cepa LE, SD y Wistar al inducir una RFA siendo inductor el LPS. Se presentó leucocitosis únicamente en la cepa Wistar. Sin embargo, en las 3 cepas hubo incremento en los polimorfonucleares y los monocitos y disminución linfocítica, en el inicio de la RFA. Además, se presentó eritropenia (cepas LE y SD) y trombocitopenia (cepas SD y Wistar) en los últimos tiempos evaluados, lo cual indica que una inflamación aguda se producen cambios hematopoyéticos diferenciales para cada cepa de estudio.

Las PFA, como IL-6 incrementó en cepas LE y Wistar, mientras que la $\alpha 2$ macroglobulina incrementó en todas las cepas, lo que sugiere que el la RFA propiciada por el LPS es dependiente cada la cepa y tiempo de análisis. Mientras que el fibrinógeno, la albúmina, globulinas y su relación, al no mostrar cambios, no son buenos marcadores inflamación aguda en rata.

Los niveles de MT hepática mostraron una dependencia directa de la concentración de IL-6 en las 3 cepas de estudio, por lo que se le puede considerar como un buen marcador de RFA intracelular.

Se evidenció por primera vez que, para el estudio de la inflamación en murinos, la RFA es dependiente de la cepa de estudio, y que la dinámica humoral y celular (leucocitaria) se expresa diferencialmente en estas, en donde la cepa Wistar es más susceptible ante la administración del LPS.

12. RECURSOS

12.1. Recursos humanos

pQ.F.B. Steffany Cortezano Esteban

D.C. Eduardo Miguel Brambila Colombres

D.C. Samuel Treviño Mora

12.2. Recursos materiales

Guantes, cubrebocas, balanza, jeringas de 1ml, y agujas de insulina, jaulas de policarbonato con serrín, bebederos, tubos eppendorf, gradilla.

Reactivos de fibrinógeno, albúmina, kit comercial de ELISA para α -2-macroglobulina e IL-6

Micropipetas de 25,50,100,10 y 1000 μ L

Baño María KIT LAB modelo:BK49D

Espectrofotómetro (AUTOKEM II)

Centrifuga Kitlab Modelo: CK-18

12.3. Recursos financieros

Los recursos financieros serán aportados por el tesista y los directores de tesis.

13. REFERENCIAS

- [1] Bode, J. G., Albrecht, U., Häussinger, D., Heinrich, P. C., & Schaper, F. (2012). Hepatic acute phase proteins – Regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF- κ B-dependent signaling. *European Journal of Cell Biology*, 91(6–7), 496–505.
- [2] Cossio-Bolaños, M., Gómez Campos, R., Vargas Vitoria, R., Hochmuller Fogaça, R. T. adeu, & de Arruda, M. (2013). Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas machos Wistar. *Nutrición Hospitalaria*, 28(6), 2151–2156.
- [3] Benavides, F. J. y Guénet, J. L. (2003). Manual de genética de roedores de laboratorio: principios básicos y aplicaciones. Universidad de Alcalá.
- [4] Carr, G. V., & Lucki, I. (2010). Comparison of the kappa-opioid receptor antagonist DIPPA in tests of anxiety-like behavior between Wistar Kyoto and Sprague-Dawley rats. *Psychopharmacology*.
- [5] Lawson, DM , Sensui, N. y Gala, RR (1984) Las ratas ovariectomizadas Sprague-Dawley y Long-Evans liberan prolactina de forma diferente en respuesta al estrógeno *Life Sci.* 34 , 455 - 459 DOI: 10.1016 / 0024-3205 (84) 90500-9
- [6] L. Luzhna, K. Kutanzi, O. Kovalchuk. Gene expression and epigenetic profiles of mammary gland tissue: insight into the differential predisposition of four rat strains to mammary gland cáncer. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 779 (2015), pp. 39-56.
- [7] Savolainen KM, Hirvonen MR, Tarhanen J, Nelson SR, Samson FE, Pazdernik TL (1990) Changes in cerebral inositol-1-phosphate concentrations in LiCl-treated rats: regional and strain differences. *Neurochem. Res.* 15, 541-545.
- [8] Wistar. (n.d.) Retrieved February 18, 2018, from <http://lebi.ucr.ac.cr/index.php/es/2-uncategorised/4-wistar-hannover>
- [9] Sprague-Dawley. (n.d.) Retrieved February 18, 2018, from <http://lebi.ucr.ac.cr/index.php/es/2-uncategorised/5-sprague-dawley>

- [10] Yoon YW, Lee DH, Lee BH, Chung K, Chung JM. Different strains and substrains of rats show different levels of neuropathic pain behaviors.(1999). 129: 167–71.
- [11] Bhopale, K. K., Kondraganti, S., Fernando, H., Boor, P. J., Kaphalia, B. S., & Shakeel Ansari, G. A. (2015). Alcoholic Steatosis in Different Strains of Rat: A Comparative Study. *Journal of Drug and Alcohol Research*, 4, 235912.
- [12] Cristina Cadoni, Gaetano Di Chiara.(2007) Differences in dopamine responsiveness to drugs of abuse in the nucleus accumbens shell and core of Lewis and Fischer 344 rats. *J Neurochem*; 103(2): 487–499.
- [13] L. Luzhna, K. Kutanzi, O. Kovalchuk. (2015) Gene expression and epigenetic profiles of mammary gland tissue: insight into the differential predisposition of four rat strains to mammary gland cancer. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 779 pp. 39-56.
- [14] Cruvinel W, Mesquita D, Pereira JA, Catelan T, Wagner A, Pereira N, Cohelo LE. (2011). Immune system – Part I Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Rev Bras JRheumatol*, 50(4):434-461
- [15] Varela, M. L., Mogildea, M., Moreno, I. & Lopes, A. Acute Inflammation and Metabolism. *Inflammation* 1–13 (2018).
- [16] Abbas A, Lichtman A, Pillai S. (2012) Basic immunology functions and disorders of the immune system, 4th ed. Philadelphia, Saunders/Elsevier, p 40.
- [17] Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al.(2001) Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science.
- [18] Cray C, Zaias J, Altman N. (2009) Acute Phase Response in Animals: A Review. *Comparative Medicine*, 59(6): 517-526.
- [19] Kuribayashi, T., Seita, T., Kawato, K., Yamazaki, S., & Yamamoto, S. (2013). Comparison of α 2-macroglobulin synthesis by juvenile vs. mature rats after identical inflammatory stimulation. *Inflammation*, 36(6), 1448–1452

- [20] Subramanian Vignesh, K., y Deepe, GS (2017). Metallothioneins: moduladores emergentes en inmunidad e infección. *Revista Internacional de Ciencias Moleculares*, 18 (10), 2197.
- [21] Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Zhao, L. (2017). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204–7218. doi:10.18632/oncotarget.23208
- [22] K. Hamesch, E. Borkham-Kamphorst, P. Strnad, R. Weiskirchen (2015). Lipopolysaccharide-induced inflammatory liver injury in mice. *Lab Anim*. 2015 Apr; 49(1 Suppl): 37–46. doi: 10.1177/0023677215570087
- [23] Jiang, Z., Meng, Y., Bo, L., Wang, C., Bian, J., & Deng, X. (2018). Sophocarpine Attenuates LPS-Induced Liver Injury and Improves Survival of Mice through Suppressing Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis. *Mediators of inflammation*, 2018, 5871431. doi:10.1155/2018/5871431
- [24] Mardiguan, S., Ladds, E., Turner, R., Shepherd, H., Campbell, S. J., & Anthony, D. C. (2017). The contribution of the acute phase response to the pathogenesis of relapse in chronic-relapsing experimental autoimmune encephalitis models of multiple sclerosis. *Journal of neuroinflammation*, 14(1), 196. doi:10.1186/s12974-017-0969-4
- [25] Seemann, S., Zohles, F., & Lupp, A. (2017). Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation. *Journal of biomedical science*, 24(1), 60. doi:10.1186/s12929-017-0370-8
- [26] Alexander C. and Rietschel E.T. (2001) Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J. Endotoxin Res.* 7, 167–202.
- [27] Mollen K. P., Anand R. J., Tsung A., Prince J. M., Levy R. M., Billiar T. R. (2006). Emerging paradigm: toll-like receptor 4-sentinel for the detection of tissue damage. *Shock* 26 430–437. 10.1097/01.shk.0000228797.41044.08
- [28] Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 42:145–51. 10.1016/j.cyto.2008.01.006

- [29] Satdarshan M. *Molecular pathology of liver diseases*. New York: Springer 2011
- [30] Beutler B, Cerami A. Cachectin Tumor necrosis factor: An endogenous mediator of shock and inflammation. *Immunol.* 1986;5:381–93.
- [31] Jain, S., Gautam, V., & Naseem, S. (2011). Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 3(1), 118–127. doi:10.4103/0975-7406.76489
- [32] Lee, H., Lee, I. S., & Choue, R. (2013). Obesity, inflammation and diet. *Pediatric gastroenterology, hepatology & nutrition*, 16(3), 143–152. doi:10.5223/pghn.2013.16.3.143
- [33] Fontana L., Eagon J.C., Trujillo M.E., Scherer P.E., Klein S. Visceral Fat Adipokine Secretion Is Associated With Systemic Inflammation in Obese Humans. *Diabetes*. 2007;56:1010–1013. doi: 10.2337/db06-1656.
- [34] Smith BK, Kelly LA, Pina R, York DA, Bray GA. Preferential fat intake increases adiposity but not body weight in Sprague-Dawley rats. *Appetite*. 1998;31:127–39.
- [35] Song, Z., Xie, W., Chen, S., Strong, J. A., Print, M. S., Wang, J. I., ... Zhang, J. M. (2017). High-fat diet increases pain behaviors in rats with or without obesity. *Scientific reports*, 7(1), 10350. doi:10.1038/s41598-017-10458-z
- [36] Tan, A. A., Quigley, A., Smith, D. C., & Hoane, M. R. (2009). Strain differences in response to traumatic brain injury in Long-Evans compared to Sprague-Dawley rats. *Journal of neurotrauma*, 26(4), 539–548. doi:10.1089/neu.2008.0611
- [37] Eulenfeld R., Dittrich A., Khouri C., Müller P. J., Mütze B., Wolf A., et al. (2012). Interleukin-6 signalling: more than jaks and STATs. *Eur. J. Cell Biol.* 91 486–495. 10.1016/j.ejcb.2011.09.010
- [38] Rose-John S., Winthrop K., Calabrese L. The role of IL-6 in host defence against infections: Immunobiology and clinical implications. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2017;13:399. doi: 10.1038/nrrheum.2017.83.

- [39] Dufour J.F, Clavien P.A. Signaling Pathways in Liver Diseases. New York: Springer 2010
- [40] Reed, D. R., Duke, F. F., Ellis, H. K., Rosazza, M. R., Lawler, M. P., Alarcon, L. K., & Tordoff, M. G. (2011). Body fat distribution and organ weights of 14 common strains and a 22-strain consomic panel of rats. *Physiology & behavior*, 103(5), 523–529. doi:10.1016/j.physbeh.2011.04.006
- [41] Iglesias I., Padilla D., Dorta A., Junco R., Agüera P., y cols. Reactantes de fase aguda en reumatología. *Revista Cubana de Reumatología*, 2014; vol. 15: 59-62
- [42] Kuribayashi, T., Tomizawa, M., Seita, T., Tagata, K., & Yamamoto, S. (2011). Relationship between production of acute-phase proteins and strength of inflammatory stimulation in rats. *Laboratory animals*, 45(3), 215–218. doi:10.1258/la.2011.010112
- [43] Matsuda T., Hirano T., Nagasawa S., Kishimoto T. Identification of alpha 2-macroglobulin as a carrier protein for IL-6. *The Journal of Immunology*. 1989;142(1):148–152.
- [44] Horn F, Wegenka UM, Lütticken C, Yuan J, Roeb E, Boers W, Buschmann J, Heinrich PC; Regulation of alpha 2-macroglobulin gene expression by interleukin-6, *Ann N Y Acad Sci*, 1994; 737: 308-323
- [45] Borth W. (1992). Alpha 2-macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics. *The FASEB Journal*, 6, 3345–3353. 10.1096/fasebj.6.15.1281457
- [46] Coyle, P., Philcox, J. C., & Rofe, A. M. (1995). Hepatic zinc in metallothionein-null mice following zinc challenge: in vivo and in vitro studies. *The Biochemical journal*, 309 (Pt 1)(Pt 1), 25–31. doi:10.1042/bj3090025
- [47] Gruys, E., Toussaint, M. J., Niewold, T. A., & Koopmans, S. J. (2005). Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 6(11), 1045–1056. doi:10.1631/jzus.2005.B1045

- [48] Scott López E.H. (2007). Las metalotioneínas y el estrés quirúrgico. REB 26(2): 67-72, 2007.
- [49] Powanda, M. C.; Abeles, F.B.; Bostian, B.F.; Flower, J.P.; Hauer, E.C. 1979. Differential effect of clofibrate on inflammation-induced alterations in plasma proteins in rat. *Biochem J.* 178:633-641.
- [50] Cousins, R.J.; Altman, N. H. 2006. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *A.J. Biol. Chem.* 281:24084-24089.
- [51] Rofe, A. M.; Philcox, J.C.; Coyle, P. 1996. Trace metal, acute phase and metabolic response to endotoxin in metallothionein-null mice. *Biochem J.* 314:793-797.
- [52] Liuzzi, J. P.; Lichten, L. A. ; Rivera, S.; Blanchard, R. K.; Aydermir, T. B.; Knutson, M. D.; Ganz, T.; Cousins, R. J. 2005. Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip 14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:6843-68.
- [53] Stafford, S. L., Bokil, N. J., Achard, M. E., Kapetanovic, R., Schembri, M. A., McEwan, A. G., & Sweet, M. J. (2013). Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper. *Bioscience reports*, 33(4), e00049. doi:10.1042/BSR20130014
- [54] Pyle, C. J., Akhter, S., Bao, S., Dodd, C. E., Schlesinger, L. S., & Knoell, D. L. (2017). Zinc Modulates Endotoxin-Induced Human Macrophage Inflammation through ZIP8 Induction and C/EBP β Inhibition. *PloS one*, 12(1), e0169531. doi:10.1371/journal.pone.0169531
- [55] Quinton, L. J., Jones, M. R., Robson, B. E., & Mizgerd, J. P. (2009). Mechanisms of the hepatic acute-phase response during bacterial pneumonia. *Infection and immunity*, 77(6), 2417–2426. doi:10.1128/IAI.01300-08
- [56] González A. Principios de Bioquímica clínica y patología molecular. Elsevier: 2010

- [57] Liao WS, Jefferson LS, Taylor JM. Changes in plasma albumin concentration, synthesis rate and mRNA levels during acute inflammation. *Amer J Physiol* 1986; 251: 928–934
- [58] S. Martínez-Subiela, F. Tecles, M. Parra, J. Cerón Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en medicina veterinaria *An. Vet. (murcia)* 17: 97-114 (2001). España
- [59] Busher JT. Serum Albumin and Globulin. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd edition. Boston: Butterworths; 1990. Chapter 101. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK204/>
- [60] Zaias, J., Mineau, M., Cray, C., Yoon, D., & Altman, N. H. (2009). Reference values for serum proteins of common laboratory rodent strains. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 48(4), 387–390.
- [61] Campuzano Maya G. La electroforesis de proteínas: más que una prueba de laboratorio. *Medicina y Laboratorio* 2006; 12: 47-70.
- [62] Pietras E. M. (2017). Inflammation: a key regulator of hematopoietic stem cell fate in health and disease. *Blood*, 130(15), 1693–1698. doi:10.1182/blood-2017-06-780882
- [63] O'Connell, K. E., Mikkola, A. M., Stepanek, A. M., Vernet, A., Hall, C. D., Sun, C. C., Brown, D. E. (2015). Practical murine hematopathology: a comparative review and implications for research. *Comparative medicine*, 65(2), 96–113.
- [64] Jacob Filho W, Lima CC, Paunksnis MRR, Silva AA, Perilhao MS, Caldeira M, et al. Reference database of hematological parameters for growing and aging rats. *Aging Male*. 2017. July 11:1–4.
- [65] Johnson, J. L., Hong, H., Monfregola, J., & Catz, S. D. (2011). Increased survival and reduced neutrophil infiltration of the liver in Rab27a- but not Munc13-4-deficient mice in lipopolysaccharide-induced systemic inflammation. *Infection and immunity*, 79(9), 3607–3618. doi:10.1128/IAI.05043-11

- [66] McDonald, B., McAvoy, E. F., Lam, F., Gill, V., de la Motte, C., Savani, R. C., & Kubes, P. (2008). Interaction of CD44 and hyaluronan is the dominant mechanism for neutrophil sequestration in inflamed liver sinusoids. *The Journal of experimental medicine*, 205(4), 915–927. doi:10.1084/jem.20071765
- [67] Takizawa H., Manz M.G. Impact of inflammation on early hematopoiesis and the microenvironment. *Int. J. Hematol.* 2017;106:27–33. doi: 10.1007/s12185-017-2266-5.
- [68] Álvarez, E., Toledano, V., Morilla, F., Hernández-Jiménez, E., Cubillos-Zapata, C., Varela-Serrano, A., López-Collazo, E. (2017). A System Dynamics Model to Predict the Human Monocyte Response to Endotoxins. *Frontiers in immunology*, 8, 915. doi:10.3389/fimmu.2017.00915
- [69] Tucureanu, M. M., Rebleanu, D., Constantinescu, C. A., Deleanu, M., Voicu, G., Butoi, E., Manduteanu, I. (2017). Lipopolysaccharide-induced inflammation in monocytes/macrophages is blocked by liposomal delivery of Gi-protein inhibitor. *International journal of nanomedicine*, 13, 63–76. doi:10.2147/IJN.S150918
- [70] Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol.* (2007) 127:514–25. 10.1038/sj.jid.5700701
- [71] Sun, C. C., Vaja, V., Babitt, J. L., & Lin, H. Y. (2012). Targeting the hepcidin-ferroportin axis to develop new treatment strategies for anemia of chronic disease and anemia of inflammation. *American journal of hematology*, 87(4), 392–400. doi:10.1002/ajh.23110
- [72] Nemeth, E., & Ganz, T. (2014). Anemia of inflammation. *Hematology/oncology clinics of North America*, 28(4), 671–vi. doi:10.1016/j.hoc.2014.04.005
- [73] Haas S., Hansson J., Klimmeck D., Loeffler D., Velten L., Uckelmann H. et al. (2015) Inflammation-induced emergency megakaryopoiesis driven by hematopoietic stem cell-like megakaryocyte progenitors. *Cell Stem Cell* 17, 422–434. doi:10.1016/j.stem.2015.07.007

[74] Sonmez O. & Sonmez M. (2017). Role of platelets in immune system and inflammation. Porto Biomedical Journal 2, 311-214. doi.org/10.1016/j.pbj.2017.05.005

[75] Morrell, C. N., Aggrey, A. A., Chapman, L. M., & Modjeski, K. L. (2014). Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. Blood, 123(18), 2759–2767. doi:10.1182/blood-2013-11-462432

[76] Van Gool J., Van Vugt H. & De Bont E. (1990) α 2 Macroglobulin and fibrinogen modulate inflammatory edema in man. Inflammation Vol. 4 N°3

ANEXOS

Anexo N° 1

Determinación de la concentración de IL-6

Método: Inmunoensayo enzimático (ELISA)

Longitud de onda: 450nm

Pocillos de microtitulación

Reactivos:

Pocillos de microtitulación recubiertos con anticuerpo de rata IL-6

Tampón cero

Reactivo de anticuerpo biotinilado

Reactivo de estreptavidina HRP concentrado

Tampón de dilución de estreptavidina HRP

Sustrato TMB

Solución de paro (H_2SO_4)

Preparación de Reactivo de Trabajo (RT) mezclar 2.5 μ l de estreptavidina HRP concentrado con 1ml de tampón de dilución de estreptavidina HRP por cada 8 pocillos.

Procedimiento:

1. Dispensar 100 μ l de muestra en los pocillos.
2. Mezclar durante 10 segundos. Sin generar burbujas.
3. Incubar a temperatura ambiente (18-22°C) durante 2 horas.
4. Después de la incubación sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.
5. Lavar los pocillos 5 veces con solución buffer de lavado.
6. Realizar un golpe de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.

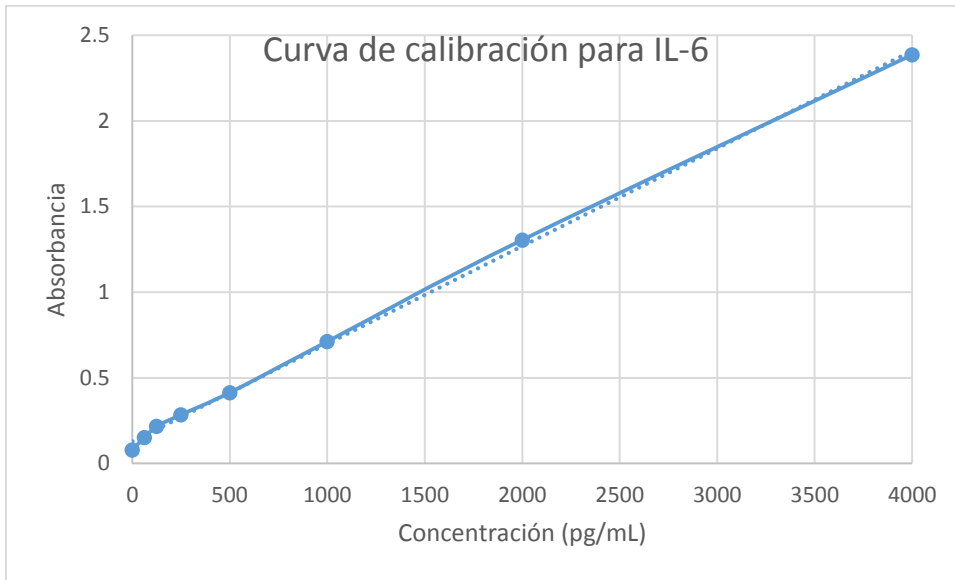
7. Adicionar 100µl de anticuerpo biotinilado a cada pocillo. Mezclar suavemente durante 10 segundos e incubar a temperatura ambiente (18°-22°C) durante 1 hora.
8. Lavar los pocillos 5 veces con solución buffer de lavado.
9. Realizar un golpe de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
10. Dispensar 100µl de RT a cada pocillo. Mezclar suavemente durante 10 segundos. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Lavar los pocillos 5 veces con solución buffer de lavado.
12. Realizar un golpe de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
13. Agregar 100 µl de sustrato de TMB en cada pocillo y mezclar suavemente por 5 segundos.
14. Incubar a temperatura ambiente por 30 min en la obscuridad.
15. Detener la reacción añadiendo 50 µl de solución stop (H₂SO₄) a cada pocillo.
16. Mezcle suavemente durante 30 segundos para asegurar que el color azul cambie completamente a amarillo.
17. Leer la absorbancia dentro de los 15 minutos de detener la reacción.

Cálculos

Leer la absorbancia que da el equipo y con la curva de calibración extrapolar.

CONCENTRACIÓN	ABSORBANCIA
0	0.08
62.5	0.152
125	0.217
250	0.285
500	0.414
1000	0.712
2000	1.305
4000	2.386

La curva de calibración se realizó con los controles que trae el reactivo.



Anexo N°2

Determinación de la concentración de α 2-macroglobulina

Método: Inmunoensayo enzimático (ELISA)

Longitud de onda: 450nm

Pocillos de microtitulación

Reactivos:

Pocillos de microtitulación recubiertos con anticuerpo rata α 2-macroglobulina

Tampón cero

Diluyente 1X

Reactivo de enzima anticuerpo conjugado

Sustrato TMB

Solución de paro (HCl)

Preparación de Reactivo de Trabajo (RT) mezclar 10 μ l de enzima anticuerpo conjugado con 990 μ l de diluyente 1X por cada 8 pocillos.

Procedimiento:

1. Dispensar 100 μ l de muestra en los pocillos.
2. Mezclar durante 10 segundos. Sin generar burbujas.
3. Incubar a temperatura ambiente (18-22°C) durante 1 hora.
4. Después de la incubación sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.
5. Lavar los pocillos 4 veces con solución buffer de lavado.
6. Realizar un golpe de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
7. Adicionar 100 μ l de RT a cada pocillo. Mezclar suavemente durante 10 segundos e incubar a temperatura ambiente (18°-22°C) durante 10 minutos.
8. Lavar los pocillos 4 veces con solución buffer de lavado.

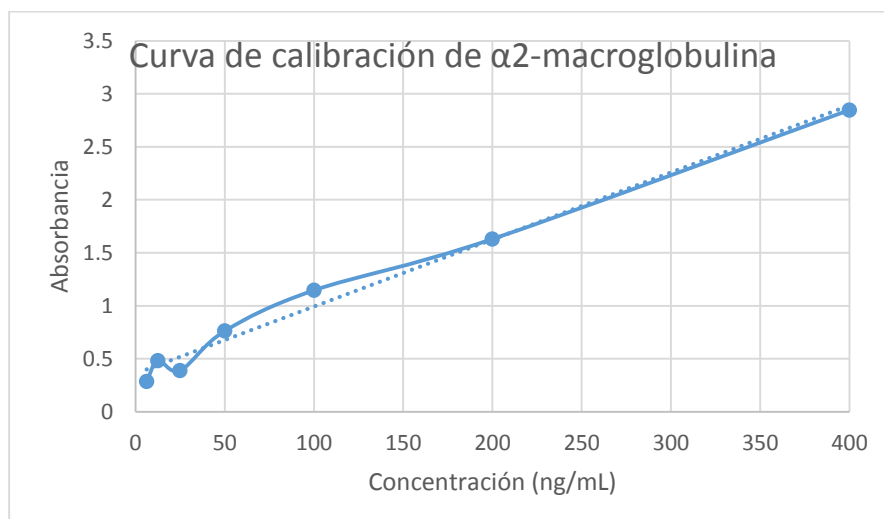
9. Realizar un golpe de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
10. Agregar 100 μl de sustrato de TMB en cada pocillo y mezclar suavemente por 5 segundos.
11. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos en la obscuridad.
12. Detener la reacción añadiendo 100 μl de solución stop (HCl) a cada pocillo.
13. Mezcle suavemente durante 30 segundos para asegurar que el color azul cambie completamente a amarillo.
14. Leer la absorbancia dentro de los 15 minutos de detener la reacción.

Cálculos

Leer la absorbancia que da el equipo y con la curva de calibración extrapolar.

CONCENTRACION	ABSORBANCIA
6.25	0.287
12.5	0.482
25	0.39
50	0.762
100	1.146
200	1.63
400	2.847

La curva de calibración se realizó con los controles que trae el reactivo.



Anexo N°3

Determinación de la concentración de albúmina sérica

Método: colorimétrico (Verde de bromocresol)

Longitud de onda: 630 (600-650) nm

Cubeta: 1cm pasó de luz

Temperatura: 37°C/ 15-25°C

Rango de medida: desde el límite de detección de 0.0349g/dL hasta el límite de linealidad de 6 g/dL. Si la concentración es superior al límite de linealidad, diluir la muestra 1:2 con NaCl 9g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Reactivo:

R Verde de bromocresol pH 4.2 (50 mmol/L)

Calibrador albúmina Patron primario acuoso de Albumina 5 g/dL.

Procedimiento:

1. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
2. Pipetear en un tubo de ensaye:

	Blanco	Patrón	Muestra
R (mL)	1	1	1
Patrón (µl)	-	5	-
Muestra (µl)	-	-	5

3. Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C o 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Verter en una cubeta.
5. Leer la absorbancia (A) del Patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo.

El color es estable 1 hora a temperatura ambiente

Cálculos:

La concentración de albúmina en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\frac{(A) \text{ Muestra} - (A) \text{ Blanco}}{(A) \text{ Patrón} - (A) \text{ Blanco}} \times 5 (\text{Conc. Patrón}) = \text{g/dL de albúmina}$$

Factor de conversión: g/dL x 144.9 = μmol/L

Anexo N°4

Determinación de fibrinógeno

Método: turbidez (Clauss)

Longitud de onda: 450 nm

Temperatura: 37°C

Reactivos:

R 1 Trombina bovina \approx 100 u NIH/MI

R 2 Tampón Imidazol, azida sódica

R 3 Solución Caolín Opcional

Calibradores ref: 1709101 control normal ref: 1709104 control pathologic ref: 1709106

Preparación R 1: reconstituir en 2.0 mL de agua destilada. Tapar y mezclar suavemente hasta disolver su contenido.

Procedimiento:

1. Realizar una dilución 1:10 con buffer salino de imidazol (IBS): 25 μ l muestra + 225 μ l de buffer.
2. Encender el equipo y esperar a que alcance la temperatura optima (37°C)
3. Después de que la luz indicadora de temperatura este encendida, colocar 100 μ l de la dilución en una copa.
4. Añadir 10 μ l de reactivo de solución caolín en la copa con la muestra e incubar por 1 minuto.
5. Seleccionar test (FiB) y posteriormente la tecla "Optic" para activar.
6. Después de incubar pasar la copa en la posición de lectura.
7. Agregar 50 μ l de tromboplastina 100 NIH U/mL presionando nuevamente la tecla "Optic".
8. Leer el resultado que se muestra en la pantalla.

Anexo N°5

Técnica del homogenado del tejido hepático

Se tomó una porción del hígado, se pesó 200mg del tejido y se colocó en un eppendorf manteniendo todo a 4 °C ya que hay enzimas y proteínas termolábiles, después se agregó 300 µl de buffer (PBS pH 8) para evitar daño osmótico y se homogenizó con un taladro especial para llevar a cabo mecánicamente la ruptura de las células.

Posterior a la homogenización mecánica, se centrifugó el líquido de consistencia espesa a 12000 rpm por 10min para obtener el sobrenadante.

Anexo N°6

Determinación de la AAS de Cd

Método: Saturación con ^{109}Cd

Procedimiento:

La determinación de la concentración de MT hepática se realizó de acuerdo al método de saturación con ^{109}Cd /hemoglobina de Onosaka y Cherian (1978) como una modificación por Eaton y Toal, 1982. Se homogenizó en frío 1 g de tejido hepático con amortiguador Tris-HCl 10mmol/L, pH 7.4, posteriormente se centrifugó a 18,000 x g por 20 minutos. A 100 μL de sobrenadante se le adicionó 100 μL de solución de ^{109}Cd , posteriormente se incubó durante 10 minutos. Luego se adicionaron 500 μL de una solución de hemolizado. Estos tubos fueron calentados en un baño de agua hirviendo por 2 minutos y posteriormente fueron enfriados en un baño de hielo por 5 minutos y finalmente fueron centrifugados a 18,000 c g por 5 minutos. Se adicionó el hemolizado a la muestra y se calentó nuevamente el agua hirviendo, este paso se repitió por una vez más y luego se determinó Cd en el sobrenadante final por AAS (espectroscopia de absorción atómica) de llama. La cantidad de ^{109}Cd fijado por la MT presente en el sobrenadante se midió mediante un detector de centelleo gamma (Perkin Elmer Wisard 1470 Automatic Gamma Counter).